

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПЕРМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
«ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Шилова Анна Владимировна

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ГИДРОЛИТИЧЕСКИЙ
ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА СОДОВОГО
ШЛАМОХРАНИЛИЩА**

03.02.03 Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Максимова Юлия Геннадьевна

Пермь – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Микроорганизмы–экстремофилы	16
1.2. Щелочные местообитания.....	18
1.2.1. Естественные местообитания	18
1.2.2. Антропогенные местообитания.....	22
1.3. Алкалофильное и галофильное микробное сообщество	24
1.3.1. Механизмы адаптации алкалофильных и галофильных бактерий к высокой щелочности и солености	26
1.3.2. Применение алкалофильных и галофильных бактерий в биотехнологии	32
1.4. Гидролитические ферменты алкалофильных и галофильных гидролитических бактерий: физиологические функции и применение	38
1.4.1. Липазы.....	39
1.4.2. Амилазы	40
1.4.3. Протеазы	43
1.4.4. Целлюлазы	46
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
2.1. Объекты изучения микробного разнообразия	50
2.2. Методы исследования	52
2.2.1. Отбор проб	51
2.2.2. Физико-химические методы исследования	52
2.2.3. Молекулярно-генетический анализ.....	53
2.2.4. Метагеномный анализ	55
2.2.5. Расчет индексов биоразнообразия.....	57
2.2.6. Учет численности и выделение чистых культур из содового шламоохранилища	57

2.2.7. Условия культивирования бактерий и определение ростовых характеристик	58
2.2.8. Определение гидролитической активности изолированных культур	59
2.2.9. Изучение влияния концентрации хлорида натрия и рН среды на рост и гидролитическую активность наиболее перспективных штаммов	62
2.2.10. Оценка метаболической активности клеток.....	63
2.2.11. Атомно-силовая микроскопия	63
2.2.12. Определение внутриклеточного рН	64
2.2.13. Статистический анализ.....	65
ГЛАВА 3. МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА ГОРОД БЕРЕЗНИКИ.....	66
3.1. Физико-химическая характеристика воды и грунтов содового шламоохранилища	66
3.2. Определение численности бактерий с различной гидролитической активностью	70
3.3. Метагеномный анализ микробного сообщества содового шламоохранилища	76
ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА	86
4.1. Выделение и идентификация алкалолотерантных бактерий, обладающих выраженными гидролитическими свойствами	86
4.2. Бактерии, обладающие целлюлазной активностью.....	95
4.3. Бактерии, обладающие амилазной активностью	96
4.4. Бактерии, обладающие липазной активностью	100
4.5. Бактерии, обладающие протеазной активностью.....	102

4.6. Влияние состава сред культивирования на гидролитическую активность наиболее перспективного изолята <i>Pseudomonas peli</i> 3–Т, обладающего липазной активностью.....	105
ГЛАВА 5. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АЛКАЛОФИЛЬНОГО <i>Bacillus aequororis</i> 5–ДБ , ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА	111
5.1. Влияние концентрации хлорида натрия и рН на рост и гидролитическую активность <i>Bacillus aequororis</i> 5-ДБ.....	111
5.2. Влияние концентрации хлорида натрия и рН на уровень метаболической активности <i>Bacillus aequororis</i> 5-ДБ.....	114
5.3. Влияние концентрации хлорида натрия и рН на морфологию <i>Bacillus aequororis</i> 5-ДБ.....	117
5.4. Влияние концентрации хлорида натрия и рН среды на внутриклеточный рН <i>Bacillus aequororis</i> 5-ДБ	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	131
ВЫВОДЫ	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	138
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	167
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	168
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	169

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Места обитания, значительно отличающиеся по одному или нескольким физико-химическим параметрам от большинства экосистем, принято называть экстремальными, а населяющие их организмы – экстремофилами. Экстремальные водные системы широко распространены в природе и отличаются крайними значениями температуры, рН, солености, повышенным давлением или высокими концентрациями токсических веществ (Grant, Sorokin, 2011). Экстремофилы длительное время находятся в центре внимания исследователей. Изучение биологического разнообразия экстремофильных микробных сообществ представляет интерес для фундаментальной микробиологии, так как многие обитающие в этих условиях микроорганизмы относятся к эволюционно древним ветвям бактерий и архей (Yadav et al., 2017; Gutiérrez et al., 2016; Likar et al., 2017; Andrew et al., 2017; Johnson et al., 2017). Именно они составляют основной генофонд, противостоящий изменениям окружающей среды и различным катаклизмам (Заварзин, 2004; Slobodkina et al., 2016; Bonch-Osmolovskaya, 2015; Namsaraev et al., 2010). Большой интерес вызывает изучение механизмов биохимической адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям окружающей среды, а также использование их биомассы и экстремоферментов в биотехнологии (Морозкина и др., 2010).

Содовые озера являются экстремальными природными водными системами, характерной особенностью которых является высокая концентрация солей и щелочная среда. Накопление соды происходит вследствие их питания поверхностными и грунтовыми карбонатными водами, минерализованными за счет выветривания силикатов (Заварзин, Жилина, 2000; Борзенко, Замана, 2008; Sorokin et al., 2015). Щелочные высокоминерализованные водные системы могут иметь и антропогенное происхождение. Это могут быть шламонакопители, места захоронения отходов, щелочные сточные воды.

Работы, посвященные изучению микробиома таких искусственных щелочных биоценозов, немногочисленны (Kevbrin, 2019).

Выделенные из экстремальных экологических ниш микроорганизмы адаптированы к неблагоприятным факторам окружающей среды и обладают большим биотехнологическим потенциалом. Ферменты, синтезируемые данными микроорганизмами, как правило, обладают повышенной активностью и стабильностью в различных неблагоприятных условиях, в том числе при защелачивании и в присутствии высоких концентраций солей (Морозкина и др., 2010; Ogen, 2010). Гидролитические ферменты, устойчивые к экстремальным условиям, представляют большой интерес для промышленности. Так, протеазы (КФ 3.4) находят широкое применение в качестве компонентов моющих средств, растворов для контактных линз, в производстве сыра и переработке мясных продуктов (Gupta et al., 2002; Sharma et al., 2017). Амилазы (КФ 3.2.1.1) используются преимущественно в пищевой промышленности: в хлебопечении, в переработке фруктовых соков, а также в обработке бумаги и текстиля, составляя около 25% объема используемых промышленных ферментов. Щелочные амилазы сохраняют активность в диапазоне pH 8–11 и применяются в производстве моющих средств (Sarethy et al., 2011). Целлюлазы (КФ 3.2.1.4) применяются для модификации целлюлозосодержащих отходов (Jagtap, Rao, 2005). Щелочные целлюлазы также являются компонентами моющих средств и используются в текстильной промышленности (Anish et al., 2007; Новожилов, Пошина, 2011). Во многих биокаталитических процессах используются липазы (КФ 3.1.1). Они активны по отношению к широкому ряду субстратов, стабильны в органических растворителях, не требуют присутствия кофакторов. Липазы широко используются в биотехнологии, включая синтез биополимеров, биодизельного топлива, фармацевтических препаратов и других соединений, а также биодеструкцию техногенных загрязнителей (Безбородов, Загустина, 2014). Липазы, устойчивые к щелочной среде, востребованы в производстве моющих средств (Hasan et al., 2010).

В связи с этим, экстремофилы представляют большой фундаментальный научный и биотехнологический интерес, обусловленный их высокоселективной нишевой специализацией, адаптацией к условиям окружающей среды и способностью к продукции ферментов в широком диапазоне экстремальных условий (Grant et al., 1990). Недостаточная изученность микробного разнообразия щелочных высокоминерализованных биотопов антропогенного происхождения, в частности, содовых шламохранилищ, изменения микробиома в процессе осушения и восстановления этих территорий, биотехнологического потенциала бактериального сообщества бедных углеродным субстратом щелочных сред обуславливает актуальность диссертационного исследования.

Состояние вопроса

В настоящее время накоплена достаточно обширная информация, касающаяся биоразнообразия прокариотов содовых озер природного происхождения. Микробиота содовых озер исследуется во всем мире: проанализированы микробные сообщества содовых озер Юго-Восточной Сибири (Foti et al.; Турова и др., 2014), Северо-Восточной Монголии (Sorokin et al., 2004), центральной Монголии и Китая (Zhang et al., 2001; Ma et al., 2004, Индии (озеро Лонар) (Wani et al., 2006; Joshi et al., 2008), Кении и Танзании (Rees et al., 2004; Mwirichia et al., 2010; Mwirichia et al., 2011), Египта (Mesbah et al., 2007), США, озеро Моно, Калифорния (Hollibaugh et al., 2001; Humayoun et al., 2003), озеро Соуп, Вашингтон (Dimitru et al., 2008), Венгрии (национальный парк Кискунсаг) (Borsodi et al., 2015). Микробное разнообразие содовых озер в России, а также физиологию и адаптацию микроорганизмов-алкалофилов всесторонне исследуют микробиологи Института микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН (Москва) и Института общей и экспериментальной биологии (Улан-Удэ). В настоящее время все большее внимание уделяется методу метагеномного секвенирования для изучения микробиома окружающей среды, в частности, экстремальных сред обитания (Зайцева и др., 2014). Были выявлены изменения в структуре микробных сообществ щелочных озер Забайкалья, связанные с различиями в минерализации и гидрохимических

показателях. В осадках озер были определены 47 прокариотных филумов, в том числе 42 бактериальных и 5 архейных, доминировали филумы *Proteobacteria*, *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* и *Firmicutes* (Зайцева и др., 2018). Работы, посвященные изучению микробиома искусственных щелочных биоценозов, немногочисленны. Так, изучено микробное разнообразие и геохимия озера Калумет на юго-востоке Чикаго. За десятилетия захоронения промышленных отходов крупномасштабное заполнение заболоченных угодий стальным шлаком создало водоносный горизонт со значениями pH, достигающими 12,8. В этой щелочной среде были обнаружены представители *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Firmicutes* (Roadcap et al., 2006). Из золя щелочного диоксида кремния, который является важным малотоннажным химическим продуктом, были выделены штаммы факультативных алкалофилов с протеазной и амилазной активностями (Ren et al., 2014). Щелочные сточные воды также явились источником выделения алкалофильных бактерий, которые были отнесены к родам *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus*, *Escherichia*, *Marinococcus*, *Micrococcus*, *Natronobacterium*, *Neisseria*, *Pleisomonas*, *Pseudomonas* и *Sporosarcina* (Ali et al., 2009). Единичный пример изучения микробиома отходов производства карбоната натрия, получаемого из известняка и хлорида натрия по методу Сольве в г. Яниково (Польша), отражает результаты метагеномного исследования экотопа, который отличается по ряду физико-химических параметров от исследуемого нами. Главное отличие состоит во влажности содового шлама, который в шламохранилище г. Яниково представлен сухой массой, смачиваемой лишь атмосферными осадками. В этой сильно засоленной, щелочной и бедной питательными веществами среде было обнаружено бактериальное сообщество, в котором доминировали филумы *Proteobacteria* (52,8%) и *Firmicutes* (16,6%) (Kalwasińska et al., 2017).

Формирование шламов содового производства происходит в процессах осветления сточных вод в шламонакопителях («белые моря»), куда поступают твердые отходы и производственные сточные воды (дистиллерная жидкость) в

отношении 1:120–1:140. Шламы содового производства по физико-химическому составу представляют собой смесь карбонатов магния и кальция, а также сульфата кальция (Самутин и др., 2013). На Березниковском содовом заводе также применяется аммиачный способ получения соды, при этом в процессе извлечения аммиака образуется хлорид кальция, который с одной стороны, является важным побочным продуктом, с другой стороны составляет большую часть отходов производства. В шламонакопители отход поступает в виде пульпы, в которой преобладает жидкая фаза (Блинов и др., 2003).

Отличием содовых шламоохранилищ от природных содовых озер является то, что основным катионом в щелочных природных озерах является натрий, а в антропогенных – кальций. В связи с этим исследования микробиома содовых шламоохранилищ интересны в сравнении с уже накопленными данными по микробному разнообразию природных содовых озер.

Большой потенциал промышленного использования имеют гидролитические ферменты алкалофильных микроорганизмов. К примеру, щелочные протеазы – один из наиболее важных классов промышленно-значимых ферментов. Основные сферы их применения – в индустрии детергентов, кроме того, эти ферменты используют при производстве кожи, фармпрепаратов, пищи, диагностических реагентов, синтезе пептидов (Abdelnasser et al., 2015). Основным источником бактериальных щелочных протеаз являются виды рода *Bacillus* (Singhal et al., 2012; Krishnaveni et al., 2012; Vanitha et al., 2014).

В настоящее время широко изучаются адаптационные механизмы алкалофилов, продуцирующих внеклеточные ферменты. Экстремоферменты изучаются на всех уровнях – от условий выращивания продуцента до молекулярной структуры, что указывает на актуальность данной темы.

Цель настоящего исследования – охарактеризовать филогенетическое разнообразие микробиома содового шламоохранилища (г. Березники, Пермский край) и оценить биотехнологический потенциал выделенных экстремофильных и/или экстремотолерантных представителей домена *Bacteria*.

Основные задачи исследования:

1. Изучить филогенетическое разнообразие микробиоценоза действующей и старой карты содового шламохранилища г. Березники (Пермский край);
2. Выделить и идентифицировать бактериальные культуры с амилазной, липазной, протеазной и целлюлазной активностями;
3. Оптимизировать среду культивирования галоалкалотолерантного *Pseudomonas peli*, обладающего активной липазой;
4. Изучить морфологические и физиолого-биохимические особенности факультативного алкалофила *Bacillus aeuqororis* в условиях повышенной минерализации и широком диапазоне рН среды.

Научная новизна

Впервые охарактеризовано филогенетическое разнообразие бактериального сообщества различных сред содового шламохранилища: действующей карты, представляющей собой содовый шлам, дистиллерную жидкость и прибрежные техногенные поверхностные образования, и старой карты, на осушенных территориях которой происходит восстановление растительного покрова. Аналитическими методами показано преобладание кальция в виде осадков гидрокарбонатов и высокое содержание хлорид-ионов. Методом метагеномного секвенирования показано, что бактериальное сообщество представлено 7 филумами: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* и *Candidatus Saccharibacteria*, из которых доминирующее положение занимают *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Изучена сукцессия бактериального сообщества при восстановлении территорий старой карты шламохранилища и выявлены биомаркеры восстановления природной среды после антропогенной нагрузки этого типа. Показано, что появление рода *Cellulomonas* связано с восстановлением растительного покрова, так как данные бактерии являются ассоциативными микроорганизмами растительных симбиозов. Увеличивается доля ацидобактерий и актинобактерий, что связано с приближением рН техногенных

поверхностных образований к нейтральным значениям и появлением микроокружения, создаваемого ризосферой растений. Оценено α -разнообразие и выровненность бактериального сообщества сред содового шламохранилища.

Модифицирована методика выделения гидролитических алкалотолерантных и алкалофильных бактерий из высокощелочной среды антропогенного происхождения, предполагающая отсутствие двух лимитирующих факторов (селективного субстрата и высокого pH) в среде с целью получения более обширного материала для скрининга гидролитических активностей. Выделение бактерий из содового шламохранилища на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (pH 8) позволило получить достаточное разнообразие алкалотолерантных и галотолерантных штаммов, способных гидролизовать крахмал, липиды, белки, целлюлозу, тогда как на богатой среде с pH 11 в отсутствие селективных субстратов были получены алкалофильные изоляты, обладающие сопоставимой гидролитической активностью.

Биохимическими методами изучен биотехнологический потенциал выделенных и идентифицированных бактериальных изолятов, устойчивых к щелочной среде и высокому содержанию солей, с различными гидролитическими активностями, в том числе липазной, протеазной, амилазной, целлюлазной.

Изучена морфология и определены морфометрические характеристики, уровень метаболической активности и внутриклеточный pH факультативного алкалофила *Bacillus aequororis* в сравнении с нейтрофильным *Bacillus subtilis* в широком диапазоне pH среды и в присутствии 50 г/л хлорида натрия. Показана повышенная устойчивость *B. aequororis* в отличие от *B. subtilis* не только в щелочной, но и в кислой среде, а также установлено, что pH 11 внешней среды снижает отрицательное воздействие высокой минерализации (50 г/л NaCl) на клетки как алкалофильного, так и нейтрофильного штамма *B. subtilis* ATCC 6633.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные содержат новую информацию о филогенетическом разнообразии домена *Bacteria* в щелочных высокоминерализованных средах антропогенного происхождения (содовом шламохранилище), о его алкалофильных и алкалотолерантных представителях, обладающих гидролитическими активностями. Результаты метагеномных и бактериологических исследований расширяют знания о микробиологии экстремальных экологических ниш.

Выделено в чистую культуру 78 изолятов алкалотолерантных и алкалофильных бактерий. В результате скрининга на наличие гидролитических активностей среди бактериальных изолятов, изолированных из среды с повышенной щелочностью и минерализацией, выявлены штаммы-продуценты, обладающие амилазной, липазной, протеазной, целлюлазной активностями. Данные штаммы полезны для биотехнологий и могут служить источником ферментов, используемых в различных сферах народного хозяйства (химической промышленности, производстве детергентов, обработке целлюлозосодержащих отходов и других отраслях). Оптимизирована среда культивирования наиболее перспективного штамма *Pseudomonas peli* – продуцента липазы, активной в высоко щелочной среде. Идентифицировано 58 штаммов бактерий и последовательности 16S рРНК депонированы в GenBank. Полученные данные использованы в лекционном курсе для студентов магистратуры биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета.

Положения, выносимые на защиту

1. Бактериальные сообщества сред содового шламохранилища отличаются крайне низкими α -разнообразием и выровненностью. Доминирующими филумами микробиома действующей карты содового шламохранилища г. Березники (Пермский край) являются *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Индикатором восстановления природной среды после антропогенной нагрузки является появление рода *Cellulomonas*.

2. Для выделения чистых культур галоалкалотолерантных бактерий с гидролитическими активностями из высокоминерализованной щелочной среды целесообразно сочетать 2 подхода: 1) выделение на минеральной среде с рН 8 и селективными субстратами (твин-80, пептон, крахмал, целлюлоза) и 2) выделение на полноценной среде с рН 11.

3. Среда культивирования *Pseudomonas peli*, наиболее перспективного продуцента липазы, оптимизирована по источнику углерода и азота. Максимальный выход активной биомассы и увеличение липолитической активности достигнуты при росте на минеральной среде с 0,5% глицерина и 0,03% мочевины.

4. Факультативный алкалофил *Bacillus aequororis* 5-ДБ обладает устойчивостью и сохраняет метаболическую активность в среде как с высоким, так и с низким рН, его адаптация к крайним значениям рН и высокой концентрации хлорида натрия не сопровождается значительным изменением морфометрических параметров, при этом сочетание рН 11 и 50 г/л хлорида натрия в среде в меньшей степени оказывает негативное влияние на клетки за счет высокой концентрации ионов натрия.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Государственного задания на тему «Изучение функционального и видового разнообразия микроорганизмов, полезных для экоценозов и практической деятельности человека», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290008-4, гранта РФФИ № 19-34-90103 «Биоразнообразии прокариотов щелочных биотопов антропогенного происхождения» и проекта международных исследовательских групп на базе государственных образовательных учреждений или научных организации Пермского края № С-26/507 «Получение препаратов для сельского хозяйства на основе клеток и ферментов микроорганизмов экстремальных экосистем», выполняемого при финансовой поддержке Правительства Пермского края.

Автором самостоятельно выполнена основная часть экспериментов, проведена их математическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов. Подготовка к печати научных работ, отражающих результаты диссертационного исследования, осуществлена автором самостоятельно или при участии соавторов. Атомно-силовая микроскопия выполнена в лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Метагеномный анализ образцов выполнен в ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Степень достоверности и апробация работы. Научные положения и выводы обоснованы и базируются на воспроизводимых экспериментальных данных, степень достоверности которых доказана путем использования методов статистического анализа. Отдельные фрагменты работы доложены и обсуждены на II Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни» (Пермь, 2018), IMWA Conference «Mine water: Technological and Ecological Challenges» (Пермь, 2019), Всероссийской конференции с международным участием «Микроорганизмы: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019), III Всероссийской конференции по астробиологии «Экзобиология от прошлого к будущему» (Пушино, 2020), XII Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз–Россия 2020» (Пермь, 2020), XII Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2021).

Публикации. Результаты проведенных исследований опубликованы в 14 научных работах: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 3 публикации в журналах, входящих в базу Scopus и Web of Science, а также 10 публикаций в других журналах и сборниках.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка

литературы. Диссертация изложена на 169 страницах, содержит 14 таблиц и иллюстрирована 18 рисунками. Список литературы включает 251 наименований, из них 214 на иностранных языках.

Список принятых сокращений

pH_{in} – внутриклеточный pH

pH_{out} – внеклеточный pH

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

cFDASE – 5 (и 6 -) диацетат карбоксифлуоресцеина сукцинимидиловый эфир

cFSE – 5 (и 6 -) - сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина

HEPES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микроорганизмы-экстремофилы

Микроорганизмы широко распространены в природе и являются необходимыми компонентами всех известных экосистем на Земле. Одной из характерных особенностей микроорганизмов является то, что некоторые из них эволюционировали, чтобы процветать в «экстремальных» условиях, которые слишком суровы для других организмов. Представители доменов *Bacteria* и *Archaea*, которые выживают и растут в необычных условиях окружающей среды, враждебной или летальной для других микроорганизмов, называются экстремофилами (Jebbar et al., 2015; Poli et al., 2017). Экстремальные значения температуры, pH, окислительно-восстановительного потенциала, солености, дефицит воды, а также различные комбинации этих факторов, характерны для многих наземных и водных сред обитания, которые заселяются только микроорганизмами (Kusum et al., 2016). Условия внешней среды оказывают влияние на организм посредством раздражителей: нормальных и экстремальных. К нормальным или физиологическим раздражителям организм приспособлен в ходе своего филогенетического развития. Эти раздражители могут изменяться, приобретая характер экстремальных, и вызывать у организмов чрезвычайное напряжение адаптационных механизмов – стресс. Понятие «стресс» определяют как общий комплекс неспецифических компенсаторно-приспособительных процессов, развивающихся у организмов в ответ на воздействие стрессоров.

Экстремофильные прокариоты включают две категории организмов. Моно- и полиэкстремофилы для своего роста требуют наличие одного или более экстремальных факторов во внешней среде. Экстремотолерантные организмы могут обладать устойчивостью к одному или более физико-химическим параметрам, но оптимальными для них являются «нормальные» условия (Seckbach et al. 2013; Саралов, 2019).

В настоящее время классификации экстремофилов включают термофилов, психрофилов, галофилов, ацидофилов, алкалофилов и пьезофилов

(Rampelotto 2013; Rothschild and Manicinielli 2001; Satyanarayana et al. 2005) (рис. 1). При анализе сочетаний экстремальных условий отмечают, что фактически нет ацидофильных психрофилов и галофилов, отсутствуют пресноводные пьезофилы, нет галофильных гипертермофилов (Pikuta et al., 2007). Бактерии, как правило, доминируют в низкотемпературных и щелочных экосистемах, а археи – в высокотемпературных и кислых (Саралов, 2019).

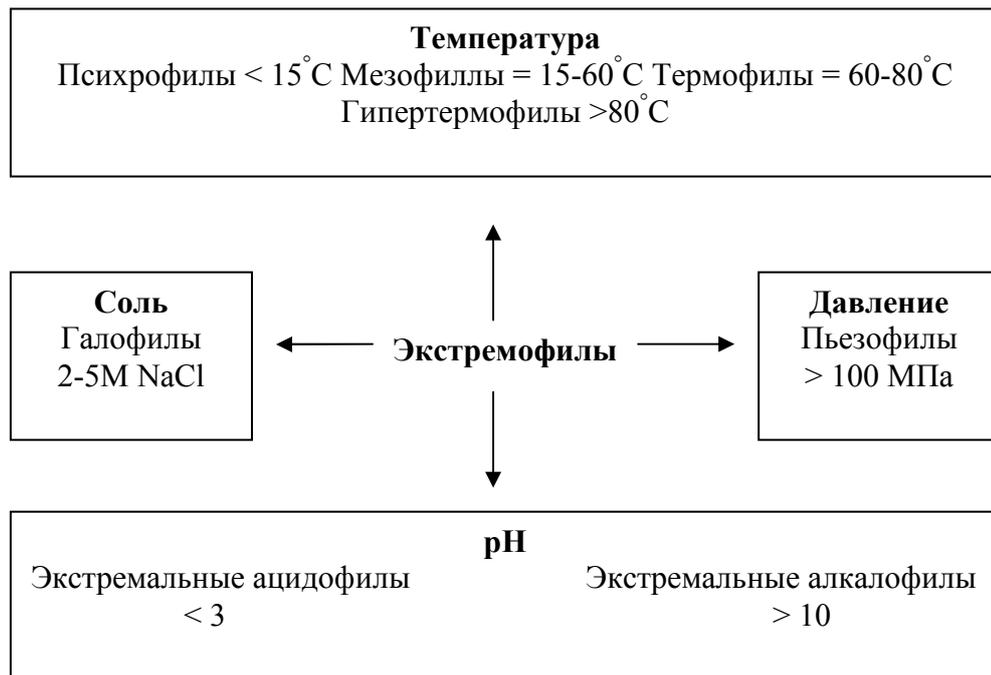


Рисунок 1 – Классификация экстремофилов

Экстремофилы на основе различных механизмов разработали ряд стратегий, чтобы справиться с воздействием преобладающих неблагоприятных факторов, включая изменения в их клеточной структуре и биохимической активности. В целом термофилы и психрофилы проявляют тенденцию изменять содержание липидов в мембране, чтобы избежать температурного стресса, галофилы накапливают осмолиты в цитоплазме, чтобы смягчить эффект высоких концентраций солей, ацидофилы и алкалофилы используют транспортные насосы для гомеостаза клетки, а пьезофилы переносят высокое давление за счет увеличения содержания ненасыщенных жирных кислот в своих мембранах (Konings et al. 2002; Padan et al. 2005; Reed et al. 2013).

Полиэкстремофилы привлекают внимание исследователей из-за аспектов, относящихся к экологической устойчивости и возможности биотехнологического применения.

Выделенные из экстремальных экологических ниш экстремофильные микроорганизмы хорошо адаптированы к неблагоприятным факторам окружающей среды и обладают огромным биотехнологическим потенциалом (Морозкина и др., 2010).

1.2. Щелочные местообитания

Микроорганизмы, процветающие в щелочных условиях, повсеместно распространены и населяют различные экологические ниши на Земле. Щелочная среда, подходящая для сообществ таких микроорганизмов, может быть создана определенными геологическими процессами или деятельностью человека. Также возникновение щелочных условий может быть связано с активностью нейтрофильных микроорганизмов в результате определенных реакций, что объясняет широкое распространение алкалофилов. Данные микроорганизмы интересны с фундаментальной точки зрения, в качестве объектов изучения механизмов адаптации и взаимодействий в экосистеме, а также для биотехнологического применения (Kevbrin, 2019).

1.2.1. Естественные местообитания

В создании естественных щелочных сред участвуют геохимические процессы. Ярким примером являются содовые озера, которые широко распространены в тропических, субтропических и внутриконтинентальных криоаридных зонах Земли. Содовые озера представляют локальную естественную модель, где происходит процесс континентального углекислотного выветривания в субаэральных условиях под действием атмосферного гидрологического цикла (Заварзин, 2007).

Содовые озера содержат большое количество ионов натрия (Na^+) и карбонатные соединения ($\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$), pH в них чаще всего больше 9. Также

содовые озера характеризуются высокой концентрацией хлоридов, различной концентрацией сульфатов и калия и низкой концентрацией щелочноземельных металлов из-за состояния равновесия с карбонатными минералами (кальцит, кальцит с высоким содержанием магния, стронцианит и др.) (Schagerl et al., 2016). Обилие HCO_3^- и CO_3^{2-} в сочетании с щелочностью является основным химическим фактором, влияющим на экосистему озёр и водохранилищ (Boros et al., 2018).

По методу М.Г. Валяшко (Валяшко, 1962) выделяют три основных типа щелочных экосистем: карбонатный, сульфатный и хлоридный. Главными компонентами рассола карбонатного (содового) типа являются ионы Na^+ (K^+), Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} . Количество ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} в жидкой фазе зависит от растворимости CaCO_3 , MgCO_3 , которые не влияют на ход кристаллизации растворимых минералов. В сульфатном типе содержатся следующие компоненты: Na^+ (K^+), Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} . Содержание ионов HCO_3^- , CO_3^{2-} определяется пределами растворимости кальциевых и магниевых карбонатов, содержание сульфатов – растворимостью сульфата кальция. Различают два подтипа: сульфатномагниевый и сульфатнатриевый. Главными компонентами хлоридного типа являются ионы Na^+ (K^+), Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- . Содержание HCO_3^- , CO_3^{2-} определяется растворимостью кальциевых и магниевых солей, содержание сульфата – растворимостью сульфата кальция. Эти рассолы насыщены карбонатами кальция и магния, а также гипсом.

Имеются и другие классификации, где разделяют природные воды на нейтральные и щелочные (Eugster et al., 1978), карбонатный тип подразделяют на сильные, умеренные и слабые карбонатные подтипы на основе значения K_c ($K_c = (\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3 / \text{общая соль}) \times 100\%$, где концентрация выражена в массовых процентах) (Mianping et al., 1993), а также различают содовый и содово-солевой типы рассолов (Boros and Kolpakova, 2018).

Общей чертой всех содовых озёр в закрытых бассейнах является концентрация неорганических солей при испарении, где преобладают

карбонаты натрия, а расширенная классификация дает более точное представление об исследуемом объекте (Эрдынеева и др., 2018).

Микробные сообщества, которые населяют содовые озера, в основном фототрофны и автохтонны, при этом они характеризуются высокой продуктивностью. Многочисленные примеры содовых озер можно найти в Восточно-Африканской рифтовой долине (Эфиопия, Кения, Танзания), в Восточной Турции, щелочные озера Большого бассейна на западе США, а также многочисленные азиатские щелочные мелководные озера Монголии, Китая, Индии и Южной Сибири в России.

Другая геохимическая щелочная система представлена процессом серпентинизации, который представляет собой метаморфическое превращение богатых олевином и пироксенами горных пород в минералы серпентинитовой группы. Серпентинизация – довольно сложный каскад реакций (Chavagnac et al., 2013), и первая стадия характеризуется растворением силикатов, что сопровождается сопутствующим увеличением pH окружающей среды:

для форстерита (разновидности олевина):



для энстатита (разновидности пироксена):



Серпентинизирующие системы могут быть как наземными, так и подводными. В отличие от содовых озер щелочность генерируется гидроксильными анионами, а для наземных систем, где присутствие карбонатов минимально, pH может достигать 12. Места серпентинизации менее распространены и более разнообразны по ионному составу по сравнению с карбонатными системами. Процесс серпентинизации представляет собой экстремальные экониши, которые населяют разнообразные микробные сообщества с уникальными ферментными системами, обеспечивающими получение питательных веществ и энергии (Schrenk, Brazelton, 2013). Наземные участки серпентинизации с вытекающими щелочными водами находятся в Иордании (Pedersen et al., 2013), Португалии (Tiago, Veríssimo, 2013),

Ньюфаундленде, Канаде (Brazelton et al., 2013), Филиппинах (Woycheese et al., 2015), северной Италии (Quéméneur et al., 2015), Омане (Rempfert et al., 2017), Турции (Neubeck et al., 2017), Коста-Рика (Crespo-Medina et al., 2017), и серпентинизирующие источники в Калифорнии (The Cedars) (Suzuki et al., 2013).

Условия, которые возникают в ходе процесса серпентинизации, характеризуются высокими значениями рН среды, недоступностью и недостатком питательных веществ, избытком водорода, метана и низкомолекулярных органических кислот, а также высоким содержанием тяжелых металлов (Schrenk, Brazelton, 2013). Микробное разнообразие участков серпентинизации не уступает фототрофным сообществам содовых озер. Но в сравнение с содовыми озерами, эти среды обитания менее изучены.

Еще одна геохимическая система, которая характеризуется высокими значениями рН – это море (рН воды составляет около 8,3 и является слабощелочной средой). В настоящее время Мировой океан имеет слабощелочную, но довольно стабильную среду, сравнимую с таковой в слабоминерализованных содовых озерах. Из данной среды микробиологи выделяют различных строго и факультативно аэробных алкалофилов.

Другая природная щелочная система, в которой обитают алкалофилы – это щелочная почва (солончаковые почвы). В отличие от содовых озер или морской воды, почвы имеют сложный химический состав, который зависит от местного геологического фона, обитающей биоты и климатических особенностей. Почвы всех типов являются богатыми резервуарами различных микроорганизмов.

Щелочные значения рН солончаковых почв, которые поддерживают рост алкалофилов, достигаются за счет высокого содержания хлоридов и карбонатов натрия. Солончаковые почвы расположены в аридных зонах и встречаются на юге Сибири (сухие степи), северо-восточной Монголии, северном Китае, Египте, Индии, Пакистане, Венгрии, Аргентине и североамериканских прериях (Kevbrin, 2019). Филогенетическое разнообразие бактерий солончаковых почв

представлено следующими филами *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Planctomycetes*.

Еще одна природная щелочная среда, которая кажется многообещающей с точки зрения поиска и выделения новых алкалофильных микроорганизмов, представляет собой колонны туфа икаита. Столбы икаита образуются, когда щелочные пресноводные источники, богатые карбонатом натрия, встречаются с холодной, богатой кальцием морской водой, что приводит к немедленному перенасыщению ионов кальция и карбоната и последующему росту колонны. Внутреннее пространство заполнено холодной (4°C) щелочной (pH 10,4) и родниковой водой с низкой соленостью (0,9%), циркулирующей через колонку. В этой своеобразной среде обнаружено большое разнообразие видов бактерий (Schmidt et al., 2006; Trampe et al., 2017).

1.2.2. Антропогенные/техногенные местообитания

Помимо природных процессов, деятельность человека также может создавать щелочную среду для обитания алкалофильных микроорганизмов. Также антропогенная среда создается в течение нескольких лет или десятилетий, что дает возможность микробиологам наблюдать, как микробные сообщества быстро адаптируются к постоянным изменениям в окружающей среде.

Ярким примером экстремальной среды обитания микробного сообщества может служить район озера Калумет, который находится на юго-востоке Чикаго, США. Большие (150 км²) водно-болотные комплексы в низменной зоне озера Калумет использовались для удаления промышленных отходов, в основном шлаков сталелитейных заводов. За десятилетия захоронения промышленных отходов крупномасштабное заполнение водно-болотных угодий стальным шлаком создало водоносный горизонт со значениями pH, достигающими 13. Несмотря на экстремальные условия, в данной среде были обнаружены представители филумов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Firmicutes* (Roadcap et al., 2006; Kevbrin, 2019).

Другим примером искусственной щелочной среды является огромное содовое шламохранилище (200 га) в Польше, г. Яниково. Хранилище было создано как место хранения отходов химического завода по производству соды методом Сольве. В среде с высоким содержанием солей, щелочным рН (10,8) и незначительным содержанием питательных веществ выявлено разнообразное микробное сообщество, в котором доминировали филумы *Proteobacteria* и *Firmicutes* (Kalwasińska et al., 2017).

Также штаммы факультативных алкалофилов с различной гидролитической активностью были выделены из гниющего щелочного золя кремнезема, который является важным малотоннажным химическим продуктом и широко используется в химической и текстильной промышленности. Выделенные штаммы из такой среды обитания, которая является полностью искусственной, идентифицированы как *Exiguobacterium aurantiacum*, *Cyclobacteriaceae bacterium*, *Microbacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* и *Bacillus thuringiensis* (Ren et al., 2014; Kevbrin, 2019).

Другие промышленные объекты со щелочными значениями рН и потенциально рассматриваемые как среда обитания для алкалофильных микроорганизмов могут включать производство алюминия, а также добычу полезных ископаемых.

Еще одной искусственной средой обитания для алкалофильных микроорганизмов является процесс ферментации индиго. Краситель получают из листьев растений в два этапа обработки. Обе стадии выполняются микроорганизмами, где вторая стадия проводится анаэробно при рН > 10. Ферментационный бульон на разных стадиях при производстве индиго оказался плодородным материалом для выделения алкалофилов (Yumoto et al., 2004; Aino et al., 2010; Nishita et al., 2017; Okamoto et al., 2017; Aino et al., 2018).

Помимо производства индиго, существуют и другие технологические процессы с применением щелочных химикатов, которые сопровождаются появлением щелочных сточных вод и могут являться средой обитания

алкалофильных микроорганизмов. Например, алкалофильные виды были выделены из щелочного осадка сточных вод по производству безалкогольных напитков (Kulshreshtha et al., 2013), в сточных водах оливкового завода (Ntougias et al., 2001) и других процессах.

1.3. Алкалофильное и галофильное микробное сообщество

Экологические ниши с повышенной концентрацией соли и высокими значениями pH являются средой обитания для галофильных и алкалофильных микроорганизмов, перспективных для биотехнологического производства. Такие микроорганизмы могут обладать специфической физиологией, позволяющей им выживать в экстремальных условиях, что ведет к появлению определенного набора биохимических механизмов. Эти формы жизни могут иметь важное значение для применения в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве в качестве продуцентов известных веществ или как объектов принципиально новых биологически активных соединений (Oren, 2002).

Известно, что большинство биологических процессов протекает при нейтральных значениях pH, тогда как в окружающей среде этот показатель изменяется от сильнощелочных значений до экстремально низких. Помимо высокой щелочности, высокая степень минерализации также считается смертельной для большинства организмов, но эти среды часто населены живыми организмами и могут содержать большое количество биомассы функциональных и таксономически разнообразных сообществ (Jones et al., 1998; Naghoni et al., 2017).

Алкалофильные бактерии растут при щелочных значениях pH среды обитания и подразделяются на две физиологические группы: собственно алкалофилов и галоалкалофилов. Существуют различные классификации микроорганизмов по отношению к pH (Krulwich, Guffanti, 1989; Wiegel, 1998; Horikoshi, 1999). Horikoshi относит к алкалофильным микроорганизмам те бактерии, которые растут при pH от 8 и выше (обычно между 9 и 10), способны к культивированию при значениях pH > 11, но не растут или растут медленно

при значениях pH, близком к нейтральному. Облигатные алкалофилы не способны к росту при нейтральных значениях pH среды и обычно не растут при $pH < 8$. Алкалотолерантные микроорганизмы способны расти при щелочных значениях, но имеют оптимум для роста в кислой или нейтральной областях (Horikoshi, 1999; Grant and Jones, 2000).

Галоалкалофилам для оптимального роста необходимы не только щелочные условия, но и высокие концентрации NaCl.

От требовательности к содержанию хлорида натрия галофильные микроорганизмы классифицируются как слабо, умеренно и экстремально галофильные. Однако такая классификация является условной, поскольку концентрация хлорида натрия, необходимая для роста галофильных микроорганизмов, также зависит от температуры и pH среды. В зависимости от совокупности этих условий не исключено перемещение галофилов между группами (DasSarma, 2009).

Галоалкалофилы встречаются в экстремальных местах обитания, таких как содовые озера России, США, Восточной Африки. Сообщества микроорганизмов, обитающие при pH 10 и степени минерализации 10%, в основном состоят из алкалофильных цианобактерий. Алкалофильные микроорганизмы представлены различными видами аэробных (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*), анаэробных (*Clostridium thermohydrosulfurican*), термофильных (*Anaerobranca horikoshii*, *Clostridium paradoxum*) бактерий и гипертермофильных архей (*Thermococcus alcaliphilus*) (Krulwich et al. 1998; Заварзин и др., 1999). Галоалкалофильные микроорганизмы также представлены различными родами бактерий, археями, цианобактериями (*Synechocystis*, *Nostoc*), метаногенами (*Methanosalsus zhilinaeae*) и сероокисляющими микроорганизмами (Jones et al., 1998; Сорокин 2003).

1.3.1. Механизмы адаптации алкалофильных и галофильных бактерий к высокой щелочности и солености

Способность приспосабливаться к изменяющимся условиям среды – это одна из важнейших особенностей живых существ. Их распространение, численность и разнообразие в значительной мере определяются эффективностью адаптационных механизмов. Именно они позволяют микроорганизмам существовать в экстремальных условиях.

Для каждого представителя бактерий и архей существуют значения pH и степени минерализации, которые в данных условиях будут являться минимальным, оптимальным и максимальным (Рандагуруева и др., 2012). Алкалофильные и галофильные микроорганизмы обладают специализированной клеточной адаптацией для сохранения осмотического баланса в окружающей агрессивной среде, регулируют pH цитоплазмы, а также способны реализовывать ассоциированные с мембраной энергетические процессы в условиях низких концентраций протонов в окружающей среде.

Механизмы адаптаций к высоким значениям pH в среде

Концентрация ионов водорода в среде представляет важный экологический фактор, оказывающий действие на прокариотов. Щелочная среда обитания характеризуется стабильным pH выше 7 с высокой концентрацией карбонат-ионов. Алкалофильные микроорганизмы имеют эффективные механизмы поддержания внутриклеточного ионного гомеостаза, сохраняя близкие к нейтральным значения pH внутри клеток. Алкалофилы изменяют биохимические пути клетки, которые влияют на морфологическое устройство клеточной мембраны в условиях щелочного pH внешней среды. Основная адаптация к щелочной среде связана с физиологическими реакциями клетки, связанными с протонными и натриевыми насосами (Khan et al. 1992; Dhakar et al. 2016).

Алкалофильные бактерии растут с наибольшей скоростью при pH 8-11 и, в связи с этим обладают следующими особенностями:

1) Поддержание рН цитоплазмы на физиологическом уровне в щелочной среде. Это возможно благодаря наличию в цитоплазме буферных систем, обеспечивающих содержание в ней нуклеиновых кислот и белков, а также пулов глутамата и полиаминов. В основном буферную емкость обеспечивают фосфатные группы в составе РНК и ДНК (в нейтральном диапазоне) и основные или кислые боковые цепи аминокислот в составе белков при высоких и низких значениях рН.

2) Ферменты алкалофильных бактерий, которые секретируются в окружающую среду либо находятся на поверхности клетки, являются устойчивыми к денатурирующему действию щелочной среды.

3) Образование на мембране градиента рН с более низкими значениями внутри клетки последовательно нейтрализует мембранный потенциал, снижает протон-движущую силу, которая обеспечивает синтез АТФ при дыхании. Низкая проницаемость цитоплазматической мембраны для протонов и других ионов обеспечивает адаптацию при высоких значениях рН среды (Slonczewski, Foster 1996; Рандагуруева, 2012).

Энергетический метаболизм основан на переносе ионов в клетку с сопутствующим синтезом АТФ. Протон-движущая сила, создаваемая перекачкой протонов и дыханием, обеспечивает синтез АТФ как в нейтрофилах, так и в алкалофилах. Однако значения рН цитоплазмы в клетках алкалофильных микроорганизмов поддерживается в нейтральном диапазоне из-за действия Na^+/H^+ -антипортера. Соответственно, простой хемиосмотический механизм не может объяснить генерацию протон-движущей силы через цитоплазматическую мембрану у микроорганизмов, которые растут при щелочных значениях рН. Исследования биоэнергетики алкалофильных бактерий привели к открытию натриевого цикла, который эффективно заменяет протонный цикл (Skulachev, 1985; Unemoto et al., 1990; Guffanti et al., 1992). Низкая концентрация протонов в среде вызывает кинетические проблемы для всех систем, где они участвуют. Более серьезная проблема возникает, если внешняя концентрация $[\text{H}^+]$ ниже, чем внутренняя. В этой системе

электрический потенциал $\Delta\psi$ (с отрицательным зарядом внутри клетки) уравновешивается ΔpH с противоположным направлением. Протоны, выходящие из клетки, не способны совершать полезную работу при возвращении в цитоплазму, поскольку будут двигаться против градиента концентрации. Замещение протонов ионами натрия позволило решить эту проблему. Вторичный Na^+/H^+ - антипортер является главным механизмом, участвующим в экструзии Na^+ . Хемиосмотический обратный градиент ΔpH создается за счет электрохимического градиента Na^+ (Krulwich et al., 1990; Dhakar et al. 2016). Антипортер замещает ионы Na^+ на протоны через мембрану в электрогенных процессах, что приводит к выбросу ионов натрия за счет электрохимического протонного потенциала. Таким образом, алкалофильным микроорганизмам для поддержания протон-движущей силы необходима сбалансированная работа Na^+ -АТФазы и Na^+/H^+ , (K^+/H^+) антипортеров (Морозкина, 2010).

Помимо плазматической мембраны, клеточная стенка в клетках алкалофильных бактерий также выполняет защитную функцию в экстремальных условиях окружающей среды. В клеточной стенке содержатся компоненты с большим числом карбоксильных групп, отрицательный заряд которых отталкивает гидроксильные ионы и адсорбирует протоны и ионы натрия (Horikoshi, 1999; Морозкина, 2010).

Таким образом, преобладание низкого содержания основных аминокислот, увеличение количества отрицательно заряженных компонентов на клеточных стенках, мембранная адаптация с большим количеством ненасыщенных жирных кислот и экспрессия других вторичных антипортеров / симпортеров были зарегистрированы как стратегия выживания при высоком рН (Horikoshi et al., 2011; Dhakar et al., 2016). Большинство описанных в настоящее время алкалофильных/алкалотолерантных аэробных видов относятся к роду *Bacillus* (Sarkar, 1991; Fritze, 1996).

Механизмы адаптации к высокой солености

Помимо щелочной среды, микроорганизмы также подвергаются воздействию высоких концентраций соли. Жизнь бактерий при высокой минерализации менее «выгодна» с точки зрения энергетики. Поскольку высокие концентрации солей приводят к потерям воды в процессе осмоса, микроорганизмам для выживания в условиях солевого стресса необходимо поддерживать внутри клеток высокое осмотическое давление (Ogen, 1999). Бактерии, которые не приспособлены к сильно засоленной среде, будут терять воду, в результате чего клетки будут усыхать, что приведет к утрате клеточной структуры и функции (Рис. 2а).

Галофильные микроорганизмы способны адаптироваться к высокому содержанию солей в окружающей среде путем увеличения осмотического давления в цитоплазме до сопоставимого с внешней средой, что позволяет избежать чрезмерную потерю воды клеткой следующими способами:

- 1) путем производства совместимых растворенных органических веществ – осмопротекторов (Рис. 2б).
- 2) достижением равновесного состояния, при котором общая концентрация соли в клетках совпадает с концентрацией в окружающей среде (Рис. 2в) (Морозкина и др., 2010; Рандагуруева и др., 2012; Edbeib et al., 2016).

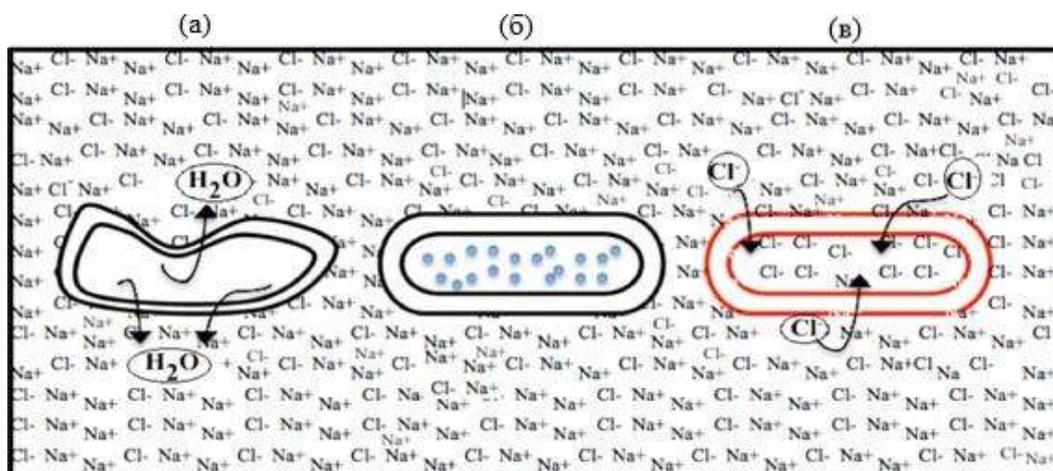


Рисунок 2 – Адаптация галофильных бактерий к высокой концентрации соли: а) не галофильная бактерия; б) умеренная галофильная бактерия; в) экстремальная галофильная бактерия (Edbeib et al., 2016).

Большинство галофильных и галотолерантных микроорганизмов решают проблему осмолярности за счет поддержания высоких внутриклеточных концентраций органических осморегуляторов, что требует значительных затрат энергии (стратегия «совместимых регуляторов») (Detkova, Pusheva, 2006). То есть происходит активное удаление солей из цитоплазмы, а тургорное давление создается за счет накопления органических молекул.

Однако две специализированные группы микроорганизмов – галофильные археи *Halobacteriales* и анаэробные галофильные бактерии *Haloanaerobiales* – не синтезируют осморегуляторы. Они накапливают соль в цитоплазме и содержат высокие (молярные) концентрации KCl внутри клеток. Бактерии аккумулируют Na⁺ (до 1 М) и K⁺ (до 4-5 М) для поддержания внутриклеточного тургора, а их белки адаптированы к таким высоким концентрациям соли (стратегия «соль внутри») (Деткова, Болтянская, 2007). Например, внутриклеточная концентрация ионов K⁺ в клетках *Natroniella acetigena* составляет порядка 0,9 М, что на несколько порядков превышает его содержание в среде (Ventosa et al., 1998). Электрохимический градиент протонов ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) является основным источником энергии для экстррузии Na⁺ и накопления K⁺ внутри клеток большинства галофилов. Градиент образуется либо за счет переноса электронов в дыхательной цепи, либо за счет АТФ, который синтезируется путем фосфорилирования субстрата и преобразуется с помощью мембран-связанной АТФазы (F-тип H⁺- АТФазы у бактерий и A-тип H⁺- АТФазы у галофильных археобактерий). Кроме того, может генерироваться с помощью световой энергии в биоэнергетическом процессе с участием бактериородопсина. Градиент натрия ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$) образуется за счет протонного градиента с помощью электронейтральных или электрогенных Na⁺/H⁺ антипортеров. Он может действовать как движущая сила некоторых эндергонических процессов в клетке (Деткова, Болтянская, 2007).

У галофильных микроорганизмов белки и клеточные компоненты адаптированы к высоким концентрациям солей, а многие ферментативные реакции зависят от высоких концентраций ионов K⁺ и устойчивы к NaCl

(Zhilina et al., 1996; Oren, 2002). В белках осмоадаптированных микроорганизмов преобладают остатки кислых аминокислот (глутаминовой и аспарагиновой), содержание остатков гидрофобных аминокислот незначительно, как правило они заменены на остатки серина и треонина (Деткова, 2006; Морозкина, 2010). Остатки кислых аминокислот, основная часть которых находится на поверхности белковой глобулы, высоко гидратированы, что значительно повышает гидрофильность белка, предотвращая процессы конгломерации.

При накоплении высоких концентраций осмолитов в клетке не происходит синтеза специальных адаптированных белков, а большинство галофильных и галотолерантных микроорганизмов поддерживают осмотический баланс с помощью синтеза или транспорта из внешней среды высокомолекулярных спиртов (глицерин, арабит), сахаров и их производных (сахароза, трегалоза, гликозилглицерин), аминокислот и их производных, а также четырехзамещенных аминов (глицин-бетаин, эктоин, гидроксiekтоин). Эти низкомолекулярные компоненты в высоких концентрациях хорошо растворимы в воде и, как правило, либо не заряжены, либо являются цвиттерионами при физиологических значениях pH (Oren, 1999; Болтянская, 2005). Количество синтезируемых молекул зависит от концентрации солей в окружающей среде. Как правило, микроорганизмы, реализующие стратегию «совместимые регуляторы», поддерживают низкие или умеренные внутриклеточные концентрации ионов Na^+ , K^+ и Cl^- (Gandbhir et al., 1995). У галофильных бактерий вывод ионов Na^+ из клеток осуществляется при помощи Na^+/H^+ - антипортов, использующих протонный электрохимический градиент в качестве движущей силы.

Некоторые бактерии, накапливающие органические молекулы, могут содержать и молярные внутриклеточные концентрации Na^+ и K^+ , используя сочетание двух способов адаптации к высоким концентрациям солей. При невысоких концентрациях соли в среде (не более 0,5 М) у галофильного штамма *Halomonas elongata* наблюдается накопление ионов калия в

цитоплазме, тогда как при увеличении солености среды основным осмолитом становится эктоин (Морозкина, 2010). Внутриклеточные белки этого галофила содержат больше остатков кислых аминокислот, по сравнению с не галофильными штаммами, что также указывает на сочетание двух способов адаптации (Gandbhir et al., 1995).

С развитием молекулярно-генетических методов было показано, что у прокариотов имеются гены, которые отвечают за функционирование нескольких групп трансмембранных антипортерных белков Na^+ (Li^+)/ H^+ . Антипортеры Na^+ (Li^+)/ H^+ играют важную роль в поддержании цитоплазматического гомеостаза Na^+ и высоких значений pH и подразделяются на два основных класса в зависимости от количества субъединиц (Yang et al., 2006). Первый класс кодируется 10 семействами единичных генов, такими как *nhaA*, *nhaB*, *nhaC*, *nhaD*, *napA*, *NhaP*, *mleN*, *nhaG*, *nhaK* и *nhaH*. Второй класс, содержащий несколько субъединиц, кодируется мультицистронным опероном (функциональная единица генома), таким как *mrp*, *mnh*, *pha* и *sha* (Meng et al., 2014; Zhang et al., 2014). Kopejtko и соавторы обнаружили, что у всех галоалкалофильных штаммов присутствует ген *mrpB*, кодирующий субъединицу В антипортера Na^+ (Li^+)/ H^+ MRP. Этот ген отсутствует у всех неалкалофильных штаммов, что указывает на его важность для адаптации к высоким значениям pH (Kopejtko et al., 2018). Было показано, что у штаммов *Alkalimonas amylolytica* и *Halobacillus dabanensis* присутствует ген *nhaD*, который поддерживает активность антипортера Na^+ (Li^+)/ H^+ в диапазоне концентраций Na^+ от 6 до 50 г/л с оптимальным значением 35 г/л (Yang et al., 2006; Liu et al., 2005).

1.3.2. Применение алкалофильных и галофильных бактерий в биотехнологии

Экстремофильные микроорганизмы и продуцируемые ими соединения являются объектом постоянного интереса. Уникальные физиологические и метаболические адаптации этих микроорганизмов позволяют производить с их

помощью широкий спектр химических соединений пищевого, медицинского и технического назначения, находящих применение в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, медицине, фармакологии, полимерной, текстильной, бумажной, горнодобывающей и других отраслях (Margesin, Schinner, 2001; DasSarma et al., 2009; Litchfield, 2011; Yin et al., 2001; Charlesworth, Burns, 2015; Waditee-Sirisattha et al., 2016; Singh, Singh, 2017; Zhang et al., 2018). Поиск и разработка новых продуктов микробного происхождения, которые могут функционировать в экстремальных условиях окружающей среды, привлекают пристальное внимание научных сообществ в последние годы.

Совместимые растворенные вещества. Данные вещества поддерживают клетку галотолерантного/галофильного организма в состоянии положительного водного баланса и совместимы с клеточным метаболизмом. Эти низкомолекулярные вещества являются отличными стабилизаторами и представляют собой водорастворимые сахара или полиолы, аминокислоты или их производные (Ventosa et al., 1995, Рандагурева, 2012). Интерес для биотехнологии совместимых растворенных веществ заключается в качестве стабилизаторов биомолекул (ферментов, ДНК, мембран) и целых клеток. Одним из самых распространенных осмопротекторов является эктоин. Экстремофильные бактерии вырабатывают его в цитоплазме в ответ на осмотический стресс, а также для защиты биомолекул в клетке. Эктоин используют в качестве стабилизатора в полимеразной цепной реакции. Также эктоин и его производные применяются в фармацевтических препаратах и в косметике. Осмопротектор входит в состав препаратов против воспалительных заболеваний кожи и слизистых оболочек, так как он обладает противовоспалительным действием (Sauer et al., 1998; Margesin et al., 2001).

Для производства эктоина, синтезируемого галофильными бактериями, разработана технология, получившая название «процесса непрерывного бактериального доения». *Halomonas elongata* выращивают при 15-20% NaCl в среде, что приводит к внутриклеточному аккумулярованию эктоина, затем

биомасса подвергается осмотическому шоку, что приводит к открытию механочувствительных каналов внутренней мембраны. Осмопротектор выходит в среду культивирования, биомасса возвращается в ферментер для следующего раунда ферментации, а раствор продукта очищают электродиализом, хроматографией, фильтрацией, выпариванием и кристаллизацией. Промышленные процессы массового производства эктоина и гидроксидэктоина были разработаны с использованием *Halomonas elongata* и *Marinococcus* sp. M52 соответственно (Oren, 2010).

Бактериородопсин. Некоторые галофильные и галоалкалофильные бактерии содержат мембрансвязанные ретинальные пигменты: бактериородопсин и галородопсин. Уникальные свойства бактериородопсина как высокоэффективной протонной помпы, поглощающей видимый свет, стабильной в условиях высокой солености, в широком диапазоне рН и при высоких температурах делают данный белок перспективной основой для создания широкого спектра биоэлектронных и оптических устройств. Бактериородопсин обладает термодинамической и фотохимической стабильностью, поэтому может быть полезен в качестве специального модулятора света, искусственной сетчатки, нейронных сетевых оптических вычислительных устройств и объемных и ассоциативных запоминающих устройств (Purohit et al., 2013; Рандагуруева, 2012). Бактериородопсин также применяется в создании сенсibilизированных красителем солнечных батарей, или ячеек Гретцеля (Grätzel, 2003; Nazeeruddin et al., 2011). Благодаря высокой чувствительности бактериородопсина к внешним раздражителям различной природы, пленки на его основе имеют большой потенциал для использования их в качестве чувствительных элементов биосенсоров. Это могут быть фотодетекторы, которые демонстрируют высокую чувствительность и быстрое время реагирования, а созданные на их основе фотоматрицы имеют высокую разрешающую способность (Каленов, 2020).

Биосурфактанты и экзополисахариды. Экстремофильные микроорганизмы являются перспективными продуцентами биополимеров. Биосурфактанты улучшают восстановление загрязненной нефтью почвы и воды. Уменьшая поверхностное натяжение, они повышают растворимость и, следовательно, подвижность гидрофобных углеводов, что может способствовать их деградации (Singh et al., 2004). Следовательно, биоповерхностно-активные вещества могут быть использованы для восстановления засоленных сред, загрязненных нефтью.

Широкое применение в пищевой, косметической, фармацевтической и медицинской промышленности обрели экзополисахариды галофильных и алкалофильных микроорганизмов. Синтезируемые микроорганизмами экзополисахариды отличаются между собой строением, а также физическими и химическими свойствами и используются в качестве загустителей и эмульгаторов не только пищевого и медицинского назначения, но и в процессах газо- и нефтедобычи (Margesin et al., 2001; DasSarma et al., 2009; Poli et al., 2010; Satpute et al., 2010; Litchfield et al., 2011; Poli et al., 2011; Yin et al., 2015; Biswas et al., 2017; Singh, Singh, 2017; Zhang et al., 2018; Pirog et al., 2018; Wang et al., 2019).

Полигидроксиалканоаты (ПГА) продуцируются бактериями, в том числе и галофильными микроорганизмами в качестве запасного источника углерода и энергии (Hou et al., 2000; Quillaguamán et al., 2010; Poli et al., 2011; Singh, Singh, 2017; Zhang et al., 2018; Sedlacek et al., 2019). ПГА – это биоразлагаемые полимеры, свойства которых сопоставимы со многими широко используемыми в современной промышленности пластиками (Bugnicourt et al., 2014). Микроорганизмы, продуцирующие ПГА, способны осуществлять их биосинтез на основе различных субстратов от сахаров и спиртов до богатых углеродом промышленных стоков (Lageveen et al., 1988; Eggink et al., 1992; Fukui, Doi, 1998; Peter et al., 1999; Yu, 2007). Благодаря своей экологичности и дешевизне ПГА становятся перспективными пластиками в производстве упаковочных материалов, медицинских имплантатов, текстиля и др. (Philip et al., 2007;

Pramanik et al., 2015; Lim et al., 2017; Chiulan et al., 2018; Zhang et al., 2018). Данные полиэферы также могут быть использованы для таргетированной доставки лекарственных средств внутрь организма, так как в клетках микроорганизмов они присутствуют в липидно-белковой оболочке (Zhang et al., 2018). Также данный класс биополимеров перспективен в качестве нового источника биотоплива (Zhang et al., 2009; Gao et al., 2011). Применение галофильных бактерий в промышленной биотехнологии имеет ряд преимуществ: при культивировании этих бактерий предотвращается контаминация сред из-за высокой солености, галофилы потребляют широкий спектр субстратов и их клетки легко разрушить (Yin et al., 2015).

Гидролитические ферменты. Галоалкалофилы обладают рядом ферментов, которые помогают им выживать в условиях высокой минерализации и щелочного pH. Уникальные свойства экстремозимов заключаются в их устойчивости к экстремальным физико-химическим условиям (Antranikian et al., 2005; Ferrer et al., 2011; Purohit, Singh, 2011). В связи с этим галоалкалофильные ферменты интересны для биотехнологического применения в неблагоприятных условиях (Yin et al., 2015; Karay et al., 2018).

Протеазы (КФ 3.4) являются одними из наиболее изученных ферментов и составляют важную группу среди промышленных ферментов. Их продажи составляют порядка 60% всего рынка ферментов, из которых 25% – это щелочные протеазы (Sarethy et al., 2011). Коммерчески протеазы находят широкое применение в качестве компонентов моющих средств, растворов для контактных линз, в производстве сыра и переработке мясных продуктов (Gupta et al., 2002; Sharma et al., 2017).

Амилазы (КФ 3.2.1.1) – класс гидролаз, катализирующих разложение крахмала с образованием декстринов или глюкоолигосахаридов. Амилазы используются преимущественно в пищевой промышленности: в хлебопечении, в переработке фруктовых соков, а также в обработке бумаги и текстиля, составляя около 25% объема используемых промышленных ферментов.

Щелочные амилазы сохраняют активность в диапазоне рН 8–11 и применяются в производстве моющих средств (Sarethy et al., 2011).

Целлюлазы (КФ 3.2.1.4) применяются для модификации целлюлозосодержащих отходов (Jagtap, Rao, 2005). Целлюлазы, полученные из галофильных микроорганизмов, по своим физико-химическим параметрам являются солеустойчивыми, термостабильными и щелочеустойчивыми. Благодаря своим уникальным свойствам они входят в состав моющих средств и используются в текстильной и пищевой промышленности (Anish et al., 2007; Новожилов, Пошина, 2011).

Бактериальные липазы (КФ 3.1.1) и эстеразы используются во многих биокаталитических процессах. Они активны по отношению к широкому ряду субстратов, стабильны в органических растворителях, не требуют присутствия кофакторов. Липазы широко используются в биотехнологии, включая синтез биополимеров, биодизельного топлива, фармацевтических препаратов и других соединений, биодеструкцию техногенных загрязнителей (Безбородов, Загустина, 2014), а липазы, устойчивые в щелочной среде, в основном находят применение в производстве моющих средств (Hasan et al., 2010). Эстеразы гидролизуют водорастворимые сложные эфиры и применяются для стереоспецифического гидролиза, трансэтерификации, биосинтеза сложных эфиров и других органических веществ (Amoozegar et al., 2015).

Пищевая биотехнология. Галоалкалофильные микроорганизмы играют важную роль в различных процессах ферментации, происходящих при щелочных значениях рН и в присутствии соли. Большое количество соли используется при приготовлении некоторых видов традиционно ферментированных продуктов. Такие соленые продукты особенно популярны на Дальнем Востоке (Thongthai, Suntainalert 1991; Akolkar et al., 2010). Исследование микробных сообществ, участвующих в производстве кимчи, традиционной корейской еды, основанной на ферментации овощей, показало присутствие очень разнообразного сообщества галофильных архей,

молочнокислых бактерий и других представителей домена *Bacteria* (Oren, 2010).

Алкалофилы и галофилы являются уникальными микроорганизмами с большим потенциалом для биотехнологического использования. При всех перечисленных преимуществах использования галоалкалофилов в промышленных процессах есть и недостатки. При массовом культивировании аэробных бактерий низкая растворимость газов в концентрированных рассолах может серьезно ограничить поступление кислорода в культуры. Также следует учитывать агрессивный характер солей при строительстве реакторов с металлическими частями, контактирующими с окружающей средой.

1.4 Гидролитические ферменты алкалофильных и галофильных гидролитических бактерий: физиологические функции и применение

Организмы, которые процветают в экстремально щелочной среде, дают нам возможность оценить диапазон адаптаций, которые в процессе эволюции отражаются на фундаментальных биологических процессах. Эти организмы представляют собой уникальные модели для изучения стабилизации биомолекул в экстремальных условиях. Алкалофильные и галофильные микроорганизмы востребованы в различных областях биотехнологии. Биоэнергетика, с которой сталкиваются алкалофилы и галофилы при поддержании гомеостаза pH в сильнощелочной среде, а также сохранение жизнедеятельности при высокой степени минерализации, все больше изучается в последние два десятилетия.

Успехи в применении биомолекул, которые продуцируются алкалофильными бактериями, в основном связаны с внедрением протеолитических ферментов, классифицируемых как сериновые протеазы, в индустрию моющих средств. С момента открытия этого фермента в 1970-х годах внимание было сосредоточено на алкалофильных ферментах, поэтому в течение нескольких лет стало доступно большое количество ферментов, таких как щелочная протеаза, амилаза, пектиназа, пуллуланаза, целлюлаза, альгиназа,

каталаза, РНКаза, ДНКаза, рестрикционный фермент, β 1,3-глюканаза, ксиланаза, α -галактозидаза, β -галактозидаза, пенициллиназа, мальтозодегидрогеназа, глюкозодегидрогеназа, уриказа, полиаминоксидаза, β -маннаназа и β -маннозидаза (Ulukanli, 2002). Было исследовано промышленное применение алкалофилов, а некоторые их ферменты были коммерциализированы. Из ферментов, доступных в настоящее время в промышленности, наиболее широко используются такие ферменты, как протеазы, целлюлазы, липазы, амилазы, и они по-прежнему остаются востребованными.

1.4.1 Липазы

Липазы осуществляют гидролиз триглицеридов с образованием жирных кислот и глицерина. Они также могут катализировать реакции обратной этерификации, образовывать глицериды из глицерина и жирных кислот. Многие липазы также участвуют в катализе реакций переэтерификации и энантиоселективных гидролизом. Данные ферменты осуществляют катализ в двухфазных системах на границе раздела водной и гидрофобной фаз. Липазы, катализирующие гидролиз фосфолипидов, называются фосфолипазами и делятся на четыре типа в зависимости от типа гидролизуемой эфирной связи.

1) Фосфолипазы А и В, которые осуществляют гидролиз эфирных связей между остатками глицерина и жирных кислот. Фосфолипазы А отщепляют один из ацильных радикалов; фосфолипазы В (лизофосфолипазы) отщепляют оба ацильных радикала.

2) Фосфолипазы С гидролизуют эфирную связь между остатком глицерина и фосфатом полярной группы с образованием диацилглицерина и молекулы органического фосфата

3) Фосфолипазы D осуществляют гидролиз эфирной связи между фосфатом и остатком спирта, который образует радикал полярной группы фосфолипида.

Большинство коммерческих липаз получают из грибов (в основном *Rhizopus*, *Candida* и *Rhizomucor*) и бактерий (*Pseudomonas* и *Chromobacterium*) (Sarethy et al., 2011).

В основном, бактериальные липазы имеют оптимум активности в нейтральном или щелочном диапазоне pH (6.0–11). Например, щелочные липазы, выделенные из бактерий *Bacillus licheniformis* (Kaur et al., 2016), *Bacillus stratosphericus* L1 (Gricajeva et al., 2016), *Bacillus* sp. L2 (Shariff et al., 2011) имеют оптимум активности при pH от 9,0 до 11,0. Липазы *Bacillus stearothermophilus* SB-1, *Bacillus atrophaeus* SB-2 и *Bacillus licheniformis* SB-3 активны при pH 3,0-12,0 (Bradoo et al., 1999). Липазы, имеющие оптимум активности в кислой среде, встречаются намного реже (Самойлова, 2018).

Как и протеазы, липолитические ферменты крайне востребованы. Эти энзимы нашли широкое применение в пищевой, фармацевтической и химической промышленности. Липазы и эстеразы характеризуются как высоко регио- и хемоспецифичные ферменты, благодаря чему широко используются для осуществления процессов биохимического синтеза соединений медицинского и пищевого назначения, а также для синтеза биополимеров. Химический синтез часто проходит при высоких температурах, экстремальных значениях pH, а также проводится в средах с низкой активностью воды или в безводных средах. В данных условиях ферменты нейтрофилов теряют активность, тогда как экстремоферменты сохраняют активность как в щелочной среде и при высоких температурах, так и в средах, содержащих органические растворители, что способствует применению данных ферментов в качестве перспективных катализаторов во многих процессах химического синтеза (de Lourdes Moreno et al., 2013; Elleuche et al., 2014; de Lourdes Moreno et al., 2016; Amoozegar et al., 2017; Torregrosa-Crespo et al., 2017)

1.4.2. Амилазы

Амилазы представляют собой класс гидролаз, которые катализируют разложение крахмала с образованием декстринов или глюкоолигосахаридов

различной длины. Амилазы также являются наиболее распространенными и изученными в технологическом плане гликозил-гидролазами (гликозидазами). К этой группе ферментов относятся α -амилазы, β -амилазы и глюкоамилазы. В зависимости от механизма действия ферменты, гидролизующие крахмал, могут быть эндо- или экзодействующими.

Альфа-амилазы (КФ 3.2.1.1) представляют собой внеклеточные эндоамилазы, которые катализируют начальный гидролиз крахмала до более коротких олигосахаридов посредством расщепления α -1,4-гликозидных связей. Ни концевые остатки глюкозы, ни α -1,6-связи не могут расщепляться α -амилазой. Конечными продуктами действия α -амилазы являются олигосахариды различной длины с α -конфигурацией и α -предельные декстрины, которые представляют собой смесь мальтозы, мальтотриозы и разветвленных олигосахаридов из 6-8 единиц глюкозы, которые содержат как α -1,4 так и α -1,6-связи. Все α -амилазы относятся к металлоэнзимам, содержащим ионы кальция, полное удаление которого приводит к инаktivации фермента. Их свойства могут сильно отличаться в зависимости от вида микроорганизма по механизму воздействия на субстрат и по конечным продуктам, а также по оптимальным условиям для проявления максимальной активности.

Бета-амилаза (КФ 3.2.1.2) представляет собой экзофермент концевого действия, который гидролизует связь α -1,4 с нередуцирующего конца. Продуктом реакции является мальтоза, которая имеет β -конфигурацию. Этот фермент обходит α -1,6-связи разветвленных субстратов, продуцируя мальтозу и высокомолекулярные β -предельные декстрины. Для сравнения, глюкоамилаза (КФ 3.2.1.3), также известная как амилоглюкозидаза или γ -амилаза, медленно действует на α -1,4 связи α -глюканов с нередуцирующих концов, а также на связи α -1,6. Она предпочтительно разлагает полисахариды с высокой молекулярной массой. Эти ферменты гидролизуют крахмал с получением глюкозы с теоретическим выходом 100% (Kumar, Satyanarayana, 2004). Фермент содержит SH-группы и чувствителен к действию тяжелых металлов, а также

проявляет наибольшую стабильность при отсутствии ионов кальция. Свойства β -амилаз зависят от источников их выделения.

Амилазы имеют бактериальное, архейное и эукариотическое происхождение. В промышленных целях используются бактериальные амилазы. Их преимуществом является низкая стоимость, объем, небольшое время производства, а также простой процесс модификации и оптимизации. В зависимости от продуцента и вида фермента амилитические ферменты показывают большую вариабельность оптимальных значений физико-химических параметров, необходимых для осуществления катализа. Бактериальные амилазы имеют разную оптимальную температуру, колеблющуюся в диапазоне от 22 до 70°C (Niyonzima, More 2014). Однако, для видов *Bacillus* был зарегистрирован более широкий диапазон оптимальной температуры 0–90°C (Hmidet et al., 2009). Так для *Bacillus* sp. AB04 (Behel et al., 2006) и *Bacillus* sp. (Nusrat, Rahman, 2007) оптимальная температура составляет 37 и 40°C. Диапазон pH активности варьирует между pH 4–10, с оптимум около pH 8. Приводится много данных для ферментов с оптимальным диапазоном pH 7,5–8,5 (Kiran, Chandra, 2008; Dahiya, Rathi, 2015; de Carvalho et al., 2008), pH 9,0 (Ghorbel et al., 2009; Roy et al., 2012), pH 10.0 (Saxena et al., 2007; Roohi et al., 2013) и pH 11,0 (Arikan, 2008).

Среди промышленных биокатализаторов ферменты, гидролизующие крахмал, находят применение в производстве этанола, кукурузного сиропа с высоким содержанием фруктозы, а также в производстве моющих средств и выпечки. Промышленно важными штаммами являются представители рода *Bacillus*, которые широко используются для получения альфа-амилазы: *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* и *B. cycleans*.

Амилазы галоалкалофильных микроорганизмов способны в большей степени повысить эффективность и ускорить технологические процессы благодаря своим уникальным свойствам, а именно устойчивости в высокоминерализованных и щелочных средах.

1.4.3. Протеазы

Протеазы (пептидазы или протеолитические ферменты, КФ 3.4) обнаружены во всех живых организмах и необходимы для роста и дифференцировки клеток. Они составляют большую группу гидролитических ферментов, которые катализируют реакцию расщепления пептидной связи в белках. Данный класс включает в себя 13 подклассов протеаз, которые характеризуются различными свойствами и механизмом действия. Все 13 подклассов можно объединить в две большие группы в соответствии с местом расщепления пептидной связи: экзопептидазы (КФ 3.4.11-19) и эндопептидазы (КФ 3.4.21-99).

Экзопептидазы действуют только вблизи концов полипептидных цепей, расщепляя крайнюю с N- или C-конца пептидную связь. К экзопептидазам относятся амино- и карбоксипептидазы. Аминопептидазы (3.4.14) действуют на свободном N-конце полипептидной цепи и высвобождают один аминокислотный остаток, дипептид или трипептид. Карбоксипептидазы (3.4.12) действуют на C-концах полипептидной цепи и высвобождают одну аминокислоту или дипептид. Карбоксипептидазы можно разделить на три основные группы: сериновые пептидазы (КФ 2.4.16), металлопептидазы (КФ 2.4.17) и цистеиновые пептидазы (КФ 2.4.18), исходя из природы аминокислотных остатков в активном центре фермента.

Эндопептидазы включают в себя аспартильные, цистеиновые, сериновые и металлопептидазы (Rawlings et al., 2011; Rawlings et al., 2013), и характеризуются действием на пептидные связи во внутренних областях полипептидной цепи. Для сериновых протеаз характерно наличие одного остатка серина в активном центре. Как правило, они активны при нейтральных и щелочных значениях pH, где оптимальным значением является диапазон 7-11, и находят применение в ряде отраслей промышленности (Gupta et al., 2002). Протеазы аспарагиновой кислоты широко известны как кислые протеазы. Их каталитическая активность зависит от остатков аспарагиновой кислоты.

Активность всех цистеиновых протеаз зависит от каталитической диады, состоящей из цистеина и гистидина. Металлопротеазы – это самый разнообразный из каталитических типов протеаз. Им свойственна потребность в ионе двухвалентного металла для их активности (Rao et al., 1998; Vranova et al., 2013).

Также протеолитические ферменты можно классифицировать в соответствии с диапазоном pH, в котором они обладают более высокой активностью: кислые (pH 2,0–6,0), нейтральные (pH 6,0–8,0) и щелочные (pH 8,0–13,0) (Gupta et al., 2002; Rao et al., 1998; Sabotic, Kos, 2012).

Микроорганизмы вырабатывают большое количество протеаз, которые бывают как внутриклеточными, так и внеклеточными. Внутриклеточные протеазы важны для различных клеточных и метаболических процессов, таких как споруляция и дифференцировка, обмен белков, созревание ферментов и гормонов и поддержание пула клеточных белков. Внеклеточные протеазы важны для гидролиза белков в среде, что позволяет клетке использовать его продукты (Souza et al., 2015). Они также имеют широкую субстратную специфичность и могут разрушать большинство неструктурных белков (альбумин, казеин, инсулин, гемоглобин).

Факторы окружающей среды оказывают влияние на внеклеточную активность пептидаз, поэтому внеклеточные протеазы должны быть адаптированы к физико-химическим параметрам окружающей среды.

Концентрация ионов водорода в среде меняет состояние ионизации аминокислот и трехмерной структуры активного центра фермента. От pH среды зависит доступность питательных веществ. Концентрация ионов водорода оказывает влияние на метаболические реакции, на генетический регуляторный механизм и изменение диффузионного барьера клеточных мембран (Mokashe et al., 2018). Отклонения от оптимальных значений pH приводят к снижению активности фермента (Chróst, 1991; Cunha et al., 2010). Для синтеза пептидаз галоалкалофильных бактерий оптимальны значения pH в диапазоне от 7 до 11 (Эрдынеева и др., 2018).

Галотолерантные протеазы способны выдерживать высокие концентрации солей. Большинство внеклеточных галотолерантных пептидаз – это металлопротеазы и сериновые протеазы. Хотя галотолерантные ферменты обычно продуцируются галотолерантными микроорганизмами, иногда их также продуцируют и нейтрофилы. Галотолерантные протеазы способны противостоять дефициту воды, что дает им возможность оставаться активными в органических растворителях. Солеустойчивые энзимы играют ключевую роль во многих процессах, требующих различного содержания хлорида натрия в среде – от низких до высоких концентраций. К таким процессам относятся синтез пептидов, разработка детергентов, применение в рыбной и мясной промышленности (Madern et al., 2000).

Протеолитические ферменты, полученные из галофильных микробов, выполняют каталитическую функцию *in vivo* и *in vitro* в присутствии 4-5 М NaCl, и инактивируются или денатурируются в отсутствие или при низких концентрациях соли. Большинство галофильных протеаз принадлежит к группе сериновых пептидаз.

Аминокислотная последовательность галоалкалофильных ферментов, необходимая для достижения активной конформации, изменяется по сравнению с ферментами нейтрофилов. Белки галоалкалофилов содержат почти на 20% больше аминокислотных остатков (аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота), локализованных в виде кластеров на поверхности белка, меньшее количество остатков лизина и большое количество гидрофобных (аланин и глицин) и полярных остатков (серин и треонин). Измененная аминокислотная последовательность заключается в распределении нескольких отрицательных зарядов на поверхности галоалкалофильных белков, что снижает гидрофобность и их склонность к агрегации при высоком содержании соли.

В коммерческих целях протеазы находят основное применение в качестве компонентов моющих средств, растворов для контактных линз, в производстве сыра, переработке мясных продуктов и для извлечения серебра из фотопленок. Использование этих ферментов также способствовало повышению

экологической устойчивости производственных процессов за счет снижения образования токсичных отходов. Протеазы, обладающие широкой субстратной специфичностью, а также эффективно функционирующие при щелочных значениях pH и высокой температуре, являются востребованными в качестве компонентов детергентных составов, поскольку они лучше выдерживают жесткие промышленные производственные процессы. Желательно, чтобы протеазы не теряли своей активности в присутствии других компонентов, входящих в состав моющего средства, таких как поверхностно-активные вещества или другие добавки. Коммерчески используемые детергентные протеазы представляют собой сериновые протеазы, полученные от представителей *Bacillus* (Mokashe et al., 2017).

1.4.4. Целлюлазы

Целлюлоза – основной компонент растительного сырья. Галоалкалофильные микроорганизмы также являются продуцентами целлюлаз (КФ 3.2.1.4), которые осуществляют гидролиз гликозидных связей в молекулах целлюлозы, лихенина и других полисахаридов аналогичного строения. Целлюлазы разделяют на три группы: эндоцеллюлазы, экзоцеллюлазы и β -глюкозидазы, которые посредством совместного действия с рядом других ферментов осуществляют полный гидролиз целлюлозы с образованием глюкозы (Каленов, 2020).

Эндоцеллюлаза разрывает β -1,4-связи внутри макромолекулы целлюлозы с образованием олигосахаридов. Экзоцеллюлаза отщепляет от концов цепочки целлюлозы дисахарид целлобиозу, β -глюкозидаза осуществляет гидролиз целлобиозы с образованием глюкозы.

Целлюлозолитические ферменты нашли широкое применение в пищевой, химической, фармацевтической, текстильной, бумажной промышленности и в сельском хозяйстве. Целлюлазы применяют для осахаривания растительного сырья для производства глюкозы; для размягчения растительных волокон в текстильной промышленности, а также используют как активный компонент

моющих средств. Энзимы экстремофилов являются эффективными ферментами в технологических процессах, протекающих при экстремальных условиях среды, которые являются неоптимальными для активности ферментов нейтрофилов. Следовательно, экстремофильные микроорганизмы могут быть использованы для биоремедиации промышленных стоков и твердых отходов с высоким содержанием целлюлозы как продуценты экстремозимов.

Микробиологические исследования высокоминерализованных и щелочных сред демонстрируют большое разнообразие микроорганизмов, обладающих целлюлозолитической активностью. Деструкция целлюлозы является важным процессом в функционировании микробного сообщества. Целлюлолитики находятся в начале трофической цепи, что способствует дальнейшему развитию первичных анаэробов в сообществе. Изоляты, выделенные из экстремальных ниш с высоким содержанием соли и щелочностью, демонстрировали активность целлюлазы в диапазоне солености 0–4,3 М NaCl; температуры 35–60°C, pH 7–10. Так у галоалкалофильной бактерии *Bacillus* sp. BG-CS10, продуцирующей эндоцеллюлазу, которая проявляет максимальную активность в среде с высокой осмолярностью, отмечен оптимум действия фермента в условиях pH 10, при температуре 55°C и в 2,5 М растворе хлорида натрия (Zhang et al., 2012). *Halomonas* sp. PS47 является продуцентом стабильной целлюлазы в 0–4 М растворах хлорида натрия, оптимально активной в условиях pH 7,1, 50°C, 0–1 М NaCl (Shivanand et al., 2013).

Таким образом, на стыке экологии, микробиологии и молекулярной биологии проводятся интенсивные исследования галофильных и алкалофильных микробных сообществ. Показано, что экстремальные среды обитания, характеризующиеся чрезвычайно высокими или низкими показателями pH, температуры, минерализации, содержат удивительно разнообразные микробные сообщества, которые хорошо адаптированы к этим условиям. Помимо интереса к поиску и идентификации экстремальных бактерий, актуальным стало исследование механизмов биохимической

адаптации на молекулярном, клеточном и системном уровнях. Также происходит активное внедрение как самих экстремофильных микроорганизмов, так и продуцируемых ими экстремозимов и других биомолекул в производство.

В настоящее время имеется большое количество информации о штаммах-продуцентах гидролитических ферментов, многие из которых успешно внедрены в производство. По-прежнему целевыми биомолекулами, которые наиболее широко используются в биотехнологии, являются протеазы, липазы, целлюлазы и амилазы. Наименее развитой областью остается применение экстремофилов в процессах биоремедиации. Но на сегодняшний день до сих пор остается актуальным вопрос о поиске новых высокопродуктивных штаммов с широкой субстратной специфичностью и стабильностью в экстремальных условиях. Важным фактором, определяющим высокий уровень продуктивности штамма, является регуляция биосинтеза этих веществ у микроорганизмов. Для этого необходимо изучение физиологических потребностей штаммов-продуцентов и установление оптимальных условий для их культивирования.

Следует отметить, что микроорганизмы, выделенные из экстремальных сред, актуальны не только для практического применения, но также являются модельной системой при изучении механизмов эволюции, стабилизации и активации ферментов, исследовании структурно-функциональных взаимодействий белков в экстремальных условиях, механизмов адаптации клетки к экстремальным факторам.

Помимо этого, изучение алкалофильных микроорганизмов, обитающих в водоемах с высокой щелочностью, имеет фундаментальное значение, главным образом в плане изучения эволюционных связей и поисков аналогов древних обитателей континентов. Микрофлора содовых озер естественного происхождения активно изучается отечественными микробиологами. Однако микробным сообществам щелочных биотопов антропогенного происхождения уделяется значительно меньшее внимание, хотя в данном случае интерес

представляет микробное сообщество в плане вторичной адаптации к таким факторам, как защелачивание и высокая концентрация солей.

В то же время, характеристика таких организмов, их эволюционных связей и среды обитания становится важной для понимания того, как может развиваться жизнь в других местах во Вселенной. Экстремофилы живут в условиях, близких к тем, которые могут быть найдены на других планетах. Результаты, полученные при изучении экстремофилов, позволят идентифицировать потенциальные среды, в которых могут развиваться живые организмы, что делает более реалистичной надежду найти внеземную жизнь.

Несмотря на огромный интерес к экстремофилам и широкий спектр работ, ведущихся в этой области, полученных данных все еще недостаточно для создания полной картины механизмов, обеспечивающих толерантность и адаптацию микроорганизмов к различным факторам стресса.

При анализе литературных данных выявлен недостаток информации о филогенетическом разнообразии микробного сообщества содовых шламоохранилищ и отсутствие сведений об изменении микробного сообщества при восстановлении земель после осушения такого рода искусственных щелочных водоемов. Необходимость поиска штаммов-продуцентов гидролитических ферментов, устойчивых в высокоминерализованной щелочной среде, а также фундаментальный интерес в области получения новых сведений об адаптации бактерий к щелочной высокоминерализованной среде, обусловили актуальность настоящей диссертационной работы.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект изучения микробного разнообразия

Изучение филогенетического разнообразия домена *Bacteria* и выделение бактериальных культур проводили на территории содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод», расположенного на северо-западной окраине г. Березники Пермского края на левом берегу Камского водохранилища (59,44° с.ш., 56,72° в.д. - 59,43° с.ш., 56,75° в.д.) (рис.3).

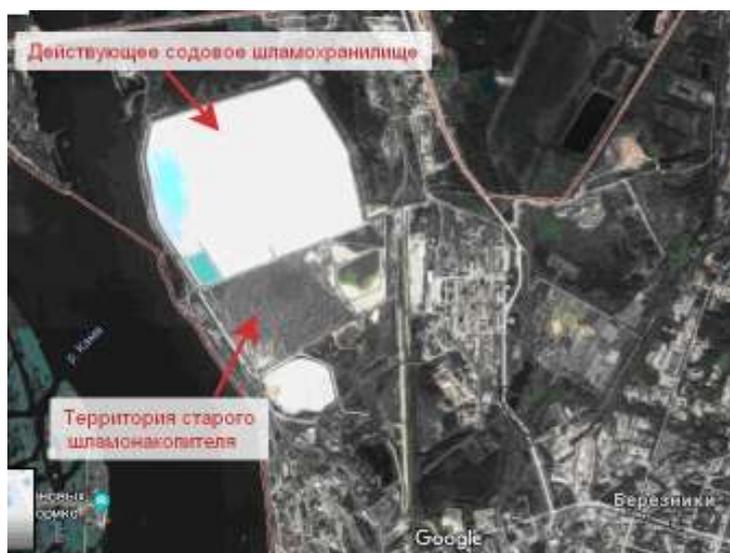


Рисунок 3 – Спутниковая карта шламохранилища Березниковского содового завода (URL: <https://www.google.com/maps/place/Березники>)

«Березниковский содовый завод» – российское предприятие химической промышленности, крупнейший производитель кальцинированной соды марок Б, А и карбонатных пород. Производство кальцинированной соды марки Б осуществляется аммиачным способом по методу Сольве путем насыщения водного раствора хлорида натрия аммиаком и углекислым газом с образованием бикарбоната натрия, который в дальнейшем подвергается кальцинации, при которой образуется карбонат натрия – сода кальцинированная.

Производство включает в себя следующие стадии:

1. Добыча и подготовка известняка

2. Обжиг известняка в известково-обжигательных печах с получением углекислого газа и извести.
3. Гашение извести с получением известкового молока;
4. Очистка раствора хлорида натрия от солей кальция и магния;
5. Абсорбция очищенного рассола аммиаком и частично углекислым газом с образованием аммонизированного рассола;
6. Карбонизация аммонизированного рассола с образованием суспензии бикарбоната натрия;
7. Фильтрация бикарбоната натрия;
8. Кальцинация бикарбоната натрия;
9. Регенерация аммиака и углекислого газа паром и известковым молоком.

Кальцинированная сода марки А производится моногидратным способом. Сода марки Б и деминерализованная вода являются сырьем для производства соды марки А. Процесс включает в себя две стадии:

1. Гидратация соды марки Б с образованием кристаллов моногидрата натрия;
2. Сушка моногидрата натрия, охлаждение и классификация.

Кроме кальцинированной соды на заводе производят технические моющие, чистящие средства; негашеную комовую известь; известковое молоко; флюсовые известняки и щебень различных фракций.

Твердые отходы и промышленные сточные воды, которые образуются при производстве, поступают в шламовый коллектор и в виде пульпы подаются в отстойник – шламонакопитель. Данная система имеет щелочную реакцию среды и высокую степень минерализации за счет содержания растворенных ионов (хлориды, сульфаты, натрий, калий, аммоний).

Отходы Березниковского содового завода складированы в действующей и старой картах шламонакопителя, которые ограничены дамбами из щебня и дресвы известняка, общая площадь которого составляет 244 км², а общий объем шлама превышает 10 млн м³ (Блинов и др., 2003).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Отбор проб

Отбор проб проводили в сентябре 2017 года на территории действующей и старой карты содового шламохранилища (рис. 4). Для исследований микробиоты в действующем шламонакопителе были отобраны пробы воды (дистиллерной жидкости), донных отложений (содового шлама), техногенного поверхностного образования в прибрежной зоне и техногенного поверхностного образования с ризосферой растений. В почвоподобных образованиях осушенного шламохранилища пробы отбирали с поверхности, а также на глубине 5 и 10 см (в точке 59,4288° с.ш., 56,7297° в.д.). Образцы хранили при температуре +4° С.



Рисунок 4 – Действующая (а) и старая карта (б) шламонакопителя АО «Березниковский содовый завод»

2.2.2. Физико-химические методы исследования

Элементный состав образцов определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6300 SHIMADZU (Япония). Извлечение водорастворимых форм соединений металлов из проб проводили следующим

образом: к 5 г почвы добавляли 120 мл бидистиллированной воды, тщательно перемешивая. Полученную суспензию почвы фильтровали через бумажный фильтр «белая лента», а затем полученный фильтрат выпаривали до объема 25 мл. К полученному раствору добавляли 2–3 капли концентрированной HNO_3 . Кислотную экстракцию металлов проводили добавлением к 2 г почвы 10 мл 5 М HNO_3 , колбы с обратными холодильниками выдерживали в течение трех часов на кипящей водяной бане, пробы охлаждали и отфильтровывали в мерные колбы на 50 мл через бумажный фильтр «Белая лента» и доводили объем фильтрата до 50 мл. Извлечение подвижных форм соединений металлов из образцов проводили добавлением 50 мл ацетатно-аммонийного буферного раствора с рН 4,8 к 5 г почвы, периодически перемешивая вращательными движениями в течение 24 часов при комнатной температуре. Затем пробы отфильтровывали в мерные колбы на 100 мл через бумажный фильтр «Белая лента» и доводили объем фильтрата до 100 мл буферным раствором.

Кислотность, содержание карбоната и гидрокарбоната, определяли в соответствии с ГОСТ 26423-85. Анализ хлоридов, сульфатов, фосфатов и нитратов проводили в соответствии с ПНД Ф 16.1:2.2.3:2.2.69-10. Ионный состав и степень минерализации анализировали с помощью системы капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ-105М (Россия) с автосемплером, в соответствии с руководством производителя.

2.2.3. Молекулярно-генетический анализ

Препараты хромосомной ДНК бактерий получали фенольным методом, модифицированным для выделения ДНК из актиномицетов (Гловер, 1988).

Биомассу бактерий в количестве одной колонии переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,7 мл и ресуспендировали в 0,45 мл ТЕ буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, рН 8,0, с добавлением 2 мкг/мл лизоцима. Инкубировали 40 мин при 30° С в твердотельном термостате «Термит» (ДНК-технология, Москва).

Добавляли 50 мкл 20% раствора додецилсульфата натрия (SDS) и инкубировали в твердотельном термостате при 65° С в течение 20 мин.

Затем добавляли фенол, насыщенный ТЕ буфером и стабилизированный добавлением 0,02% меркаптоэтанола и 0,01% 8-гидроксихинолина, в количестве 0,5 мл. Центрифугировали 10 мин. при 13200 об./мин. Водную фазу переносили в новую микропробирку. Добавляли 0,5 мл хлороформа, содержащего 1% изоамилового спирта, перемешивали и центрифугировали 3 мин при 13200 об./мин. Супернатант переносили в новую микропробирку, добавляли 0,05 мл 10М ацетата аммония и 0,5 мл изопропанола. Центрифугировали 3 мин при 13200 об./мин. Смесь охлаждали при -18° С 30 мин. Центрифугировали 10 мин при 13200 об./мин. Жидкость сливали, осадок высушивали в вакуумном центробежном концентраторе CentriVar (Labconco, США) и растворяли в 100 мкл ТЕ буфера.

Идентификацию изолятов проводили методом секвенирования фрагмента гена 16S рРНК, амплифицированного в ПЦР-реакции с использованием универсальных праймеров 27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' и 1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Температурный цикл состоял из начальной денатурации при 95°С в течение 3 мин, 35 циклов амплификации (денатурация при 94°С в течение 30 с, отжиг при 54°С в течение 30 с и элонгация при 72°С в течение 60 с) и окончательно элонгация при 72°С в течение 3 мин.

ПЦР-ампликоны анализировали электрофоретически в 1% агарозном геле в трис-боратном буфере при напряженности поля 5 В/см. Для оценки молекулярной массы фрагментов ДНК использовали маркеры 1 kb, ООО «СибЭнзим», (Новосибирск). Визуализацию полос осуществляли путем окрашивания бромистым этидием с последующим документированием с использованием системы гельдокументации BioDocAnalyze «Biometra», (Германия). Очистку ПЦР-продукта перед секвенированием осуществляли с использованием смеси ферментов ExoSAPMix «Thermo Fisher Scientific», (США). Секвенирующую реакцию проводили с праймером 27F и набором Big

Dye Terminator v 3.1 «Thermo Fisher Scientific», (США), в соответствии с инструкцией производителя. Анализ проводили на приборе Genetic Analyzer 3500xl «Applied Biosystems», (США). Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с использованием он-лайн сервиса EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

2.2.4. Метагеномный анализ

Метагеномную ДНК выделяли из образцов материала шламохранилища массой 1 г в пробирках объёмом 2 мл согласно научно-методическим рекомендациям (Андронов и др., 2011), а также СТАБ-методом (Галиев, Цырульников, 2011). Для качественного выделения метагеномной ДНК из образцов материала шламохранилища, представляющих собой среду, содержащую большие концентрации солей, соединений кальция, характеризующуюся щелочной средой, предварительно проводили концентрирование бактерий следующим образом: навеску почвы массой 1 г предварительно инкубировали в 1 мл СТАБ-буфера состава 2% цетилтриэтиламмония бромид (СТАВ), 1,4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 100 мМ Tris-HCl pH 8. Пробирки подвергали трехкратной ультразвуковой обработке по 3 мин в ультразвуковой ванне Elmasonic S10H (Elma, Латвия), центрифугировали 30 с при 3 тыс. об./мин, жидкую фазу, содержащую десорбированные клетки бактерий, переносили в новые микропробирки.

Метагеномный анализ исследуемых образцов по генам 16S рРНК проводили на платформах MiSeq и Ion Torrent PGM в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова, г. Москва. Приготовление библиотеки для секвенирования проводили в соответствии с инструкциями и протоколами для секвенаторов MiSeq Illumina и Ion Torrent PGM (Roche Kapa Library Prep Kit Illumina 50 Rxn / Набор КАРА). Для получения необходимых ПЦР фрагментов использовали 2 раунда ПЦР. Использовали нуклеотидные последовательности основных праймеров для региона 16S rRNA: V1F GAGTTTGATCMTGGCTCAG; V3R WTTACCGCGGCTGCTGG. Структура

проверяли на биоанализере Agilent 2100. Анализировали последовательности со средним размером от 380 до 400 п.н.

Дальнейшие секвенирования полученной библиотеки проводили по протоколу для секвенаторов MiSeq и Ion Torrent PGM. Из полученных данных на MiSeq проводили фильтрацию химерных ридов при помощи алгоритма Uchime* (часть программы Userach v7.0). Анализ фильтрованных данных секвенирования проводили по базе данных Ribosomal Database Project (RDP) <http://rdp.cme.msu.edu/>.

2.2.5. Расчет индексов биоразнообразия

Для исследуемой среды рассчитывали показатели α -разнообразия: индекс Шеннона и индекс Симпсона. Индексы разнообразия учитывали для двух таксономических уровней: родов и филумов.

Расчет индекса Шеннона проводили по формуле:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i \quad (1)$$

где: $p_i = n_i / N$ – относительное обилие i -го таксона;

n_i – количество сиквенсов (прочтений, ридов) i -го таксона;

N – общее количество сиквенсов (ридов).

Индекс Симпсона вычисляли по формуле:

$$D = \sum n_i(n_i - 1) / (N(N - 1)) \quad (2)$$

Меру выровненности рассчитывали по индексу Пиелу:

$$E = H' / \ln S \quad (3)$$

где: H' – индекс Шеннона;

S – число обнаруженных таксонов.

2.2.6. Учет численности и выделение чистых культур из содового шламохранилища

Штаммы выделяли методом прямого посева. Навеску почвы (1,0 г) ресуспендировали в 50 мл стерильного физиологического раствора (0,9%), оставляли при температуре 28°C при постоянном перемешивании со скоростью

вращения 120 об/мин на 1 час. Полученный раствор использовали для разведений и последующего параллельного высева на чашки Петри с модифицированной средой Пфеннига (г/л): NH_4Cl – 0,3, KH_2PO_4 – 0,3, MgCl_2 – 0,3, CaCl_2 – 0,03, дрожжевой экстракт – 0,5, раствор микроэлементов по Липперту-Витману – 1 мл (Рандагуруева, Лаврентьева, 2009), содержащей селективные субстраты в концентрации 1,5%: пептон (Sigma-Aldrich) для выделения протеолитиков, крахмал растворимый ЗАО «ННПЦ ГИП», (Оболensk, Россия) – для амилолитиков, микрокристаллическую целлюлозу ЛТ «Chemarol», (Чехия) – для целлюлолитиков, твин-80 «FERAK», (Германия) – для липолитиков. Кислотность среды доводили 1 М раствором NaOH до 8 и инкубировали чашки при 30°C.

Параллельно производили высев на богатой среде при pH 11 без селективных субстратов, позволяющий выделить культуры, устойчивые к экстремальному защелачиванию среды. Для этого использовали богатую среду следующего состава (г/л): пептон – 10, глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5, K_2HPO_4 – 1, Na_2CO_3 – 10, pH 11 (Atlas, 1993).

На 3-7 сутки роста отбирали среди образовавшихся колоний наиболее крупные, а также морфологически различающиеся колонии и переносили на чашки Петри со свежей средой. Чистую культуру пересевали в колбы с жидкой средой аналогичного состава и культивировали в течение 5-7 суток.

2.2.7. Условия культивирования бактерий и определение ростовых характеристик

Клетки бактерий выращивали в 100 мл среды в конических колбах объемом 250 мл на роторной качалке при постоянном перемешивании со скоростью вращения 115 об./мин и температуре 25°C.

Бактериальный рост оценивали по изменению оптической плотности суспензии клеток при $\lambda=540$ нм с учетом разведения на фотоэлектроколориметре КФК-3 с использованием кварцевой 1 см кюветы.

Также рост бактерий изучали в 12-луночных полистероловых плоскодонных планшетах (Eppendorf, Германия). Оптическую плотность суспензии определяли на планшетном ридере Infinite M1000 pro (TECAN, Швейцария) при длине волны 540 нм.

Удельную скорость роста (μ) рассчитывали по формуле (Ждан-Пушкина, 1983):

$$\mu = 1 / ОП_0 (\Delta ОП / \Delta t), \text{ ч}^{-1} \quad (4)$$

где $ОП_0$ – ОП540 в момент времени t_0 ;

$\Delta ОП$ – изменение оптической плотности культуральной среды за время Δt , ч.

Урожай клеток бактерий (X) определяли как разность между максимальной и исходной массой бактерий:

$$X = X_{\max} - X_0; \text{ г/л} \quad (5)$$

Экономический коэффициент потребления субстрата (Y) определяли по формуле:

$$Y = X / C \cdot 100, \% \quad (6)$$

где: X – количество образовавшейся биомассы, г/л;

C – количество потребленного субстрата, г/л

2.2.8. Определение гидролитической активности, изолированных культур

Определение липолитической активности

Для определения липолитической активности изолятов, выращенных на селективной среде с твин-80, проводили биохимическую реакцию с р-нитрофениллауратом, который под действием липазы расщеплялся с образованием окрашенного продукта р-нитрофенола (Bulow, Mosbach, 1987). Активность липазы определяли по приросту оптической плотности среды при λ 405 нм, измеренной на спектрофотометре Ultraspec 3000 «GE Healthcare», (США).

Суспензию клеток (4 мл) помещали в пробирку типа эппендорф и центрифугировали при 5000 об./мин в течение 20 минут. Далее отделяли

супернатант в отдельную пробирку, а осадок промывали 2-3 раза и ресуспендировали в фосфатном буфере $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8. Затем вносили 50 мкл субстрата (p-нитрофениллаурат) в конечной концентрации 10 мМ и проводили реакцию при 25°C в течение часа.

Активность липазы (E) рассчитывали по формуле:

$$E = \text{ОП} \cdot 10^6 / 18,3 \cdot 10^3 \cdot l \cdot t, \text{ (мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}) \quad (7)$$

ОП – оптическая плотность;

10^6 – коэффициент пересчета моль в мкмоль;

$18,3 \cdot 10^3$ – коэффициент молярной экстинкции p-нитрофенола, $\text{л} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$;

l – толщина кюветы, см;

t – время инкубации пробы, мин

Определение амилолитической активности

Активность амилазы оценивали с помощью коммерческого набора реактивов для определения амилазы Альфа-Амилаза-Ольвекс ООО «Ольвекс Диагностикум», (Россия). Реакция основана на гидролизе синтетического субстрата этилиден-p-нитрофенилмальтогептазиды с образованием нитрофенилмальтозидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению альфа-глюкозидазой до глюкозы и окрашенного продукта p-нитрофенола. Активность фермента определяли по изменению оптической плотности среды при λ 405 нм на планшетном ридере Infinite M1000 «Tecan», (Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 минуту.

Клеточную суспензию разделяли на осадок и супернатант. Осадок промывали 2-3 раза и ресуспендировали в фосфатном буфере с pH 8. Реакцию проводили в плоскодонном 96-луночном планшете, к исследуемому образцу добавляли рабочий реагент в соотношении 1:1.

Активность амилазы (E) рассчитывали по формуле:

$$E = \text{ОП} \cdot 10^6 / 18,3 \cdot 10^3 \cdot l \cdot t, \text{ (мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}) \quad (8)$$

ОП – оптическая плотность;

10^6 – коэффициент пересчета моль в мкмоль;

$18,3 \cdot 10^3$ – коэффициент молярной экстинкции p-нитрофенола, $\text{л} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$;

l – толщина кюветы, см;

t – время инкубации пробы, мин

Определение целлюлозолитической активности

Измерение целлюлолитической активности культур основано на колориметрическом определении редуцирующих сахаров, выделившихся после 24-часовой инкубации образцов с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Концентрацию глюкозы определяли с помощью коммерческого набора реактивов для определения глюкозы Глюкоза-8-Ольвекс ООО «Ольвекс Диагностикум», (Россия).

β -D-глюкоза под действием фермента глюкозооксидазы (GOD) окисляется с образованием эквимольного количества перекиси водорода. Образующаяся в данной реакции перекись водорода (H_2O_2) при участии фермента пероксидазы (POD) способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина (4-ААР) и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель). Интенсивность окраски определяли фотометрически на планшетном ридере Infinity M1000 «Tecan», (Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 мин при λ 500 нм. Культуры выращивали в жидкой среде с КМЦ 0,5% в течение двух недель до полного исчерпания субстрата. Для этого отбирали образцы, разделяя на осадок и супернатант, и с помощью набора определяли концентрацию глюкозы. Далее в исследуемые образцы добавляли КМЦ в конечной концентрации 0,1% и оставляли на 24 часа при температуре 50°C , а затем проводили измерение.

Концентрацию глюкозы (С) в исследуемых образцах рассчитывали по формуле:

$$C = (E \text{ пробы} / E \text{ калибратора}) \cdot 10, (C, \text{ ммоль/л}) \quad (9)$$

где: E пробы – оптическая плотность опытной пробы;

E калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы;

10 – концентрация глюкозы в калибраторе, ммоль/л

Для качественного определения целлюлозолитической активности использовали способность красителя конго красного образовывать комплекс с целлюлозой. Культуры высевали штрихом на чашки с минимальной средой следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1,0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 3,7, NaCl – 0,5, раствор микроэлементов по Липперту-Витману – 1 мл и КМЦ в качестве субстрата и инкубировали в термостате при 30°C, после чего окрашивали среду 1% конго красным, выдерживали 15 мин и смывали 1 М раствором NaCl. Целлюлолитическую активность оценивали по зоне просветления вокруг штриха.

Определение протеолитической активности

Культуры высевали штрихом на чашки со средой следующего состава (г/л): казеин – 5, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5, агар – 20 и инкубировали в термостате при 30°C. Протеазную активность оценивали по ширине зоны лизиса казеината натрия «Sigma-Aldrich», (Германия) вокруг штриха.

2.2.9. Изучение влияния концентрации хлорида натрия и рН среды на рост и гидролитическую активность наиболее перспективных штаммов

Для оценки влияния концентрации хлорида натрия и рН на рост и активность наиболее перспективных изолятов варьировали рН среды Пфеннига, содержащей соответствующий источник углерода, в диапазоне от 6 до 11. Добавляли NaCl до концентрации 0,5; 5; 50; 100; 200 г/л, 50 мкл культуры (ОП₅₄₀ 1,0) инокулировали 4 мл среды. О росте бактерий судили по увеличению биомассы (мг/мл), выживаемость бактерий оценивали методом определения

КОЕ при высеве на твердую питательную среду из десятикратных разведений в физиологическом растворе. Активность гидролитических ферментов определяли вышеуказанным способом.

2.2.10. Оценка метаболической активности клеток

Для оценки метаболической активности клеток исследуемую культуру окрашивали препаратом PrestoBlue HS Cell Viability Reagent («Invitrogen», Thermo Fisher Scientific, США) из расчета 10 мкл красителя на 90 мкл клеточной суспензии.

Клетки 7-ми суточных бактериальных культур, выращенных на полноценной среде LB при 25° С с рН 8 и 11 трижды отмывали фосфатным (рН 8) и боратным буфером (рН 11) соответственно, центрифугировали при 5 тыс. об./мин в течение 10 минут и помещали на 2–48 часов в минимальную солевую среду (N) следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1,0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 3,7, NaCl – 0,5 – 50, рН 3–13, рН среды доводили до нужных значений 1 М раствором NaOH . Оценку метаболической активности проводили в 96-луночном черном непрозрачном плоскодонном планшете (Nunc, Дания). После добавления красителя к культуре планшет инкубировали в течение 10 мин при 37°С, флуоресценцию измеряли на планшетном ридере Infinity M1000 «Tecan», (Швейцария) при λ возбуждения/эмиссии 560/590 нм. Условные единицы флуоресценции относили к плотности бактериальной культуры, измеренной при λ 600 нм.

2.2.11. Атомно-силовая микроскопия

Для изучения влияния 50 г/л хлорида натрия в среде и рН на морфологию клеток использовали культуры, выращенные в течение 7 суток при 25°С на среде LB при рН 8 или 11. В соответствии с рН среды культивирования бактериальные клетки трижды отмывали фосфатным (рН 8) или боратным буфером (рН 11) с центрифугированием при 5 тыс. об./мин в течение 10 минут и помещали на сутки в минимальную солевую среду (N) с концентрацией NaCl

– 0,5 и 50 г/л, рН 5 – 11, рН среды доводили до нужных значений 1 М раствором NaOH или HCl.

Изучение морфологии клеток проводили с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D-BIO (Asylum Research, США) в лаборатории атомно-силовой и конфокальной микроскопии на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Сканирование осуществляли в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50-90 кГц и константой жесткости 0,5-4,4 Н/м.

Обработку микрофотографий проводили с помощью программы Igor Pro 6.22A (WaveMetrics, США).

Препараты для АСМ-сканирования готовили сразу после помещения клеток в соответствующий буфер (1–2 мин) и через сутки.

Для определения линейных размеров клеток (длина, ширина, высота) и характеристики структуры поверхности клеток (шероховатости) получали двух- и трехмерные топографические изображения бактерий. Форма клетки была принята за эллипсоид, объем клетки (V) был рассчитан по формуле:

$$V=4\pi abc / 3, \text{ мкм}^3 \quad (10)$$

где: a – длина, мкм;

b – ширина, мкм;

c – высота, мкм

2.2.12. Определение внутриклеточного рН

Внутриклеточный рН у бактерий определяли с помощью флуоресцентного зонда 5 (и 6-)–карбоксифлуоресцеин сукцинимидилового эфира (сFDASE) (Breeuwer et al., 1996).

Культуры бактерий, выращенные в течение 7 суток при 25°C на полноценной среде при рН 8 и 11 промывали и ресуспендировали в 50 мМ буфере HEPES с рН 8,0. Затем клетки инкубировали в течение 10 мин при 30°C

в присутствии 1,0 мкМ cFDASE. Далее клетки промывали и ресуспендировали в буферах со значениями pH в диапазоне от 3,0 до 13,0. Буферы были приготовлены на основе глицина (50 мМ), лимонной кислоты (50 мМ), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (50 мМ) и KCl (50 мМ); pH регулировали либо NaOH, либо HCl. Для устранения неконъюгированного 5 (и 6-)-карбоксихлорофлуоресцеин сукцинимидилового эфира (cFSE) добавляли глюкозу (конечная концентрация, 10 мМ), и инкубировали клетки в течение дополнительных 30 мин при 30°C. Затем клетки дважды промывали, ресуспендировали в буферах с pH 3,0–13 и проводили измерение на планшетном ридере Infinity M1000 «Tecan», (Швейцария).

Интенсивность флуоресценции измеряли при длинах волн возбуждения 490 и 440 нм. Длина волны излучения составляла 525 нм. В конце каждого анализа сигнал внеклеточной флуоресценции (фон) определяли путем фильтрации суспензии клеток через мембранный фильтр размером 0,22 мкм с последующим измерением.

Калибровочные кривые для бактериальных культур были определены в буферах со значениями pH в диапазоне от 4 до 10. Внешний и внутренний pH уравнивали добавлением валиномицина (1 мкМ) и нигерицина (1 мкМ).

2.2.13. Статистический анализ

Полученные данные являются результатами не менее чем трех независимых опытов. При статистической обработке определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего. Достоверность различий определяли с использованием критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Проводили множественный регрессионный анализ. Рассчитывали коэффициент детерминации R^2 , при $0,7 \leq R^2 \leq 1$ корреляционную связь считали высокой, при $0,4 \leq R^2 \leq 0,7$ средней, при $0 \leq R^2 \leq 0,4$ низкой. Корреляцию считали достоверной при уровне значимости при $p < 0,05$. Анализ результатов проводили с помощью стандартного пакета лицензионной программы MS Excel 2007.

ГЛАВА 3. МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА ГОРОДА БЕРЕЗНИКИ

3.1. Физико-химическая характеристика воды и грунтов содового шламохранилища

Известно, что структуру сообщества микроорганизмов определяют физико-химические условия среды. Изменения таких показателей, как рН и элементный состав, ускоряют или подавляют развитие микроорганизмов разных таксономических групп, что влияет на процессы образования и разложения органического вещества, которые осуществляются их сообществами (Кашкак и др., 2017; Дмитриева, Бартухова, 2017). Влияние рН и минерализации на состав микробиома в различных экосистемах было ранее описано в работах (Maturrano et al., 2006; Zhang et al., 2013; Canfora et al., 2014; Liu et al., 2015; Wu et al., 2017). Данные исследования показали, что высокая щелочность, вызванная присутствием карбонатов, бикарбонатов и гидроксидов, а также высокая концентрация солей, являются ключевыми факторами, формирующими структуру микробных сообществ шламохранилищ.

Исследуемые нами среды характеризуются высокими значениями рН. Так, в образцах действующего содового шламохранилища рН воды составляет 11–12,6, отложений соды – 11. В пробах грунта старой карты содового шламохранилища кислотность варьировала в пределах 8–8,5, а рН грунта прибрежной части действующего шламохранилища составляла 7,5.

При изучении элементного состава определена высокая концентрация кальция в образцах из действующего содового шламонакопителя и в грунте старой карты (табл. 1). Наименьшее количество кальция содержали образцы техногенных поверхностных образований прибрежной зоны действующего шламонакопителя и воды, наибольшее – донные отложения. Во всех остальных образцах концентрация кальция в кислоторастворимых и ацетатно-аммонийных фракциях соответствовала 260–470 г/кг грунта. Количество магния возрастало с увеличением глубины отбора проб (13–17,6 г/кг). Концентрация натрия была максимальна в водной фазе и достигала 6 г/л. Также были обнаружены тяжелые

металлы, в большом количестве присутствующие в техногенных поверхностных образованиях территории старой карты содового шламохранилища. Общей тенденцией является возрастание содержания металлов в грунте восстанавливаемых территорий старой карты содового шламонакопителя по сравнению с действующим шламохранилищем, что объясняется концентрированием солей при осушении.

В образцах из действующего шламонакопителя и с поверхности осушенных территорий установлено доминирование хлорид-ионов. Суммарное содержание хлорид-ионов в старой и новой карте составляло 9,3 и 74,7 г/кг соответственно (табл. 2). С увеличением глубины в образцах возрастало содержание карбонатов / гидрокарбонатов, суммарное количество которых составило 0,1/5,8 г/кг в старой карте и 1,6/3,3 г/кг в действующем шламохранилище соответственно. В осадке шламохранилища отмечается также значительное содержание аниона SO_4^{2-} – 3,8 г/кг. Снижение концентрации CO_3^{2-} , SO_4^{2-} и Cl^- в образцах старой карты по сравнению с осадками действующего шламохранилища связано как с вымыванием растворимых ионов атмосферными осадками, так и с биогенными процессами, способствующими коррекции кислотности. Кроме того, следует отметить значительное снижение концентрации хлорид-ионов в образцах грунта старой карты шламохранилища с глубины 5 и 10 см по сравнению с поверхностью.

Таблица 1 – Элементный состав образцов новой и старой карты содового шламохранилища (мг/кг)

Образец	Ф	Mn	Na	K	Mg	Cu	Zn	Pb	Cd	Ni	Fe	Ca
1-1	в	1,12	293,83	51,65	222,15	0,19	0,48	3,57	0,02	0,35	15,69	–
	п	66,55	2880,56	90,53	6153,68	0,68	1,95	29,53	0,19	0,42	122,18	378171,22
	к	91,50	2980,06	153,29	9609,87	5,63	14,99	60,14	0,38	5,81	2034,30	305646,77
1-2	в	0,30	106,37	55,38	77,00	0,20	0,24	0,41	0	0,08	6,12	–
	п	46,55	2776,13	70,52	7096,00	0,70	2,08	27,04	0,09	3,25	173,25	320613,67
	к	93,09	2851,61	129,28	10419,19	5,63	5,63	53,38	0,25	7,46	2244,00	289734,54
1-3	в	0,39	73,09	40,91	69,46	0,13	0,46	0,46	0,04	0	7,21	–
	п	73,24	2629,41	1686,90	5136,49	1,13	3,25	29,58	0,26	2,43	61,12	280376,59
	к	97,43	2346,08	186,70	7846,54	5,35	20,37	60,48	0,41	7,52	1615,73	305053,00
2-1	в	0,03	1242,03	98,65	74,63	0,04	0,10	0,57	0,01	0	0,50	–
	п	8,40	1224,31	103,07	455,57	0,22	1,78	11,36	0,08	0	50,52	115683,51
	к	12,06	1126,21	117,79	616,98	1,23	7,94	19,11	0,07	2,07	1145,65	54402,96
2-2	в	0,03	458,61	58,06	6,31	0,02	0,02	0,33	0	0	0,10	–
	п	1,84	851,85	33,10	188,20	0,10	0,88	4,00	0,01	0	9,56	474072,12
	к	1,91	914,09	42,03	259,28	0,21	4,46	7,37	0,02	0,37	33,50	269499,10
2-3		0,02	5918,77	1981,46	0,16	0,02	0,01	0,38	0	0	0,02	20751,69

Примечание: Ф – формы металлов: в – водорастворимые; п – подвижные; к – кислоторастворимые, "–" – не определено. Образцы 1-1, 1-2, 1-3 отобраны с территории старой карты с глубины 5 см, 10 см и поверхности соответственно; 2-1, 2-2, 2-3 – техногенные поверхностные образования, донные отложения и вода соответственно, отобраны с территории действующего шламохранилища.

Таблица 2 – Минерализация и содержание анионов в образцах старой и новой карты содового шламохранилища

	Влажность, %	Содержание, мг/кг					
		Минерализация, водная вытяжка	CO_3^{2-}	HCO_3^-	SO_4^{2-}	Cl^-	NO_3^-
1-1	41,6	3834	<0,6	2172,6	58,9	54,8	697,3
1-2	42,0	3160	103,4	2187,6	56,6	65,5	111,7
1-3	41,5	17212	<0,6	1459,8	150,4	9228,7	534,7
2-1	8,5	14095	<0,6	733,0	612,9	7874,9	<3
2-2	50,2	98233	1566,3	979,9	3823,3	59550,2	<3
2-3	24,4	14273	<0,6	1607,4	175,5	7237,9	548,1

Примечание: Образцы 1-1, 1-2, 1-3 отобраны с территории старой карты с глубины 5 см, 10 см и поверхности соответственно; 2-1, 2-2, 2-3 – техногенные поверхностные образования, донные отложения и вода соответственно, отобраны с территории действующего шламохранилища.

Таким образом, содовое шламохранилище – необычная экстремальная среда, созданная деятельностью человека в результате химических процессов производства соды. Эта среда состоит почти полностью из карбоната кальция, она щелочная и высокоминерализованная, бедна питательными веществами; органическое вещество в основном поступает из воздуха и с атмосферными осадками. В то же время, в естественных щелочных экосистемах, которые также характеризуются высокой минерализацией и высоким рН, Na^+ чаще всего доминирует над другими катионами, вследствие сильного испарения в замкнутом ландшафте. При этом содержание Ca^{2+} , по литературным данным, не превышает 0,01 г/л. В озерах с повышенной соленостью сумма концентраций анионов HCO_3^- и CO_3^{2-} , как правило, меньше концентрации иона Cl^- , но может быть больше концентрации SO_4^{2-} .

(Yang et al., 2003; Rioual et al., 2013; Gong et al., 2016). Следовательно, естественная и антропогенная щелочная высокоминерализованная среда не являются идентичными по минеральному составу. В связи с этим и состав микробиоты этих экосистем будет отличаться. Дальнейшие исследования были связаны с изучением микробного разнообразия щелочных биотопов антропогенного происхождения.

3.2. Определение численности бактерий с различной гидролитической активностью

При описании структуры микробного сообщества основное внимание уделяется гидролитическим организмам, т.к. именно гидролитики обеспечивают первичное разложение органического вещества, в том числе высокомолекулярных полимеров природного происхождения – белков, целлюлозы, крахмала, жиров. Кроме того, микроорганизмы с гидролитической активностью вызывают интерес как продуценты ферментов, значимых для биотехнологий, в связи с чем основное внимание при изучении данного биотопа было уделено сообществу микроорганизмов, разлагающих природные полимеры. Кроме того, научный интерес представляет описание микробного гидролитического сообщества в экстремальной щелочной среде антропогенного происхождения, бедной в отношении органических субстратов.

С целью определения количества микроорганизмов с различной гидролитической активностью были исследованы образцы, отобранные с территории старой карты шламонакопителя: объединенная проба, проба с поверхности и с глубины 5 и 10 см. На территории действующего шламонакопителя были отобраны пробы воды (дистиллерной жидкости), донных отложений (содового шлама) и техногенных поверхностных образований в прибрежной части шламохранилища.

Для высева микроорганизмов использовали среду Пффеннига, содержащую в качестве источника углерода крахмал, целлюлозу, пептон и твин-80 в концентрации 1,5%.

Старая карта содового шламохранилища представляет собой осушенные территории, на которых восстанавливается растительность, однако поверхность грунта покрыта слоем осажденных солей. Образцы с этой территории характеризовались высоким содержанием микроорганизмов, обладающих амилолитической, целлюлолитической, протеолитической и липолитической активностью, максимальным на глубине около 5 см ($3,31 \times 10^9$ КОЕ/г амилолитиков, $2,63 \times 10^9$ КОЕ/г протеолитиков, $1,40 \times 10^9$ КОЕ/г липолитиков, $1,27 \times 10^9$ КОЕ/г целлюлолитиков) (рис. 5). Вероятно, такая локализация бактерий-гидролитиков связана с расположением зоны наибольшего поступления метаболитов с экссудатом корней растений, а также накопления биогенных органических остатков.

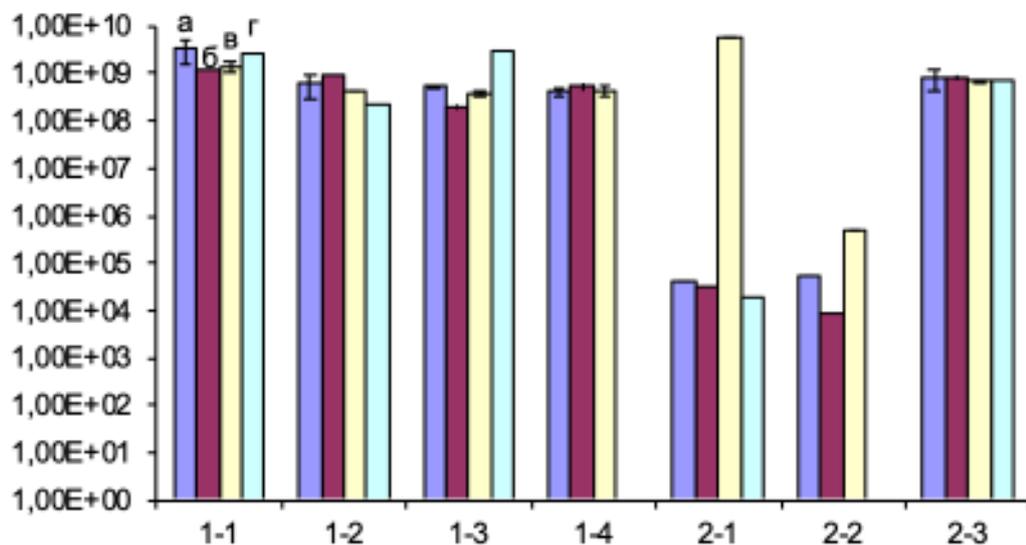


Рисунок 5 – Количество КОЕ/г бактерий на среде с крахмалом (а), целлюлозой (б), твин-80 (в), пептоном (z). Образцы отобраны с территории старой карты шламоаккумулятора с глубины 5 см (1-1), 10 см (1-2), поверхности (1-3) и объединенная проба (1-4); из действующего шламохранилища: техногенные поверхностные образования (2-1), донные отложения (2-2) и ризосфера грунта прибрежной зоны (2-3).

На рисунке 6 показано соотношение микроорганизмов, гидролизующих высокомолекулярные субстраты, в различных средах содового шламохранилища. Наиболее равномерно микроорганизмы с изучаемыми гидролитическими активностями представлены в ризосфере растений прибрежной зоны действующего шламохранилища. На поверхности грунта старой карты 73% от исследованных составляли протеолитические микроорганизмы, а на глубине 10 см 43% приходилось на долю целлюлолитиков. Таким образом, количество протеолитиков было максимально на поверхности, а доля целлюлолитиков возрастала с увеличением глубины, что, вероятно, связано с тем, что белки, как легкоусвояемые биополимеры, содержатся в большем количестве на поверхности, в свежих биогенных материалах. С увеличением глубины количество легко гидролизующих биогенных веществ, в т.ч. белков, липидов, крахмала, снижается, но количество целлюлозы, составляющей большую массу в составе растительных остатков, остаётся высоким. В содовом шламе (осадок) подавляющее количество гидролитических бактерий (90%) было представлено липолитиками, и в техногенных поверхностных образованиях прибрежной зоны гидролитическое сообщество было представлено липолитическими микроорганизмами.

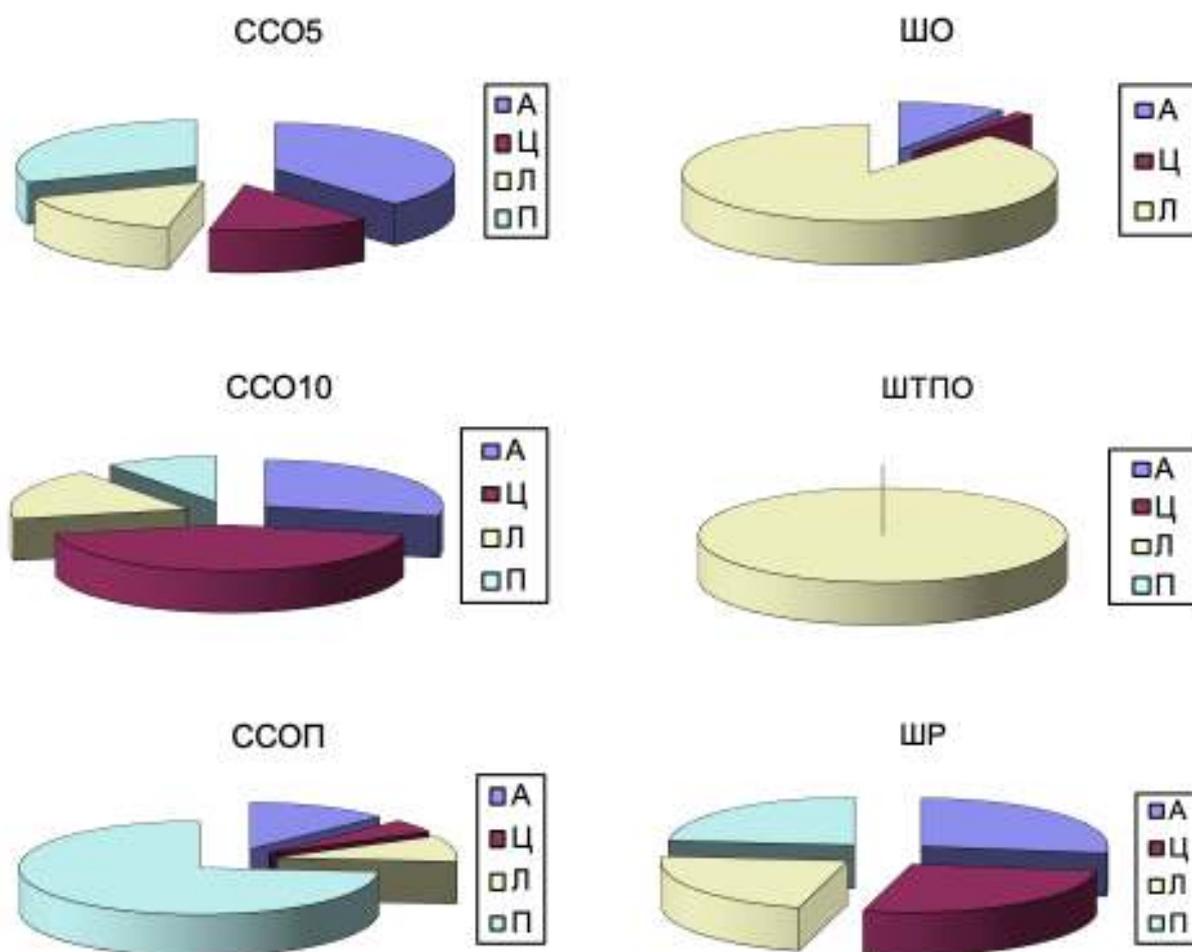


Рисунок 6 – Соотношение микроорганизмов, гидролизующих высокомолекулярные субстраты, в различных средах содового шламохранилища. А - амилолитики, Ц - целлюлозолитики, Л - липолитики, П - протеолитики (грунт старой карты шламохранилища: ССО5 - 5 см глубины, ССО10 - 10 см глубины, ССОП - поверхность; действующая карта шламохранилища: ШО - осадки, ШТПО - прибрежные техногенные поверхностные образования, ШР - ризосфера растений в прибрежной зоне действующего шламохранилища)

Ожидается, что наиболее экстремальная среда будет характеризоваться меньшей численностью микроорганизмов, способных выживать и расти в таких сложных условиях. В осадке шламохранилища (рН 11) обнаружено

незначительное количество микроорганизмов, утилизирующих твин-80, крахмал и целлюлозу, ($4,4 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$ и $2,63 \times 10^4$ КОЕ/г соответственно). Однако в образцах прибрежной зоны, содержащих ризосферу растений (рН 8) количество микроорганизмов, утилизирующих крахмал, целлюлозу, твин-80 и пептон, повышалось до $8,4 \times 10^8$ КОЕ/г (рис. 5), что, очевидно, связано как с выделением биополимеров корнями растений, так и с менее экстремальными значениями рН. Также наблюдалось увеличение количества бактерий, обладающих липолитической активностью в образцах техногенных поверхностных образований действующей карты шламонакопителя (до $5,7 \times 10^9$ КОЕ/г). Последнее, вероятно, обусловлено применением поверхностно-активных веществ в технологии содового производства и их присутствием в сточных водах АО «Березниковский содовый завод». Таким образом, функциональное разнообразие микроорганизмов в исследуемых техногенных микроценозах соответствует сформировавшемуся распределению органических субстратов.

Было определено общее количество алкалофильных бактерий при высеве на богатую среду с рН 11. В действующем шламохранилище наименьшее количество микроорганизмов обнаружено в осадке, где численность бактерий составляла $1,5 \times 10^4$ КОЕ/г. Увеличение микроорганизмов наблюдалось в образцах прибрежной зоны и в образцах, содержащих ризосферу растений: $4,6 \times 10^7$ и 2×10^7 КОЕ/г соответственно.

Максимальное количество алкалофильных микроорганизмов было определено в образцах осушенного шламохранилища, отобранных с глубины 5 и 10 см, численность составила $8,5 \times 10^7$ и $8,9 \times 10^7$ КОЕ/г. В образцах, отобранных с поверхности старой карты шламонакопителя, количество микроорганизмов составило $9,8 \times 10^6$ КОЕ/г (рис. 7).

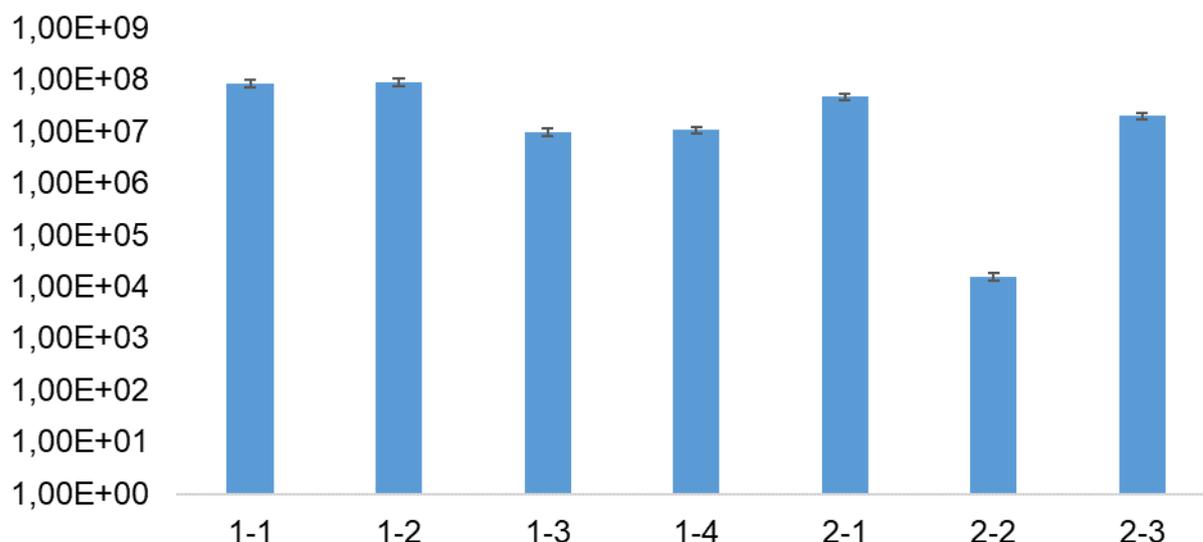


Рисунок 7 – Общее количество КОЕ/г бактерий при высеве на полноценной среде с рН 11. Образцы отобраны с территории старой карты шламонакопителя с глубины 5 см (1-1), 10 см (1-2), поверхности (1-3) и объединенная проба (1-4); из действующего шламохранилища: техногенные поверхностные образования (2-1), донные отложения (2-2) и ризосфера грунта прибрежной зоны (2-3).

Следует отметить, что микробиоценозы содовых шламохранилищ недостаточно изучены. В литературе имеются лишь единичные данные об их численности и составе, так, приведены сведения о микробиоценозе содового шламохранилища, расположенного в Польше (Kalwasińska et al., 2017). Отличие сред исследуемого нами шламохранилища от такового содового производства г. Яниково (Польша) заключается в том, что содовый шлам АО "Березниковский содовый завод" складывается вместе с дистиллерной жидкостью, тогда как отходы содового производства в Польше представляют собой высушенную массу, смачиваемую только атмосферными осадками. Различие во влажности приводит к изменениям в микробном составе, а также в численности бактерий изучаемых сред. Исследование содового шламонакопителя в Польше показало, что общее количество бактерий в подобной среде составляет 10^6 – 10^8 КОЕ/г (Kalwasińska et al., 2017), тогда как в изученных нами средах отмечено колебание численности бактерий в зависимости от места отбора проб: максимальное в грунте старой карты (до

нескольких млрд клеток на г грунта) и минимальное в содовом шламе и техногенных поверхностных образованиях. Более низкое содержание микроорганизмов в шламе по сравнению с грунтами связано с суровыми физико-химическими условиями, в которых существуют микроорганизмы.

С другой стороны, наблюдаемое в содовом шламохранилище количество бактерий схоже с их численностью, определенной для сильнощелочного и соленого озера Моно (Humayoun et al. 2003) или карстовых пещер. Также известно, что в содовых озерах Карпатского бассейна, которые характеризуются стабильным щелочным рН и высокой концентрацией некоторых питательных веществ, численность бактерий составляет около 10^6 – 10^8 КОЕ/г (Felföldi, 2020).

3.3. Метагеномный анализ микробного сообщества содового шламохранилища

Микробное сообщество, населяющее различные экологические ниши с неэкстремальными условиями, отличается высоким таксономическим и функциональным разнообразием, однако, экстремальная среда ограничивает состав микробиома.

Для изучения таксономического состава образцов старой и новой карты шламонакопителя проведено секвенирование фрагментов гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina). В результате обработки данных в образцах действующего шламохранилища было получено 115432 последовательности и 84833 последовательности в образцах старой карты содового шламонакопителя, относящихся к домену *Bacteria*. Бактериальное сообщество, по данным метагеномного анализа, сформировано 7 филумами: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Candidatus Saccharibacteria*. На формирование микробного сообщества в биотопе значительное влияние оказывает кислотность среды, что является одним из наиболее значимых факторов. В научной литературе показана зависимость структуры сообщества от рН на

разных таксономических уровнях, в том числе и на уровне филумов. Известно, что *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* составляют большую долю в сообществах щелочных экосистем (Fierer et al., 2006; Hartman et al., 2008; Lauber et al., 2009).

В результате сравнительного метагеномного анализа было показано, что в исследованных образцах содового шламоохранилища доминируют представители филумов *Proteobacteria* и *Firmicutes* (рис. 8). В работе (Чернов, 2015) было показано, что протеобактерии преобладают в глубоких слоях различных почв, причем в нижнем горизонте солонцов отмечено абсолютное их доминирование за счет небольшого количества представителей этой группы, относящихся к трем семействам: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* и *Sphingomonadaceae*.

В воде и техногенных поверхностных образованиях действующего содового шламоохранилища преобладали представители филума *Firmicutes* (52,11% и 64,12% от общего числа прочтений), где доминирующее положение занимал вид *Staphylococcus sciuri*. В литературе имеются сведения об оптимальном росте штамма в условиях pH 6-10 и концентрации NaCl 2М (Salazar-Ardiles et al., 2020). Также в работах, посвященных изучению филогенетического разнообразия прокариотов содовых озер естественного происхождения, было показано присутствие бактерий рода *Staphylococcus* в этих экологических нишах (Jan-Roblero et al., 2004; Tviverdi R., 2007).

В осадках соды и в объединенном образце грунта старой карты содового шламоохранилища преобладали протеобактерии, в основном род *Acinetobacter*. Известно, что бактерии рода *Acinetobacter* характеризуются универсальной метаболической активностью, что обеспечивает их широкую экологическую пластичность. Кроме того, протеобактерии присутствуют в неочищенных стоках и толерантны к детергентам. Эти микроорганизмы способны разрушать различные загрязняющие вещества, органические соединения и играют важную роль в биоремедиации.

Загрязнение окружающей среды способствует росту популяции этих бактерий (Шмакова, 2019).

В образце, взятом с глубины 10 см из грунта осушенных территорий, преобладали *Firmicutes* и *Acidobacteria*, а количество протеобактерий и актинобактерий было сопоставимо. Ацидобактерии являются доминирующим таксоном в некоторых почвах (Janssen, 2006). Известно, что эта группа бактерий более многочисленна в средах с низким содержанием углерода (Fierer et al., 2006), и было обнаружено, что многие представители *Acidobacteria* широко распространены в щелочных почвах.

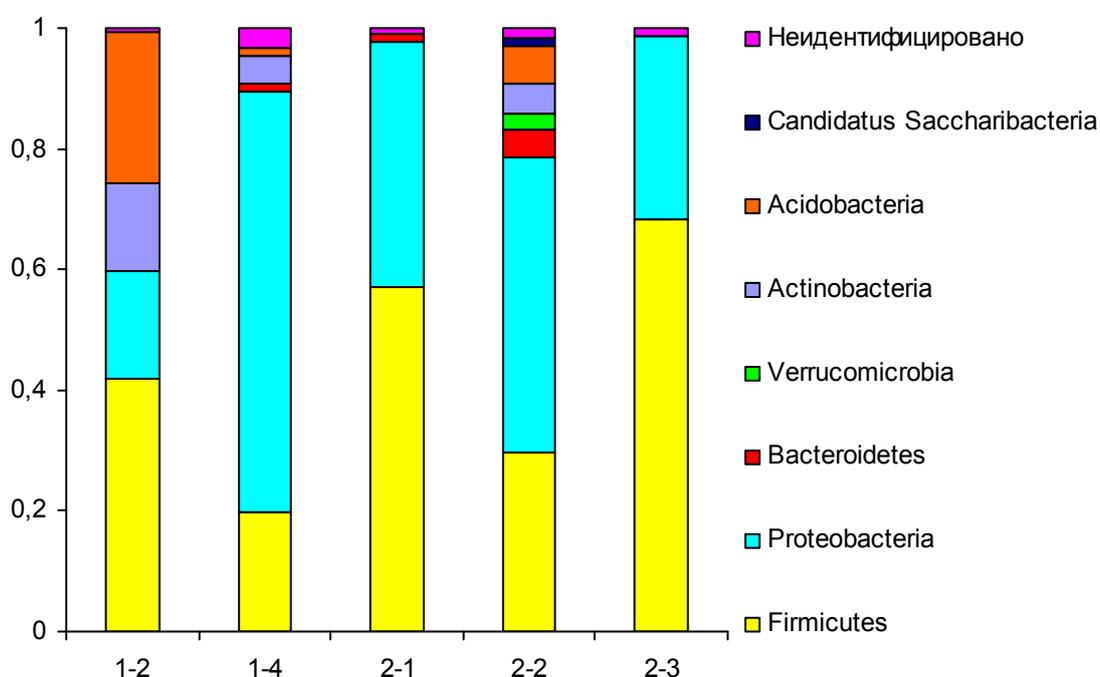


Рисунок 8 – Соотношение филумов домена *Bacteria* в образцах старого осушенного и действующего содового шламохранилища. С территории старой карты образцы отобраны с глубины 10 см (1-2) и получена объединенная проба (1-4), с территории действующего шламохранилища отобраны образцы техногенных поверхностных образований (2-1), донных отложений (2-2) и воды (2-3).

Филогенетическое разнообразие микробиоценоза грунта старой карты содового шламонакопителя было более выражено по сравнению с образцами осадков, воды и поверхностных техногенных образований вблизи действующего содового шламохранилища. В микробиоме объединенного образца грунта осушенного содового озера преобладали семейства *Moraxellaceae* и *Staphylococcaceae* (20–23%), а также *Pseudomonadaceae* и *Burkholderiaceae* (11–13%), тогда как на глубине 10 см в большей степени были представлены семейства *Streptococcaceae* и *Cellulomonadaceae* (рис. 9). Бактерии семейства *Cellulomonadaceae* являются ассоциативными микроорганизмами растительных симбиозов, и их появление связано с восстановлением растительного покрова на этих территориях. В воде действующего шламонакопителя были обнаружены представители трех семейств: *Staphylococcaceae* (65%), *Moraxellaceae* (30%) и *Lachnospiraceae* (2%). В осадках соды и грунте прибрежной части стафилококки и моракселлы также преобладали, и филогенетическое разнообразие микроорганизмов увеличивалось по сравнению с водой.

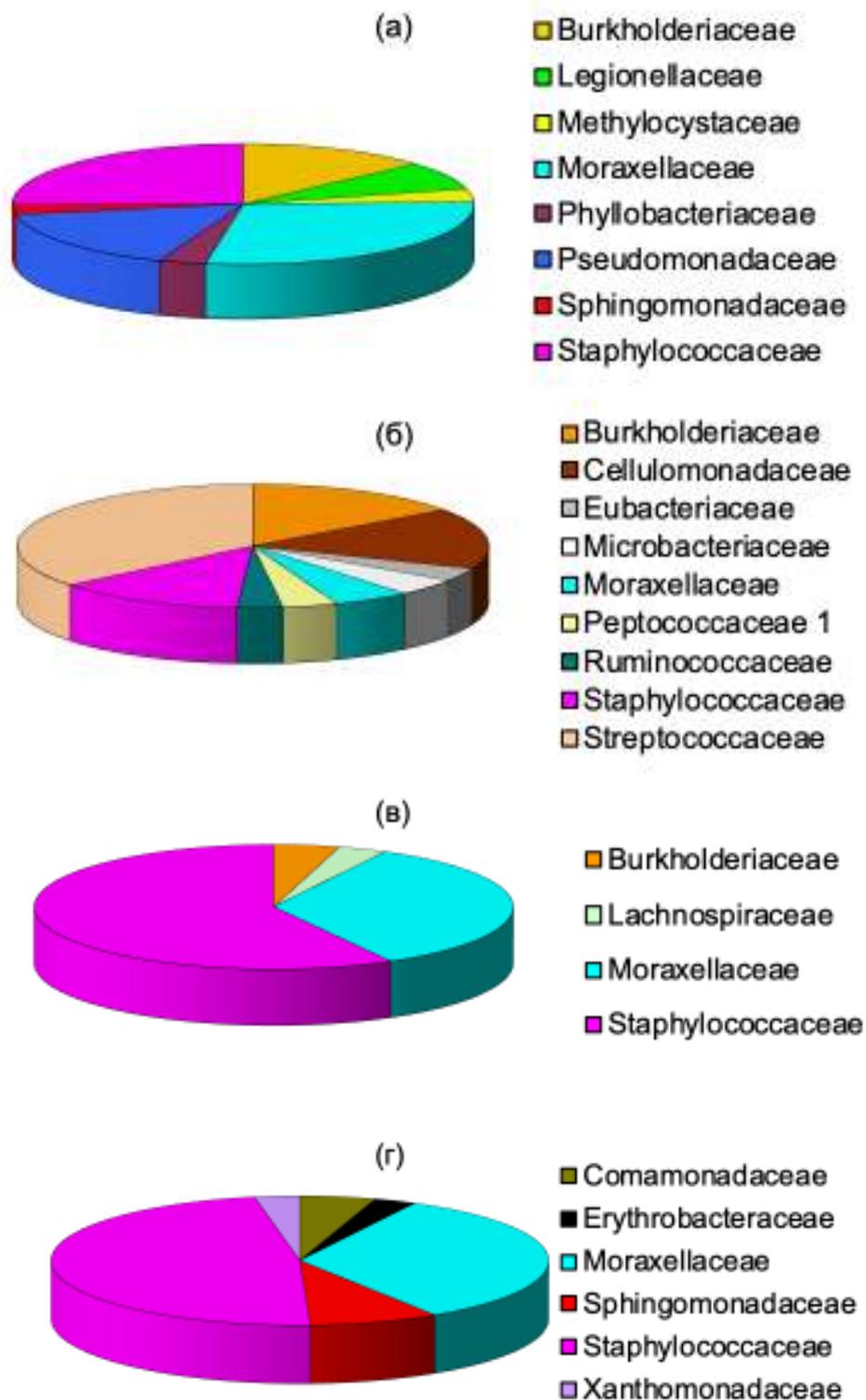


Рисунок 9 – Соотношение семейств домена *Bacteria* в объединенной пробе (а) и на глубине 10 см (б) старой карты содового шламонакопителя и в техногенных поверхностных образованиях (в) и донных осадках (г) действующего шламохранилища.

Для оценки разнообразия биологических сообществ применяют различные индексы – численные показатели, которые рассчитываются на основе числа таксонов в сообществе и числа особей (в метагеномике – числа сиквенсов) в разных таксонах. Разнообразие включает в себя два компонента: богатство (количество таксонов) и выравненность (относительное обилие таксонов). По мнению Чернова Т.И. с соавторами, наиболее подходящим для оценки разнообразия почвенного бактериального метагенома является индекс Шеннона (Чернов и др., 2015). Для оценки биологического разнообразия, выровненности и доминирования отдельных таксонов в структуре сообщества нами были рассчитаны индексы Шеннона, Пиелу и Симпсона. Индекс Шеннона характеризует разнообразие и выравненность сообщества, т.е. чем больше в сообществе таксонов и чем меньше отличаются их численности, тем выше значения индекса Шеннона. Индекс Симпсона отражает меру доминирования, он очень чувствителен к присутствию наиболее обычных видов, но слабо зависит от видового богатства: чем сильнее выражено доминирование в сообществе какого-либо вида (видов) тем выше значения индекса Симпсона (Воронин, 2014). Анализ полученных индексов показал, что исследуемые источники не отличаются высоким биоразнообразием. Так индекс Шеннона варьирует в пределах 0,42–1,39 для филумов и 0,89–1,83 для родов. Максимальное значение индекса Шеннона по таксономическому составу на уровне родов (1,83) характерно для пробы грунта старой карты. Наибольшее микробное разнообразие в отношении бактериальных филумов обнаружено в содовом осадке и на глубине 10 см в грунте старой карты содового шламохранилища (табл. 3). В отношении бактериальных родов большее филогенетическое разнообразие обнаружено в содовом шламе и грунте старой карты содового шламохранилища, более бедными в плане биоразнообразия являлись дистиллерная жидкость и техногенные поверхностные образования в прибрежной зоне действующей карты содового шламохранилища. Индекс Симпсона, показывающий меру доминирования какой-либо

филогенетической единицы, был наибольшим для техногенных поверхностных образований прибрежной зоны (в отношении филумов) и для дистиллерной жидкости (в отношении родов). В этих средах преобладали 1-2 филума или рода, а остальные были представлены в гораздо меньшем количестве. В дополнение к индексам Шеннона и Симпсона вычисляли показатель выравненности сообщества по Пиелу. По таксономическому составу на уровне филумов индекс варьировал в пределах 0,23–0,71 и 0,45–0,94 на уровне родов. Чем более равномерно представлены в сообществе составляющие его виды, тем ближе его значение к единице. Низкие значения индекса, отражающие доминирование одних видов над другими, свидетельствуют о большем уровне экологической адаптации отдельных видов к экстремальным условиям.

Таким образом, наибольшее разнообразие домена *Bacteria* и более выравненное распределение бактериальных таксонов обнаружено в грунтах старой карты содового шламохранилища и твердого содового шлама, а наименьшее – в дистиллерной жидкости и поверхностных техногенных образованиях прибрежной зоны действующей карты шламохранилища.

В сравнении с литературными данными, все исследованные нами биотопы обладали крайне низким биоразнообразием. Так, даже в солонцах, характеризующихся большим количеством натрия, в зависимости от глубины почвенного горизонта индекс Шеннона варьировал от 3 до 7 (Чернов, 2015), тогда как максимальный индекс Шеннона, рассчитанный для сред содового шламохранилища, составлял 1,83 (в отношении родов) для микробного сообщества из грунта старой карты содового шламохранилища.

Таблица 3 – Биоразнообразие микроорганизмов в средах содового шламохранилища

	Индексы биоразнообразия и выравненности сообщества					
	Шеннона	Симпсона	Пиелу	Шеннона	Симпсона	Пиелу
	Филумы			Роды		
1	1,26	0,36	0,64	1,43	0,30	0,73
2	0,78	0,52	0,40	0,89	0,48	0,45
3	0,42	0,80	0,23	1,16	0,39	0,59
4	0,88	0,57	0,45	1,83	0,17	0,94
5	1,39	0,28	0,71	1,49	0,28	0,76

Примечание: 1 – содовый шлам, 2 – дистиллерная жидкость, 3 – техногенные поверхностные образования в прибрежной зоне действующей карты содового шламохранилища, 4 – грунт старой карты содового шламохранилища, 5 – грунт старой карты содового шламохранилища, 10 см глубины

Также проведен множественный регрессионный анализ зависимости количества прочтений нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК отдельных филумов от концентрации металлов в образцах. Обнаружена высокая положительная корреляционная связь содержания представителей филума *Firmicutes* с концентрацией Ca, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Candidatus Saccharibacteria* – с концентрацией Na, *Actinobacteria* и *Acidobacteria* – с концентрацией Mg. Однако высокая положительная корреляционная связь была достоверна только для *Bacteroidetes* ($p = 0,02$), что можно объяснить широкой распространенностью галофильности среди представителей этого филума.

По ГОСТ 17.4.1.0283 к первому классу опасности относятся высокотоксичные Zn, Pb, Cd, ко второму (умеренноопасным веществам) – Cu и Ni, к третьему классу опасности – Mn. Обнаружена высокая корреляция

содержания актинобактерий и ацидобактерий с концентрацией металлов второго класса опасности, средняя корреляционная связь – с концентрацией высокотоксичных металлов: Zn (*Firmicutes*, *Proteobacteria*), Cd (*Firmicutes*), Pb (*Actinobacteria*). Актинобактерии, содержание которых коррелирует с концентрацией металлов первого и второго класса опасности, известны своими биодegradативными способностями и устойчивостью к тяжелым металлам (Ившина и др., 2013; Соляникова, Головлёва, 2015; Krivoguchko et al., 2019). Большинство филогенетических групп, относящихся к филуму *Firmicutes*, обладают грамположительным морфотипом, что также обеспечивает их толерантность к ряду ксенобиотиков и токсикантов, а также к тяжелым металлам.

При восстановлении земель, занятых содовыми шламоохранилищами, происходит ряд процессов, связанных с прекращением эксплуатации и осушением. При этом увеличивается концентрация солей на поверхности, но, в то же время, снижается рН с экстремально высоких (11–12) до слабощелочных (8–8,5) значений. Появление растительного покрова на осушенных территориях коррелирует с изменением микробиома: на глубине 10 см снижается доля протеобактерий, но увеличивается доля ацидобактерий и актинобактерий, что может быть связано с приближением рН техногенных поверхностных образований к нейтральным значениям и появлением микроокружения, создаваемого ризосферой растений. Показано, что на глубине 10 см изменяется и состав семейств домена *Bacteria*: значительно снижается доля семейства *Moraxellaceae* и *Staphylococcaceae*, но появляются представители семейства *Streptococcaceae*, которое становится доминирующим. В осадке содового шламоохранилища, представляющим собой, главным образом, гидрокарбонаты кальция со значительной долей хлорид-ионов, доминируют семейства *Moraxellaceae* и *Staphylococcaceae*, за которыми следуют семейства *Spingomonadaceae* и *Comamonadaceae*.

Сравнение с естественными щелочными высокоминерализованными биотопами показало отличия в составе микробиома щелочных сред

антропогенного происхождения. Так в микробных сообществах озера Гуджирганское были выявлены последовательности генов 16S рРНК представителей 8 бактериальных филумов (Рандагуруева, Лаврентьева, 2009). В сообществах доминировали представители *Proteobacteria*, *Bacteroidates*, *Firmicutes* и *Cyanobacteria* и их соотношение существенно варьировало. Наименьшее видовое разнообразие отмечено в пробах рассола, наибольшее – в донных осадках.

Функционирование биоты содовых озер обеспечивается в первую очередь поступлением органического вещества в результате процессов микробной продукции, а также его деструкцией аэробным и анаэробным сообществом. Также вклад в пул органического вещества вносят водные и наземные растения.

Исучаемая нами система крайне бедна органическим веществом, которое может попадать в виде небольшой примеси детергента, используемого в производственном процессе, а также переноситься ветром (пылевые наносы и осадки), смывами с берегов, и продуцироваться автотрофными микроорганизмами и растениями. Отличия в элементном составе шламохранилища, в сравнении с естественными содовыми озерами, находят отражение в различиях состава бактериального сообщества. Показано, что в исследуемом шламохранилище при сочетании высокой щелочности, концентрации солей и преобладающей доле солей кальция доминирующими филумами являются *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Доля представителей других филумов в водной среде и техногенных поверхностных образованиях не превышала 5%, а в грунте старой карты шламохранилища и в донных отложениях их доля достигала 10 и 22%. Только в образце с глубины 10 см, содержащем ризосферу растений и органические остатки, преобладали *Firmicutes* и *Acidobacteria*, а также содержалось большое количество протеобактерий и актинобактерий.

ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА

4.1. Выделение и идентификация алкалотолерантных бактерий, обладающих выраженными гидролитическими свойствами

Несмотря на то, что щелочные высокоминерализованные среды антропогенного происхождения бедны питательными субстратами, скрининг образцов грунта, осадков и воды содового шламохранилища г. Березники на наличие бактериальных культур с активностью амилазы, липазы, протеазы и целлюлазы позволил выделить и идентифицировать культуры алкалотолерантных умеренно галофильных гидролитических бактерий (табл. 1, 2). Для поиска бактериальных культур использовали два подхода: выделение на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (рН 8) и на богатой среде с рН 11 без селективных субстратов, так как объединение нескольких лимитирующих факторов при выделении чистых культур значительно сужает исходный материал для скрининга ферментативных активностей.

В анализе использовали 58 штаммов бактерий, в том числе 48 были выделены на среде с селективными субстратами при рН 8, остальные 10 штаммов были выделены на богатой среде с рН 11. Методом ПЦР с использованием праймеров к гену 16S рРНК различных филогенетических групп бактерий и последующей секвенирующей реакцией оценивали состав микробного сообщества.

В условиях умеренно-щелочной среды выделены алкалотолерантные бактерии. Среди бактерий, изолированных из материала старого содового шламонакопителя, значительную часть составляли протеобактерии. Так, на средах с твин-80 и пептоном преобладали представители класса *Alphaproteobacteria* – главным образом *Ensifer morelensis*, *Gammaproteobacteria* – виды рода *Pseudoxanthomonas*, а также *Firmicutes*; класс *Bacilli*. На среде с крахмалом наблюдалось большее таксономическое

разнообразие изолятов: были выделены культуры *Sphingopyxis panaciterrae* и *Ensifer morelensis*, относящиеся к классу *Alphaproteobacteria*, *Pseudomonas peli* (класс *Gammaproteobacteria*), *Microcella putealis* и *Arthrobacter ginsengisoli* (филум *Actinobacteria*, порядок *Micrococcales*), *Bacillus cereus* (филум *Firmicutes*, класс *Bacilli*) и *Pedobacter quisquiliarum* (филум *Bacteroidetes*, класс *Sphingobacteriia*).

На среде с целлюлозой, являющейся наиболее сложно метаболизируемым субстратом из используемых, выделены культуры *Lysobacter prati* (класс *Gammaproteobacteria*), *Paenarthrobacter aurescens* (филум *Actinobacteria*, порядок *Micrococcales*), *Metabacillus indicus* (филум *Firmicutes*, класс *Bacilli*).

Из образцов с территории действующего шламохранилища изолировали преимущественно культуры актинобактерий, порядок *Micrococcales* (представители родов *Actinotalea*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Microbacterium*, *Microcella*, *Micrococcus*, *Paenarthrobacter*), а также *Firmicutes*; класс *Bacilli* (виды рода *Bacillus*).

При выделении на богатой среде с pH 11 не обнаружено существенных отличий между материалом действующей и старой карты содового шламохранилища по составу культивируемых микроорганизмов. Большую часть изолятов составляли представители актинобактерий, в том числе выделены виды рода *Oerskovia* (филум *Actinobacteria*; порядок *Micrococcales*), а также бациллы *B. aequororis*, *B. halmapalus*, *B. zhangzhouensis*, которые не выделялись на средах с более низким pH и являются алкалофилами. Данные по идентификации микроорганизмов представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 – Идентификация изолятов гидролитических бактерий, выделенных на крахмале, пептоне, твин-80 и целлюлозе в качестве единственного источника углерода

Изолят	Субстрат	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных EzBioCloud	Сходство генов 16S рРНК, %	Количество прочтенных нуклеотидов	Идентификационный номер последовательности в GenBank
1	2	3	4	5	6
Старая карта содового шламонакопителя					
8-К	Крахмал	<i>Sphingopyxis panaciterrae</i> , Gsoil124 ^T AB245353	99,23	783	MT860696
9-К		<i>Pedobacter quisquiliarum</i> , C62-2 ^T KU973598	99,75	808	MT860697
14-К		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99,65	851	MT860695
15-К		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99,65	851	MT887618
21-К		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	726	MT860698
24-К		<i>Bacillus cereus</i> , ATCC14579 ^T AE016877	100	879	MT860699

Продолжение таблицы 4.

1	2	3	4	5	6
26-К	Крахмал	<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	99,88	872	MT860700
29-К		<i>Arthrobacter</i> <i>ginsengisoli</i> , DCY81 ^T KF212463	99,75	797	MT860701
1-Ц	Целлюлоза	<i>Lysobacter prati</i> , SYSU H10001 ^T MN181427	99,71	802	MT875267
6-Ц		<i>Paenarthrobacter</i> <i>aurescens</i> , NBRC 12136 ^T BJMD01000050	99,36	594	MT875275
8-Ц		<i>Metabacillus indicus</i> , LMG 22858 ^T JGVU01000003	100	693	MT875282
3-Т	Твин-80	<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99,17	855	MT860703
4-Т		<i>Sphingopyxis chilensis</i> , S37 ^T AF367204	99,47	1321	MT860704
5-Т		<i>Bosea caraganae</i> , RCAM04680 ^T MH633716	99,26	810	MT892879
		<i>Bosea lathyri</i> , DSM 26656 ^T jgi.1058926	99,75	809	MT860706

Продолжение таблицы 4.

1	2	3	4	5	6
6-Т	Твин-80	<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	99,62	795	MT860707
10-Т		<i>Exiguobacterium undae</i> , DSM 14481 ^T JHZV01000003	100	842	MT860708
11-Т		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	99,76	1264	MT860709
13-Т		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	99,63	810	MT860710
14-Т		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99,17	855	MT887617
15-Т		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	100	885	MT860712
16-Т		<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> , AMX 26B ^T AF273082	99,88	843	MT860715
		<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i> , 12-3 ^T AB008507	99,77	857	MT860717
17-Т		<i>Pseudoxanthomonas putridarboris</i> , WD12 ^T GU908487	98,82	847	MT860720

Продолжение таблицы 4.

1	2	3	4	5	6
5-П	Пептон	<i>Exiguobacterium undae</i> , DSM14481 ^T JHZV01000003	100	729	MT872007
7-П		<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> , AMX 26B ^T AF273082	99,88	841	MT872010
		<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i> , 12-3 ^T AB008507	99,76	852	MT872018
12-П		<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12 ^T AF483625	99,27	829	MT875305
14-П		<i>Paenarthrobacter aurescens</i> , NBRC 12136 ^T BJMD01000050	92,42	729	MT872020
15-П		<i>Ensifer morelensis</i> , Lc04 ^T AY024335	100	876	MT872021
Действующее содовое шламохранилище					
4-К	Крахмал	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i> , SK 55 ^T DQ333897	99,29	841	MT872022
5-К		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	910	MT872023

Продолжение таблицы 4.

1	2	3	4	5	6
6-К	Крахмал	<i>Actinotalea fermentans</i> , DSM 3133 ^T AXCX01000029	98,86	875	MT872026
7-К		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	831	MT872027
10-К		<i>Microbacterium oxydans</i> , DSM 20578 ^T Y17227	100	790	MT872028
13-К		<i>Pseudomonas peli</i> , R-20805 ^T AM114534	99,40	671	MT872055
19-К		<i>Bacillus vietnamensis</i> , 15-1 ^T AB099708	99,54	879	MT872057
25-К		<i>Bacillus aquimaris</i> , TF-12 ^T AF483625	98,69	768	MT872059
27-К		<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> , G2-1 ^T AJ512504	100	876	MT872058
28-К		<i>Bacillus toyonensis</i> , BCT-7112 ^T CP006863	100	867	MT875308
11-Ц	Целлюлоза	<i>Microbacterium pygmaeum</i> , DSM 23142 ^T LT6296692	99,76	821	MT872064

Продолжение таблицы 4.

1	2	3	4	5	6
8-Т	ТВИН-80	<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12 ^T AF483625	99,88	814	MT875310
9-Т		<i>Metabacillus litoralis</i> , SW-211 ^T AY608605	100	799	MT875314
12-Т		<i>Citricoccus</i> <i>zhacaiensis</i> , FS24 ^T EU305672	99,17	844	MT872066
1-П	ПЕПТОН	<i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> , DSM 7 ^T FN597644	99,78	903	MT872067
2-П		<i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> , DSM 7 ^T FN597644	100	838	MT872068
3-П		<i>Dietzia maris</i> , DSM 43672 ^T X79290	100	719	MT872069
6-П		<i>Kocuria polaris</i> , CMS 76or ^T JSUH01000031	99,76	835	MT872071
8-П		<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	858	MT872070
9-П		<i>Arthrobacter</i> <i>halodurans</i> , JSM078085 ^T EU583729	99,86	727	MT872072
11-П		<i>Micrococcus luteus</i> , NCTC 2665 ^T CP001628	100	788	MT875311

Таблица 5 – Идентификация изолятов гидролитических бактерий, выделенных на богатой среде с рН 11

Изолят	Типовой штамм ближайшего родственного вида и номер в базе данных EzBioCloud	Сходство генов 16S рРНК, %	Количество прочтенных нуклеотидов	Идентификационный номер последовательности в GenBank
1	2	3	4	5
Старая карта содового шламонакопителя				
3-ДБ	<i>Oerskovia paurometabola</i> , DSM14281 ^T AJ314821	99,86	748	MT872073
4-ДБ	<i>Brevibacterium pityocampae</i> , DSM21720 ^T EU484189	100	754	MT872074
5-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i> , M-8 ^T KC686697	99,87	758	MT875306
12-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i> , M-8 ^T KC686697	99,76	833	MT875307
13-ДБ	<i>Oerskovia enterophila</i> , DSM 43852 ^T MAQA01000098	100	845	MT872075
Действующее содовое шламохранилище				
7-ДБ	<i>Bacillus halmapalus</i> , DSM 8723 ^T KV917375	99,75	813	MT872080
8-ДБ	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> , DW5-4 ^T JOTP01000061	98,73	709	MT872079
9-ДБ	<i>Microcella putealis</i> , CV-2 ^T AJ717388	100	825	MT872081

Продолжение таблицы 5.

1	2	3	4	5
10-ДБ	<i>Oerskovia jenensis</i> , DSM46000 ^T AJ314848	100	697	MT872082
16-ДБ	<i>Microbacterium kitamiense</i> , Kitami C2 ^T AB013919	100	802	MT872083

У чистых культур, выделенных на твин-80, целлюлозе, пептоне и крахмале в качестве источника углерода, определяли соответствующую гидролитическую активность. Также проводили скрининг на наличие гидролитических активностей у культур, выделенных на богатой среде с рН 11.

4.2. Бактерии, обладающие целлюлазной активностью

Изученные образцы характеризовались высоким содержанием целлюлозолитических бактерий. Их максимальная численность была отмечена в грунте старого содового озера (рН 8), отобранном с глубины 5 см – $1,27 \times 10^9$ КОЕ/г. Образцы грунта прибрежной зоны действующего шламохранилища (рН 8), содержащие ризосферу растений, также содержали большое количество микроорганизмов, утилизирующих полисахариды (до $8,4 \times 10^8$ КОЕ/г). Очевидно, что их обилие связано с наличием в среде полисахаридов растительного происхождения.

На агаризованной среде Пфеннига с целлюлозой как источником углерода было выделено 11 изолятов. Первоначально проводили качественную оценку целлюлазной активности выделенных культур. Максимальная зона лизиса отмечена у изолятов 11-Ц (9 мм) и 6-Ц (10 мм). В результате секвенирования генов 16S рРНК штамм 11-Ц идентифицирован как *Microbacterium pygmaeum*, а штамм 6-Ц как *Paenarthrobacter aurescens* (табл. 6).

Был проведен скрининг изолятов, выделенных на щелочной среде с рН 11, на наличие целлюлозолитической активности. Максимальная активность целлюлазы (размер зоны просветления 8 мм) была обнаружена у изолята 13-ДБ, идентифицированного как *Oerskovia enterophila* (табл. 5). Значительная зона лизиса (6 мм) была отмечена у изолятов 3-ДБ и 10-ДБ идентифицированных как *O. paurometabola* и *O. jenensis*, соответственно.

Определяли активность целлюлазы в клеточной биомассе и в культуральной жидкости наиболее активных изолятов (табл. 6). В супернатанте максимальная целлюлозолитическая активность (0,49 ммоль/(л·сутки) выявлена у изолята 11-Ц. Целлюлазная активность, достигающая 0,47 ммоль/(л·сутки), также была отмечена у образцов, выделенных из грунта старого содового озера. Максимальная активность целлюлазы (0,18 ммоль/(мг·сутки)), ассоциированной с клеточной биомассой, была выявлена у изолята 8-Ц, идентифицированного как *Metabacillus indicus*.

Таблица 6 – Целлюлозолитическая активность культуральной жидкости и биомассы штаммов, выделенных на селективной среде с целлюлозой

Изолят	Организм	Целлюлозолитическая активность	
		Супернатант, ммоль/ (л·сут) / биомасса, мг/мл	Биомасса, ммоль/ (мг·сут)
1-Ц	<i>Lysobacter prati</i>	0,47 / 6,7	0,17
6-Ц	<i>Paenarthrobacter aurescens</i>	0,41 / 8,9	0,10
8-Ц	<i>Metabacillus indicus</i>	0,41 / 7,3	0,17
11-Ц	<i>Microbacterium pygmaeum</i>	0,49 / 13,8	0,07

4.3. Бактерии, обладающие амилазной активностью

При скрининге изолятов, выделенных на среде с крахмалом как единственным источником углерода, у всех изученных образцов была

определена амилолитическая активность. Численность микроорганизмов, утилизирующих крахмал, была максимальна в образцах грунта старой карты содового шламохранилища с глубины 5 см (рН 8) и достигала $3,31 \times 10^9$ КОЕ/г. Также значительное количество бактерий отмечено в образцах ризосферы растений из грунта прибрежной части действующего шламохранилища (рН 8) (рис. 5).

Наибольшая активность амилазы была отмечена в образцах культуральной жидкости (табл. 7). Максимальная активность, равная 30,32 мкмоль/ (л·мин), определена у изолята *Ensifer morelensis* 26-К. Наибольшая амилолитическая активность (20,03 мкмоль/(мг·мин)), ассоциированная с клетками, установлена у культуры *Paenisporasarcina quisquiliarum*.

Таблица 7 – Амилолитическая активность культуральной жидкости и биомассы штаммов, выделенных на селективной среде с крахмалом

Изолят	Организм	Амилолитическая активность	
		Супернатант, мкмоль/ (л·мин) / биомасса, мг/мл	Биомасса, мкмоль/ (мг·мин)
1	2	3	4
3-К	<i>Ensifer morelensis</i>	14,71 / 5,4	4,33
4-К	<i>Paenisporasarcina quisquiliarum</i>	14,83 / 3,7	20,03
5-К	<i>Micricella putealis</i>	11,76 / 3,9	14,36
6-К	<i>Actinotalea fermentans</i>	10,98 / 10,3	4,51
7-К	<i>Micricella putealis</i>	11,05 / 4,7	15,94
8-К	<i>Sphingopyxis panaciterrae</i>	16,10 / 6,1	4,40
9-К	<i>Pedobacter quisquiliarum</i>	17,38 / 5,2	12,19
10-К	<i>Arthrobacter agilis</i>	16,11 / 5,8	2,36

Продолжение таблицы 7.

1	2	3	4
13-К	<i>Pseudomonas peli</i>	10,05 / 4,5	9,96
14-К	<i>Pseudomonas peli</i>	10,21 / 5,1	11,88
19-К	<i>Bacillus vietnamensis</i>	10,77 / 7,5	3,93
21-К	<i>Micricella putealis</i>	13,19 / 7,5	3,06
24-К	<i>Bacillus cereus</i>	10,58 / 10,8	2,21
25-К	<i>Bacillus aquimaris</i>	10,37 / 7,1	4,91
26-К	<i>Ensifer morelensis</i>	30,32 / 7,6	11,81
27-К	<i>Paenarthrobacter nitroquajacolicus</i>	14,71 / 3,7	8,65
28-К	<i>Bacillus toyonensis</i>	10,23 / 10,6	11,34
29-К	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i>	14,91 / 7,1	10,55

Высокую амилазную активность, как внеклеточную (14,7 мкмоль/(л·мин)), так и ассоциированную с клетками (8,65 мкмоль/(л·мин)), проявил штамм *Paenarthrobacter nitroquajacolicus*. Рост данного изолята наблюдали при pH 6–10 и 0,5–50 г/л NaCl. Максимальное количество жизнеспособных клеток содержала культура, выращенная с 5 г/л NaCl в среде при pH 10. Наибольшая активность амилазы отмечена при pH 6 и 50 г/л NaCl. Данный изолят может быть отнесен к экстремотолерантным микроорганизмам, т.к. была показана его способность к росту на среде с высокими pH и концентрацией соли, но оптимум роста был приближен к нормальным физиологическим условиям.

Изоляты, выделенные на щелочной среде (pH 11), также были исследованы на амилитическую активность (табл. 8). Максимальная активность внеклеточной амилазы, отмеченная у изолята 16-ДБ, идентифицированного как *Microbacterium kitamiense*, при pH 8 достигала 23,15 мкмоль/(л·мин). Диапазон роста данного изолята находился в пределах

pH 7–11 и 0,5–100 г/л NaCl. Максимальное количество жизнеспособных клеток и наибольшая активность амилазы (48,21 мкмоль/(л·мин)) отмечены в культуре, выращенной при 5 г/л NaCl и pH 10. По отношению к pH среды культивирования и концентрации соли в среде *M. kitamiense* 16-ДБ является факультативным алкалофилом.

Культуры *Bacillus aequororis* и *Oerskovia jenensis* проявили высокую активность амилазы, ассоциированной с клетками, которая достигала до 11,8 мкмоль/(мг·мин).

Таблица 8 – Активность амилазы и липазы штаммов, выделенных на богатой среде с pH 11

Изолят	Организм	Амилолитическая активность		Липолитическая активность	
		Супернатант, мкмоль/(л·мин) / биомасса, мг/мл	Биомасса, мкмоль/(мг·мин)	Супернатант, мкмоль/(л·мин) / биомасса, мг/мл	Биомасса, мкмоль/(мг·мин)
1	2	3	4	5	6
3-ДБ	<i>Oerskovia paurometabola</i>	18,91 / 16,5	2,96	1,15/ 3,7	2,37
4-ДБ	<i>Brevibacterium pityocampae</i>	22,06 / 5,5	8,67	1,20/ 7,0	1,17
5-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i>	20,69 / 5,8	11,80	0,95/ 4,6	1,85
9-ДБ	<i>Microcella putealis</i>	19,52 / 20,1	2,69	1,45/ 4,4	1,50

Продолжение таблицы 8.

1	2	3	4	5	6
10-ДБ	<i>Oerskovia jenensis</i>	20,05 / 6,7	11,11	1,16/ 5,7	1,68
12-ДБ	<i>Bacillus aequororis</i>	19,56 / 6,9	7,93	1,09/ 4,3	1,97
13-ДБ	<i>Oerskovia enterophila</i>	18,92 / 8,4	7,23	1,44/ 8,0	0,88
16-ДБ	<i>Microbacterium kitamiense</i>	23,15 / 12,1	3,95	1,46/ 3,6	2,62

4.4. Бактерии, обладающие липазной активностью

У бактериальных культур, выделенных на среде с твин-80, исследована липолитическая активность культуральной жидкости и биомассы (табл. 9). Из всех изученных образцов шламохранилища выделены изоляты, обладающие липолитической активностью. Максимальная численность микроорганизмов, достигающая $5,7 \times 10^9$ КОЕ/г, установлена в образцах техногенных поверхностных образований прибрежной зоны действующего шламохранилища (рис. 5). Отмечена липазная активность в культуральной жидкости шести изолятов. Наибольшую активность проявил изолят, идентифицированный как *Pseudomonas peli*. Активность липазы, связанной с клетками, проявили 17 бактериальных культур. Высокая липолитическая активность отмечена у штаммов *P. peli*, а также *Pseudoxanthomonas mexicana* и *Pseudoxanthomonas putridarboris*.

Таблица 9 – Липолитическая активность культуральной жидкости и биомассы штаммов, выделенных на селективной среде с твин-80

Изолят	Организм	Липолитическая активность	
		Супернатант, мкмоль/(л·мин) / биомасса, мг/мл	Биомасса, мкмоль/(мг·мин)
3-Т	<i>Pseudomonas peli</i>	0,83 / 1,9	2,97
4-Т	<i>Sphingopyxis chelensis</i>	-	0,19
5-Т	<i>Bosea lathyri</i>	-	0,18
8-Т	<i>Bacillus aquimaris</i>	-	0,12
9-Т	<i>Metabacillus litoralis</i>	-	0,13
10-Т	<i>Exiguobacterium undae</i>	-	0,14
11-Т	<i>Ensifer morelensis</i>	-	0,18
12-Т	<i>Citricoccus zhacaieasis</i>	-	0,18
13-Т	<i>Ensifer morelensis</i>	0,34 / 3,4	0,33
14-Т	<i>Pseudomonas peli</i>	0,78 / 4,5	1,36
15-Т	<i>Pseudomonas peli</i>	0,74 / 3,2	2,24
16-Т	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	0,25 / 2,3	0,54
17-Т	<i>Pseudoxanthomonas putridarboris</i>	-	0,41

Изучено влияние различных рН и концентрации NaCl на рост наиболее перспективного изолята *P. peli* 3-Т, проявившего активность внеклеточной и ассоциированной с клетками липазы. Было выявлено, что изолят был способен к росту при рН 7–10 и 0,5–50 г/л NaCl. Максимальное количество жизнеспособных микроорганизмов ($1,2 \times 10^6$ КОЕ/г) содержала культура, выращенная на среде с 5 г/л NaCl и рН 7. Таким образом, выделенный штамм является алкалотолерантным и галотолерантным. Активность внеклеточной

липазы возрастала с увеличением концентрации хлорида натрия и pH. Максимальная активность (12,59 мкмоль/(л·мин)) отмечена при 100 мг/мл NaCl и pH 11. Наименьшую активность внеклеточный фермент проявил при pH 6.

Скрининг изолятов, выделенных на среде с пептоном, глюкозой и дрожжевым экстрактом (pH 11), показал, что все культуры обладают липолитической активностью (табл. 8). Штамм 16-ДБ, идентифицированный как *Microbacterium kitamiense*, обладает наибольшей активностью липазы, ассоциированной как с биомассой клеток (2,62 мкмоль/(мг·мин)), так и с супернатантом (1,46 мкмоль/(л·мин)). Как было отмечено выше, данный штамм также проявил максимальную амилолитическую активность.

4.5. Бактерии, обладающие протеазной активностью

Для выявления протеолитической активности бактерии высевали штрихом на агаризованную среду с казеинатом натрия и оценивали результаты, измеряя зону просветления, которая образуется при расщеплении казеина. Зона лизиса от края штриха для разных изолятов составляла от 1 до 12 мм. При скрининге изолятов, ранее выделенных на среде с пептоном, у всех изученных образцов была определена протеолитическая активность. Наибольшая активность (зона лизиса 12 мм) отмечена у изолята *Arthrobacter halodurans*. Также протеазную активность выявили у культур *Micrococcus aloeverae* (10 мм), *Bacillus amyloliquefaciens* (9 мм) и *Microcella putealis* (7 мм).

Культуры, выделенные и выращенные при pH 11, были исследованы на протеолитическую активность. Наибольшая активность протеазы (зона просветления 15 мм) установлена у *Bacillus halmapalus*, выделенного из грунта прибрежной части действующего шламохранилища. Изолят *Oerskovia jenensis* из грунта старого содового озера с глубины 5 см проявил высокую протеолитическую активность (зона просветления 10 мм). Данный изолят также характеризуется высокой активностью целлюлазы.

Таким образом, из образцов грунта, осадков и воды содового шламохранилища г. Березники на среде с селективными субстратами с рН 8 и на богатой среде с рН 11 выделены культуры алкалотолерантных и алкалофильных умеренно галофильных гидролитических бактерий, обладающих активностью амилазы, липазы, протеазы и целлюлазы. Амилазная активность культур, изолированных на среде с рН 11 была сопоставима с таковой изолятов, выделенных на селективных средах. Однако рН-зависимость активности ферментов этих изолятов различалась. Наибольшую активность амилазы у культур, полученных на среде с рН 11 и 8, отмечали при рН 10 и 6 соответственно. При этом удельная активность внеклеточной липазы изолятов *P. peli*, выделенных при рН 8, была наибольшей при рН 11. Этот факт можно объяснить тем, что большинство известных амилаз наиболее активны в нейтральной и кислой среде (Mc Tighe et al., 1995; Febriani et al., 2019), поэтому для поиска фермента с максимумом активности в щелочной области следует вести выделение культур в экстремально щелочных условиях. Липазы из большинства источников, в том числе липазы псевдомонад (Rios et al., 2018), более активны в щелочной среде, в результате чего для выделения из экстремальных биотопов культур со щелочными липазами может быть использована среда, близкая к нейтральной.

Выделение бактериальных культур, обладающих щелочной амилазой, представляет определенные сложности. Так, по литературным данным, из золя щелочного кремнезема, подверженного процессам гниения, было выделено лишь 2 изолята с амилазной активностью – *Acinetobacter* sp. и *Bacillus thuringiensis*, но эта активность была невысокой (Ren et al., 2014). Ранее сообщалось о выделении щелочных амилаз из клеток алкалофильных представителей рода *Bacillus* (Horikoshi, 1999; Kubrak et al., 2010; Saxena et al., 2007). Нами на среде с рН 11 были выделены изоляты *Bacillus aequororis*, а также виды, о которых нет упоминания как о продуцентах щелочной амилазы: *Brevibacterium pityocampae*, *Microbacterium kitamiense* *Microcella*

putealis, *Oerskovia paurometabola*, *O. enterophila*, *O. jenensis*.

Нами было использовано два подхода: выделение алкалофильных бактериальных изолятов на богатой питательной среде (рН 11) и выделение алкалотолерантных представителей домена *Bacteria* на селективных субстратах (рН 8). Этот подход, исключающий объединение двух лимитирующих факторов, позволил выделить более разнообразную бактериальную биоту для дальнейшего скрининга гидролитических активностей.

Таким образом, было показано, что в содовых шламонакопителях развиваются гидролитические бактерии, адаптированные к экстремальным условиям среды. Скрининг гидролитической активности бактериальных изолятов из искусственной щелочной среды позволил выявить наиболее перспективные штаммы, обладающие как внеклеточными, так и связанными с клетками активностями амилазы (*Ensifer morelensis*, 30,32 мкмоль/(л·мин); *Paenisporasarcina quisquiliarum*, 20,03 мкмоль/(мг·мин); *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* 14,7 мкмоль/(л·мин) и 8,65 мкмоль/(мг·мин)), липазы (*Pseudomonas peli*, 0,83 мкмоль/(л·мин) и 2,97 мкмоль/(мг·мин)), протеазы (*Arthrobacter halodurans*, 12 мм; *Micrococcus aloeverae*, 10 мм) и целлюлазы (*Microbacterium pygmaeum*, 0,49 ммоль/(л·сут); *Lisobacter soli*, 0,47 ммоль/(л·сут); *Bacillus indicus*, 0,17 ммоль/(мг·сут)). Достаточно высокая активность гидролитических ферментов у многих, выделенных из искусственного содового озера изолятов, вероятно, связана с дефицитом органического субстрата. Известно, что повышенная активность ферментов, осуществляющих гидролиз органических полимеров и других сложных субстратов, в условиях лимитирования по источнику углерода дает экологические преимущества микроорганизмам-продуцентам. При дальнейшей селекции выделенные изоляты будут представлять интерес для биотехнологии как продуценты ферментов, устойчивых в щелочной среде с повышенной минерализацией.

4.6. Влияние состава сред культивирования на гидролитическую активность наиболее перспективного изолята *P. peli* 3-Т, обладающего липазной активностью

Как упоминалось ранее, бактериальные липолитические ферменты находят широкое применение в различных отраслях промышленности, таких как сельское хозяйство, химическая, пищевая, текстильная и деревообрабатывающая промышленность, фармацевтика, а также в биоремедиации и биodeградации, конструировании биосенсоров и контроле загрязнения окружающей среды. Липазы применяются в качестве обезжиривающих агентов, для получения свободных жирных кислот из природных триглицеридов, используются в качестве добавок в корма животных для повышения способности их к усвоению. Большой интерес представляют препараты микробных липаз в связи с проблемой очистки сточных вод и загрязнения окружающей среды.

Микроорганизмы способны продуцировать необходимые ферменты на питательных средах в промышленных условиях. Изменяя состав питательной среды и условия культивирования, возможно регулировать ферментативную активность микроорганизмов.

Для исследования кинетики роста и липолитической активности использовали штамм 3-Т, проявивший наибольшую активность липазы, выделенный из образцов старой карты шламонакопителя и идентифицированный как *Pseudomonas peli*. Культуру выращивали в течение 7-8 суток на минеральной среде Пфеннига. Источник азота варьировали, добавляя в среду мочевины, хлорид аммония и нитрат аммония в концентрации 0,03%. Источником углерода служили оливковое масло, подсолнечное масло, глицерин, твин-20 и твин-80 в концентрации 1%. Концентрацию наилучшего источника углерода варьировали в диапазоне 0,1 – 1,5%. В результате различных комбинаций источника азота с источником углерода выявили различия по накоплению биомассы и активности липазы.

В результате эксперимента было установлено, что наилучшим источником углерода для накопления биомассы бактерий *P. peli* 3-Т является глицерин (рис. 10-12). При использовании глицерина в среде в концентрациях от 0,1 до 1,5% максимальный рост культуры отмечен при концентрации 0,5%.

Максимальное накопление биомассы происходило в среде с глицерином, содержащей в качестве источника азота мочевины (рис. 10).

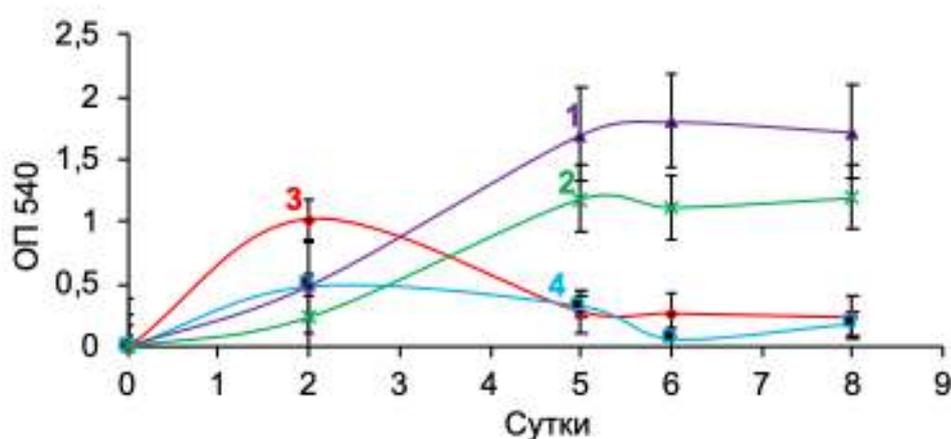


Рисунок 10 – Рост *Pseudomonas peli* 3-Т на среде с мочевиной в качестве источника азота и 1 – глицерином, 2 – твин-20, 3 – подсолнечным маслом, 4 – оливковым маслом в качестве источника углерода

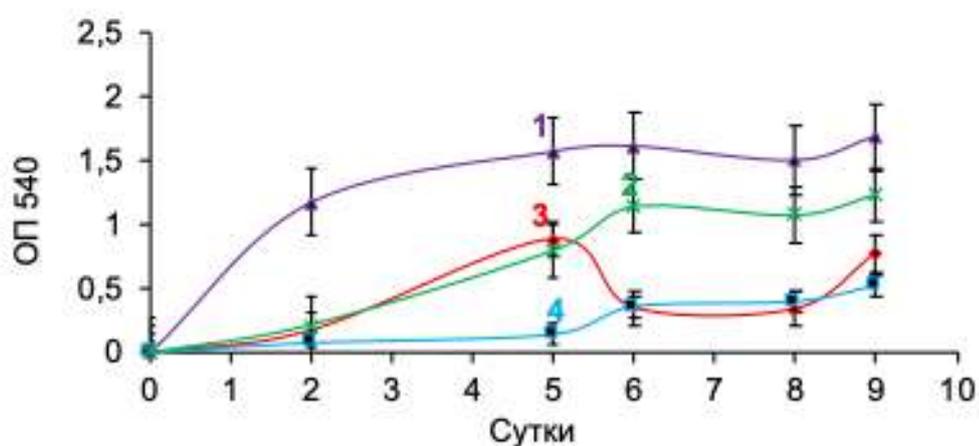


Рисунок 11 – Рост *Pseudomonas peli* 3-Т на среде с хлоридом аммония в качестве источника азота и 1 – глицерином, 2 – твин-20, 3 – подсолнечным маслом, 4 – оливковым маслом в качестве источника углерода

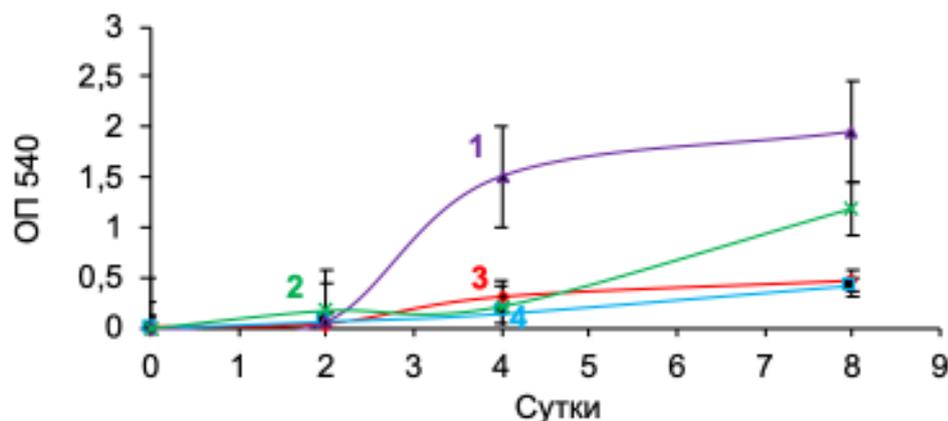


Рисунок 12 – Рост *Pseudomonas peli* 3-Т на среде с нитратом аммония в качестве источника азота и 1 – глицерином, 2 – твин-20, 3 – подсолнечным маслом, 4 – оливковым маслом в качестве источника углерода

Источником углерода, также хорошо поддерживающим рост бактерий, был твин-20. Однако во всех вариантах при росте на нем наблюдалась более длительная фаза адаптации, что, вероятно, связано с индукцией липолитической активности.

Растительные масла, подсолнечное и оливковое, утилизировались клетками псевдомонад во всех вариантах опыта, однако при росте на среде с мочевиной рост на этих субстратах был максимален, а фаза адаптации практически отсутствовала. Некоторое снижение ОП540 в процессе роста на растительных маслах было связано с агрегацией клеток и ростом культуры в виде хлопьевидных агрегатов. Меньший выход биомассы *P. peli* 3-Т на среде с растительными маслами, очевидно, был связан с гидрофобностью и меньшей биодоступностью субстрата.

Показано, что при росте на среде с мочевиной с использованием в качестве источников углерода глицерина или подсолнечного масла происходило значительное увеличение липолитической активности. В надосадочной жидкости активность липазы достигала 0,62 мкмоль/мин/л, тогда как на других источниках азота внеклеточная липазная активность не превышала 0,24 мкмоль/мин/л. В меньшей степени активность внеклеточной

липазы индуцировалась в присутствии оливкового масла. Присутствие твин-20 не вызывало индукции этой активности.

Липолитическая активность, связанная с клетками, достигала 3,02 мкмоль/мин/г в среде с мочевиной и глицерином, в сравнении с другими вариантами, где её максимальный уровень составлял 0,55 мкмоль/мин/г. В меньшей степени индукция ассоциированной с клетками активности наблюдалась при использовании твин-20. Присутствие в качестве субстратов растительных масел практически не сопровождалось индукцией ассоциированной с клетками липазы.

Таким образом, установлено, что мочевина способствует индукции липазной активности (табл. 10). Внеклеточная липаза индуцируется при использовании в качестве субстратов глицерина или растительных масел. Уровень ассоциированной с клетками активности возрастает при использовании глицерина или твин-20.

Таблица 10 – Ростовые характеристики и липазная активность штамма *Pseudomonas peli* 3-Т в зависимости от различных сочетаний источников углерода и азота, дающих наиболее выраженный эффект

Показатели	Урожай биомассы, г/л	Активность липазы, мкмоль/мин/л	Удельная скорость роста (μ) в лог-фазе, ч ⁻¹	Экономический коэффициент потребления субстрата (Y), %
Субстрат, источник азота				
Глицерин (1%); мочевины (0,03%)	9,3	0,6	0,03	93
Глицерин (0,5%); мочевина (0,03%)	6,9	1,26	0,08	138
Твин – 20 (1%); мочевина (0,03%)	6,4	0,06	0,04	64
Глицерин (1%); NH ₄ Cl (0,03%)	9,1	–	0,04	91
Твин – 20 (1%); NH ₄ Cl (0,03%)	6,1	0,1	0,04	61
Глицерин (1%); NH ₄ NO ₃ (0,03%)	10,5	0,001	0,41	105

В результате экспериментов по оптимизации среды культивирования перспективного в биотехнологическом отношении штамма *P. peli* – продуцента липазы, был скорректирован ее состав, обеспечивающий

получение максимального количества активной биомассы. В качестве основы предложена среда Пфеннига: NH_4Cl – 0,3; KH_2PO_4 – 0,3; MgCl_2 – 0,3; CaCl_2 – 0,03; дрожжевой экстракт – 0,5; раствор микроэлементов по Липперту-Витману – 1 мл (Рандагуруева, Лаврентьева, 2009), источник углерода – глицерин (0,5%); источник азота - мочеви́на (0,03%).

ГЛАВА 5. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФАКУЛЬТАТИВНОГО АЛКАЛОФИЛА *Bacillus aequororis* 5-ДБ, ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА

Потребность в хлориде натрия и толерантность к высоким концентрациям солей у различных видов бактерий варьирует. Общим свойством алкалофильных микроорганизмов является их способность расти в щелочной среде, характеризующейся также высокой степенью минерализации. Алкалофильные и галофильные микроорганизмы обладают специализированными механизмами адаптации клетки для сохранения жизнеспособности в щелочной и высокоминерализованной окружающей среде. Так, для поддержания мембранного электрохимического потенциала алкалофильным микроорганизмам требуется катион натрия.

Нами был проведен ряд исследований, целью которых было выявление особенностей адаптивного ответа алкалофильного штамма бацилл в среде с высокой концентрацией соли и в широком диапазоне рН в сравнении с нейтрофильным представителем того же рода. В качестве исследуемых реакций отмечали изменения морфологии и топографии поверхности, внутриклеточного рН и общего уровня метаболизма.

Объектом исследований являлся штамм 5-ДБ, выделенный на полноценной среде с рН 11, проявивший высокую активность амилазы и идентифицированный как *Bacillus aequororis*. Для сравнения использовали коллекционный штамм *Bacillus subtilis* ATCC 6633, который является нейтрофильным.

5.1. Влияние концентрации хлорида натрия и рН на рост и гидролитическую активность *Bacillus aequororis*

Изучили динамику роста факультативного алкалофила *Bacillus aequororis* 5-ДБ и нейтрофильной коллекционной культуры *Bacillus subtilis*

АТСС 6633 (в качестве сравнения) на слабо- и высокощелочной среде. Показано, что *B. aequororis* 5-ДБ накапливает значительно большую биомассу по сравнению с *B. subtilis* АТСС 6633, как на среде с рН 11, так и на среде с рН 8 (рис. 1 а, б).

Оптическая плотность суспензии *B. subtilis* АТСС 6633 при росте на богатой среде с рН 11 не превышала 0,15. При росте *B. aequororis* 5-ДБ в этих условиях наблюдалась короткая фаза экспоненциального роста (10 ч), на среде с рН 8 она удлинялась до 72 ч. Удельная скорость роста в экспоненциальной фазе при культивировании *B. aequororis* 5-ДБ на среде с рН 11 и 8 составляла 0,012 и 0,117 ч⁻¹, соответственно. Стационарная фаза роста *B. aequororis* 5-ДБ на обеих средах была длительной и волнообразной, рост сопровождался временным увеличением оптической плотности, сменяющимся ее снижением. Полного отмирания не наблюдалось, *B. aequororis* 5-ДБ на среде с рН 11 в течение изучаемого периода сохранял жизнеспособность, что подтверждалось высевом на агаризованную среду.

Таким образом, рост *B. aequororis* 5-ДБ на среде с рН 11 был достаточно выражен, хотя накопление биомассы, удельная скорость роста и продолжительность фазы активного роста были ниже, чем на среде с рН 8. На среде с рН 8 данный штамм рос только после последовательных пересевов и адаптации.

Изучено влияние различных рН и концентрации NaCl на липолитическую и амилолитическую активность алкалофильного штамма *B. aequororis* 5-ДБ. Существенных отличий по активности амилазы при воздействии хлорида натрия в концентрации 0,5 и 50 г/л не установлено. Однако при защелачивании среды активность увеличивалась. Максимальная активность отмечена при рН 11 и 50 г/л NaCl (рис. 13).

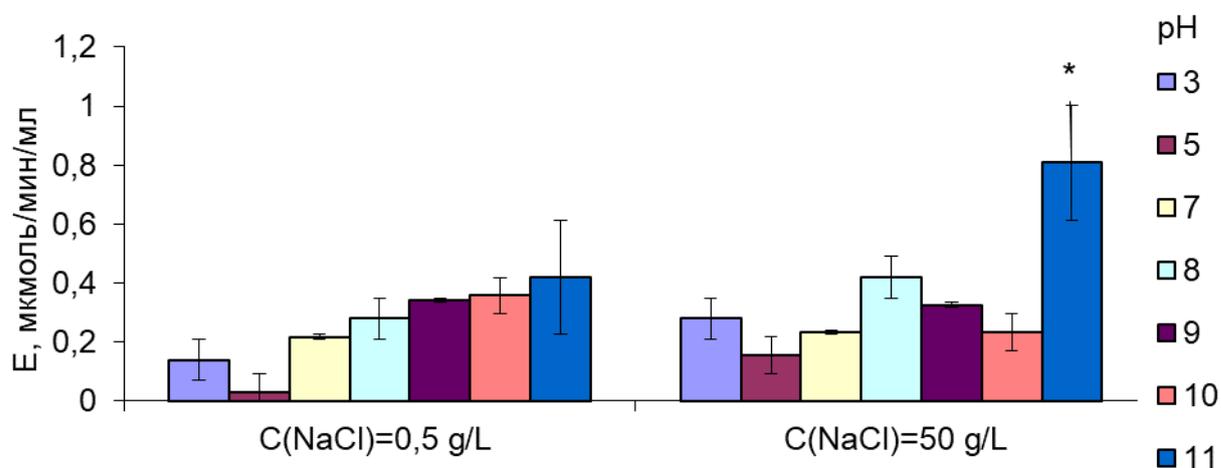


Рисунок 13 – Амилолитическая активность в супернатанте культуры *Bacillus aequororis* 5-ДБ при различных концентрациях NaCl и pH (* $p < 0,05$)

Липолитическая активность в сравнении с амилолитической оказалась ниже, но для нее также характерно увеличение при защелачивании среды. Максимум активности отмечен при pH 11 и 50 г/л NaCl (рис. 14).

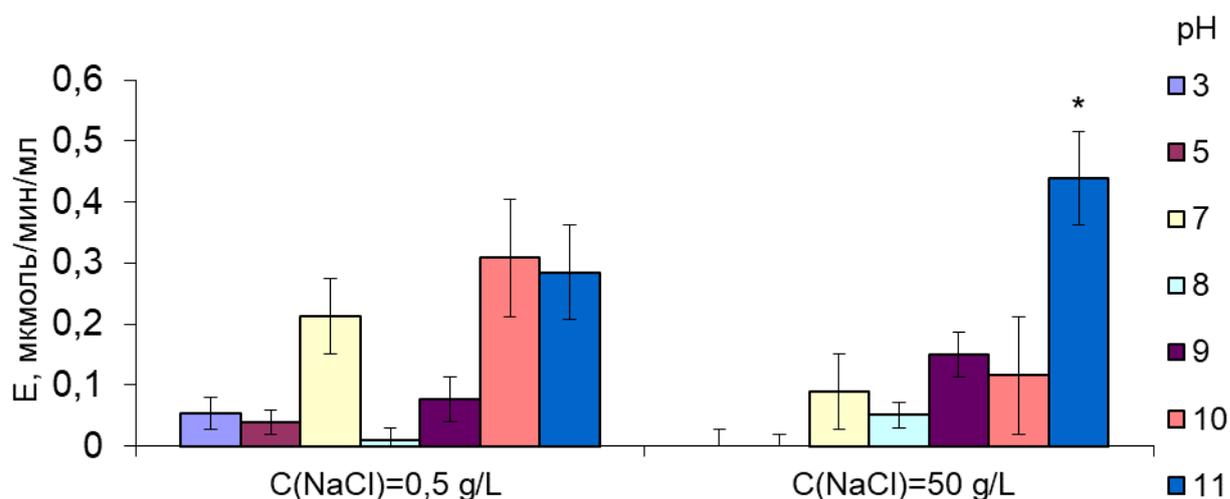


Рисунок 14 – Липолитическая активность в супернатанте культуры *Bacillus aequororis* 5-ДБ при различных концентрациях соли и pH (* $p < 0,05$)

Показано, что ферментативная активность проявляется в широком интервале рН от 3 до 11. Интересным фактом является повышение активности при сочетании высокой концентрации соли и рН 11, что может быть связано с активацией мембранных транспортных процессов в щелочной среде.

5.2. Влияние концентрации хлорида натрия и рН на уровень метаболической активности *Bacillus aequororis* 5-ДБ

Для оценки влияния кислотности и концентрации соли в среде на уровень метаболической активности клеток алкалофильного штамма *Bacillus aequororis* 5-ДБ, выделенного из образцов старой карты шламонакопителя, и штамма сравнения *Bacillus subtilis* ATCC 6633, культуры окрашивали препаратом PrestoBlue HS, выявляющим физиологически-активные клетки. Культуры предварительно выращивали на полноценной среде, затем инкубировали в солевом растворе с концентрацией NaCl 0,5 или 50 г/л при разных значениях рН (3, 5, 7, 8, 9, 11, 13) в течение 2-х или 48 часов. При окрашивании содержащийся в препарате резазурин в активно метаболизирующих клетках трансформируется в интенсивно флуоресцирующее производное. Таким образом были выявлены физиологически-активные клетки бацилл при разных сочетаниях описанных условий.

В качестве культуры сравнения в тех же экспериментальных условиях был взят штамм *B. subtilis* ATCC 6633, нормальными для роста которого являются значения кислотности, близкие к слабощелочным, но не экстремальным.

Таким образом, была исследована физиологическая активность культур двух видов бацилл при различных рН в 4-х вариантах инкубации:

- 1 – время воздействия 2 ч, 0,5 г/л NaCl;
- 2 – время воздействия 48 ч, 0,5 г/л NaCl;
- 3 – время воздействия 2ч, 50 г/л NaCl;
- 4 – время воздействия 48 ч, 50 г/л NaCl.

Показано, что при рН 3 во всех вариантах физиологическая активность клеток обеих культур является крайне низкой или отсутствует (рис. 15).

При кратковременной адаптации (2 часа) культура *B. subtilis* ATCC 6633 проявляла также низкую физиологическую активность при концентрации соли 0,5 г/л. При 50 г/л NaCl и инкубации в течение 2-х часов метаболическая активность практически отсутствовала. Адаптация в течение 48 часов возвращала физиологическую активность клеток как при низкой, так и при высокой концентрации соли, с явным максимумом при рН 9.

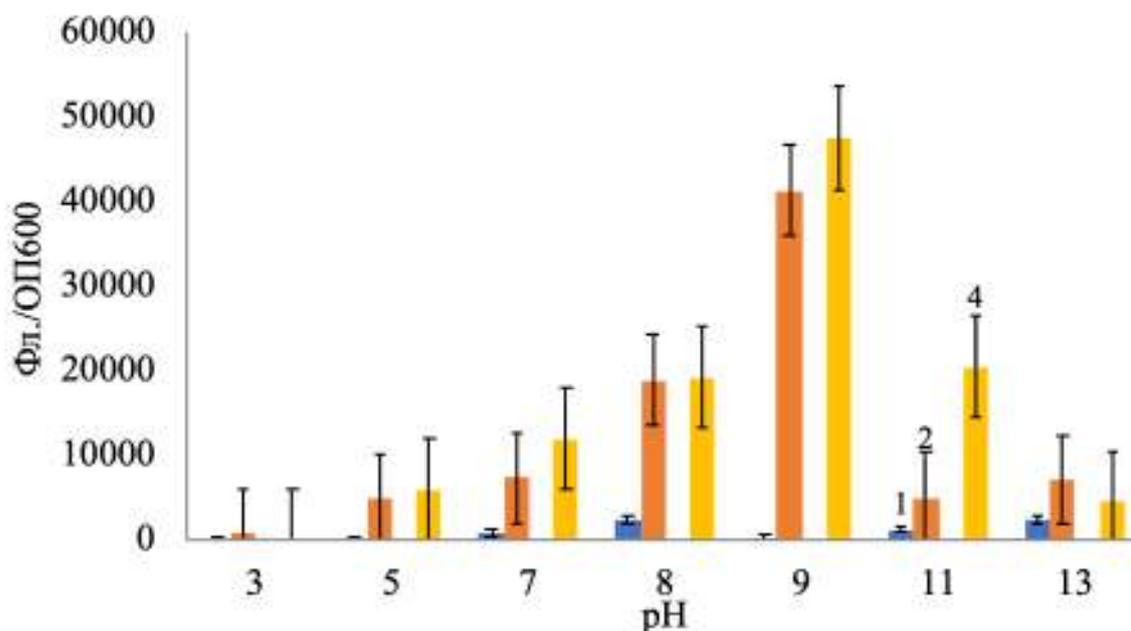


Рисунок 15 – Количество активно метаболизирующих клеток *B. subtilis* ATCC 6633 в условиях: 1 – адаптация 2 ч, 0,5 г/л NaCl; 2 – адаптация 48 ч, 0,5 г/л NaCl; 3 – адаптация 2ч, 50 г/л NaCl; 4 – адаптация 48 ч, 50 г/л NaCl.

В случае *B. aequororis* 5-ДБ высокая физиологическая активность проявлялась примерно на одинаковом уровне в широком диапазоне рН (от 5 до 11) (рис. 16). При этом максимальная активность проявлялась в условиях 2-х часовой инкубации. Инкубация в течение 48-и часов приводила к существенному снижению метаболической активности на 22-68 %. Снижение метаболизма данного штамма может быть связано с условиями голодания по

органическому субстрату: в отсутствие источника энергии в течение 48 ч замедляется катаболизм и подавляется активное функционирование дыхательной цепи, следовательно, и других сопряженных систем, в том числе протонных и натриевых АТФаз, антипортера натрия и протонов, играющего решающую роль в энергетике алкалофилов при высоком рН среды. Однако клетки сохраняют свою жизнеспособность, а часть популяции – метаболическую активность.

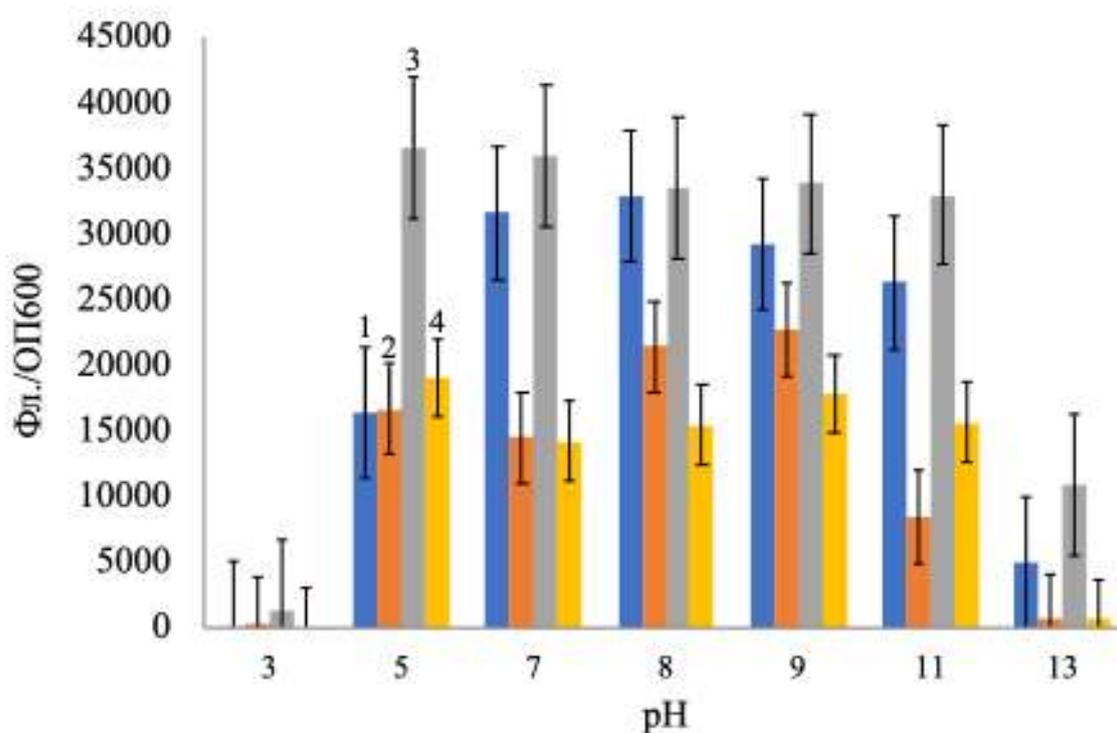


Рисунок 16 – Количество активно метаболизирующих клеток *B. aequororis* 5-ДБ в условиях: 1 – адаптация 2 ч, 0,5 г/л NaCl; 2 – адаптация 48 ч, 0,5 г/л NaCl; 3 – адаптация 2ч, 50 г/л NaCl; 4 – адаптация 48 ч, 50 г/л NaCl.

Таким образом, *B. subtilis* ATCC 6633 для проявления физиологической активности нуждался в длительной адаптации и проявлял наиболее выраженную метаболическую активность при рН 9. *B. aequororis* 5-ДБ не нуждался в предварительной адаптации и проявлял сходный уровень метаболической активности в широком диапазоне рН от 5 до 11. Однако *B. subtilis* ATCC 6633 был более устойчив к 48-часовому отсутствию субстрата,

что выражалось в отсутствии подавления метаболической активности после этого периода голодания.

5.3. Влияние концентрации хлорида натрия и pH на морфологию *Bacillus aequororis* 5-ДБ

Для изучения адаптационных свойств бактерий, которые проявляются в обратимых или необратимых изменениях поверхностных структур клеток, широко применяется метод атомно-силовой микроскопии. Применение данного метода позволило визуализировать и оценить морфологию и структурные особенности поверхности *Bacillus aequororis* 5-ДБ при разном pH и концентрации NaCl в среде. В качестве штамма сравнения использовали штамм *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Морфометрические данные представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Изменение морфометрических показателей клеток *B. aequororis* 5-ДБ и *B. subtilis* ATCC 6633 в зависимости от pH среды и концентрации хлорида натрия

Условия инкубации (NaCl, г/л / pH)	Шероховатость, нм (RMS± Average Deviation)	Длина, мкм	Ширина, мкм	Высота, мкм	V, мкм ³
1	2	3	4	5	6
<i>B. aequororis</i> 5-ДБ					
0,5/11 (контроль)	75,00±59,36	1,79±0,02	1,15±0,31	0,23±0,02	2,01
0,5/8 (0ч)	104,95±82,58	1,33±0,08	0,97±0,01	0,23±0,01	1,24
0,5/8 (24ч)	95±76,05	1,72±0,05	0,76±0,03	0,27±0,01	1,47
50/11 (0ч)	126,72±97,87	2,06±0,02	0,70±0,02	0,25±0,03	1,51
50/11 (24ч)	108,47±85,74	1,52±0,11	0,89±0,03	0,28±0,02	1,56
50/8 (0ч)	141,56±112,82	2,91±0,04	0,70±0,02	0,23±0,00	1,96
50/8 (24ч)	98,41±79,66	1,44±0,05	0,74±0,02	0,31±0,01	1,36
pH 5 (0ч)	81,527±65,468	2,1±0,19	1,07±0,07	0,3±0,005	2,82
pH 5 (24ч)	95,355±76,113	2,87±0,05	0,78±0,04	0,21±0,01	1,97

Продолжение таблицы 11.

1	2	3	4	5	6
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633					
0,5/8 (контроль)	77,35±61,49	3,97±0,05	0,74±0,02	0,27±0,01	3,24
0,5/11 (0ч)	96,975±80,49	4,28±0,39	1,54±0,22	0,20±0,01	5,52
0,5/11 (24ч)	58,78±48,81	2,66±0,16	0,69±0,01	0,14±0,01	1,04
50/11 (0ч)	101,48±83,65	2,14±0,12	0,74±0,00	0,27±0,01	1,79
50/11 (24ч)	66,62±52,32	2,94±0,08	0,76±0,02	0,17±0,08	1,60
50/8 (0ч)	135,56±111,59	1,10±0,32	0,70±0,02	0,34±0,00	1,10
50/8 (24ч)	144,17±120,59	4,96±0,06	1,15±0,12	0,33±0,02	7,87
pH 5 (0ч)	105,796±88,090	3,38±0,04	0,94±0,02	0,29±0,04	3,86
pH 5 (24ч)	101,912±77,188	3,23±0,13	0,82±0,09	0,31±0,01	3,44

Показано, что кратковременное воздействие среды с концентрацией NaCl 50 г/л приводило к возрастанию шероховатости поверхности как алкалофильного *B. aequororis* 5-ДБ, так и нейтрофильного *B. subtilis* ATCC 6633, тогда как при суточной адаптации этот показатель снижался, за исключением воздействия 50 г/л и pH 8 на *B. subtilis* ATCC 6633.

При инкубации бактерий *B. aequororis* 5-ДБ в среде с pH 8 и 50 г/л NaCl (штамм предварительно был выращен на среде с pH 11, 0,5 г/л NaCl) наблюдалось увеличение шероховатости клеток на 38%, а их объём сокращался на 62%. Через сутки шероховатость поверхности составляла 26 и 35% от контроля, соответственно. Возрастание шероховатости может быть связано с незначительным снижением тургора при потере клеткой воды в высокоминерализованной среде. Остальные морфометрические показатели у *B. aequororis* 5-ДБ изменялись слабо, как и объём клетки, который во всех вариантах опытов был несущественно ниже контроля. Однако у штамма нейтрофильных бацилл отличия во всех показателях были значительны, объём клетки снижался почти вдвое, а в варианте опыта с 50 г/л соли и pH 8 после суток адаптации значительно увеличивался за счет длины клеток. При защелачивании среды (pH 11) и 0,5 г/л NaCl в среде наблюдалось незначительное увеличение шероховатости клеток (на 25%), а также

увеличение линейных размеров. Объем клеток при этом возрастал на 70%. Однако после суток инкубации наблюдалось снижение шероховатости на 33% и уменьшение объема клеток в 3 раза по сравнению с контрольным вариантом. Таким образом, изменения морфологии клеток нейтрофильного штамма в высокоминерализованной щелочной среде были гораздо более выражены.

При инкубации в кислой среде (рН 5) шероховатость поверхности *V. aequororis* 5-ДБ существенно не отличалась от контроля, а объем клеток увеличивался на 40%. При инкубации на данной среде в течение суток наблюдалось небольшое увеличение шероховатости и существенное удлинение клеток. При помещении клеток *Bacillus subtilis* ATCC 6633 в среду с рН 5 независимо от времени инкубации в ней на 31-35% увеличивалась шероховатость клеток, а также наблюдалось их некоторое укорачивание и увеличение поперечных размеров относительно контроля.

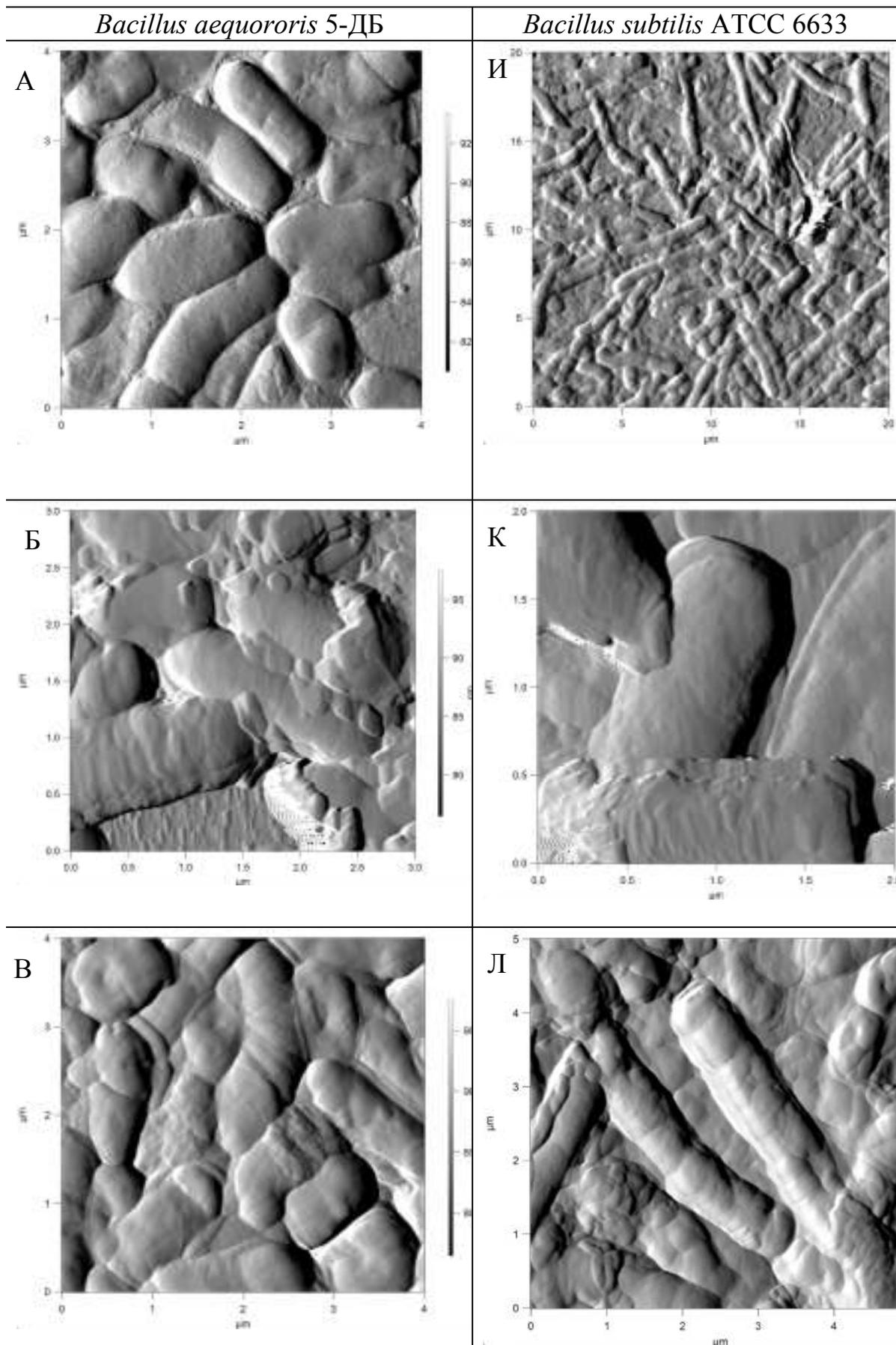
Также для оценки изменений клеточной структуры рассчитали показатели: индекс I , который представляет отношение ширина/высота и отражает защиту бактериальной клетки от внешних воздействий, и коэффициент K , представляющий собой отношение $I_{\text{контроль}}/I_{\text{эксперимент}}$, с помощью которого можно провести оценку воздействия различных условий на клетки. Чем выше значение этого коэффициента, тем сильнее влияние внешних факторов, а именно рН и различной концентрации хлорида натрия на клетку (Ерохин, 2015). Показано, что морфометрические параметры микробных клеток претерпевают определенные изменения (табл. 12).

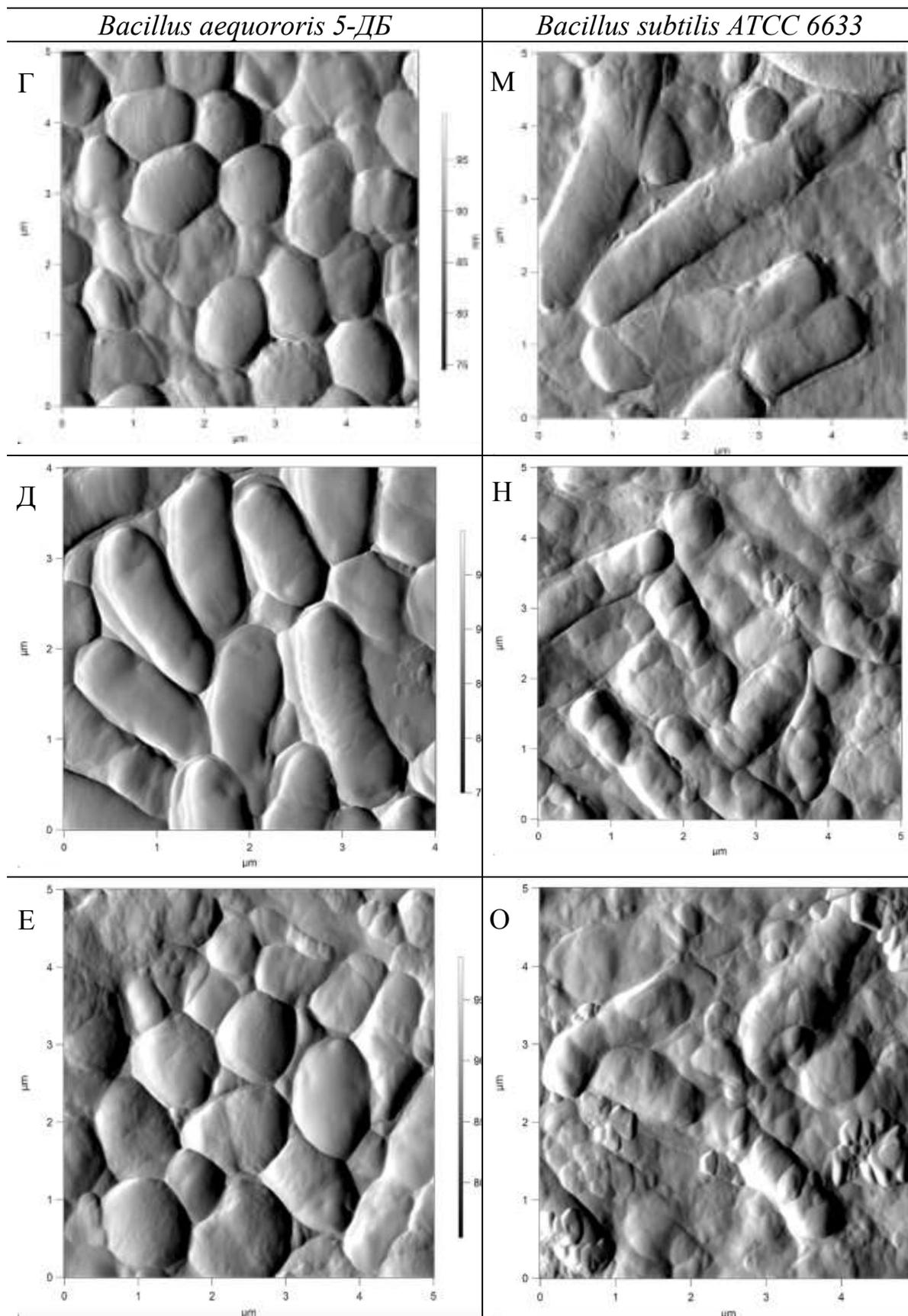
Таблица 12 – Количественные показатели изменений морфологии бактерий

NaCl, г·л ⁻¹ / рН	Индекс I (ширина/высота)	Индекс К (I _{контроль} /I _{эксперимент})
<i>B. aequororis</i> 5-ДБ		
0,5/11 (контроль)	4,93	
0,5/8 (0ч)	4,22	1,17
0,5/8 (24ч)	2,79	1,77
50/11 (0ч)	2,80	1,76
50/11 (24ч)	3,19	1,54
50/8 (0ч)	3,04	1,62
50/8 (24ч)	2,43	2,03
рН 5 (0ч)	3,57	1,38
рН 5 (24ч)	3,71	1,33
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		
0,5/8 (контроль)	2,77	
0,5/11 (0ч)	2,06	1,35
0,5/11 (24ч)	5,04	0,55
50/11 (0ч)	2,74	1,01
50/11 (24ч)	4,38	0,63
50/8 (0ч)	2,06	1,35
50/8 (24ч)	3,48	0,80
рН 5 (0ч)	3,24	0,86
рН 5 (24ч)	2,65	1,05

Получены АСМ-изображения клеток *B. aequororis* 5-ДБ и *B. subtilis* ATCC 6633 после инкубации в условиях, отличных от контроля для данного штамма (рис 17). Контролем являлись условия, повторяющие таковые культивирования: для *B. aequororis* 5-ДБ – 0,5 г/л NaCl в среде и рН 11, для *B. subtilis* ATCC 6633 – 0,5 г/л NaCl в среде и рН 8. Клетки *B. aequororis* 5-ДБ при воздействии 50 г/л NaCl в среде имели менее ровную поверхность, отмечалось скопление кристаллов соли, а после суточной адаптации в среде с рН 8 и 50 г/л NaCl клетки представляли собой короткие утолщенные палочки, визуальнo отличающиеся от контроля. Клетки *B. subtilis* ATCC 6633 при воздействии высокоминерализованной среды имели неровные очертания и выраженную шероховатость поверхности, в препаратах отмечалось много

неидентифицированных структур, по-видимому, являющихся клеточными обломками. Воздействие кислой среды (рН 5) на клетки *B. subtilis* ATCC 6633 визуально более выражено, поверхность клеток неровная и после двухчасовой, и после суточной адаптации. После суток инкубации в кислой среде наблюдается лизис клеток и присутствие клеточных обломков в препарате. В то же время, *B. aequororis* 5-ДБ более устойчив к рН 5, клетки после двухчасового воздействия ровные, имеют гладкую поверхность, после суток воздействия шероховатость поверхности увеличивается, лизис клеток незначителен.





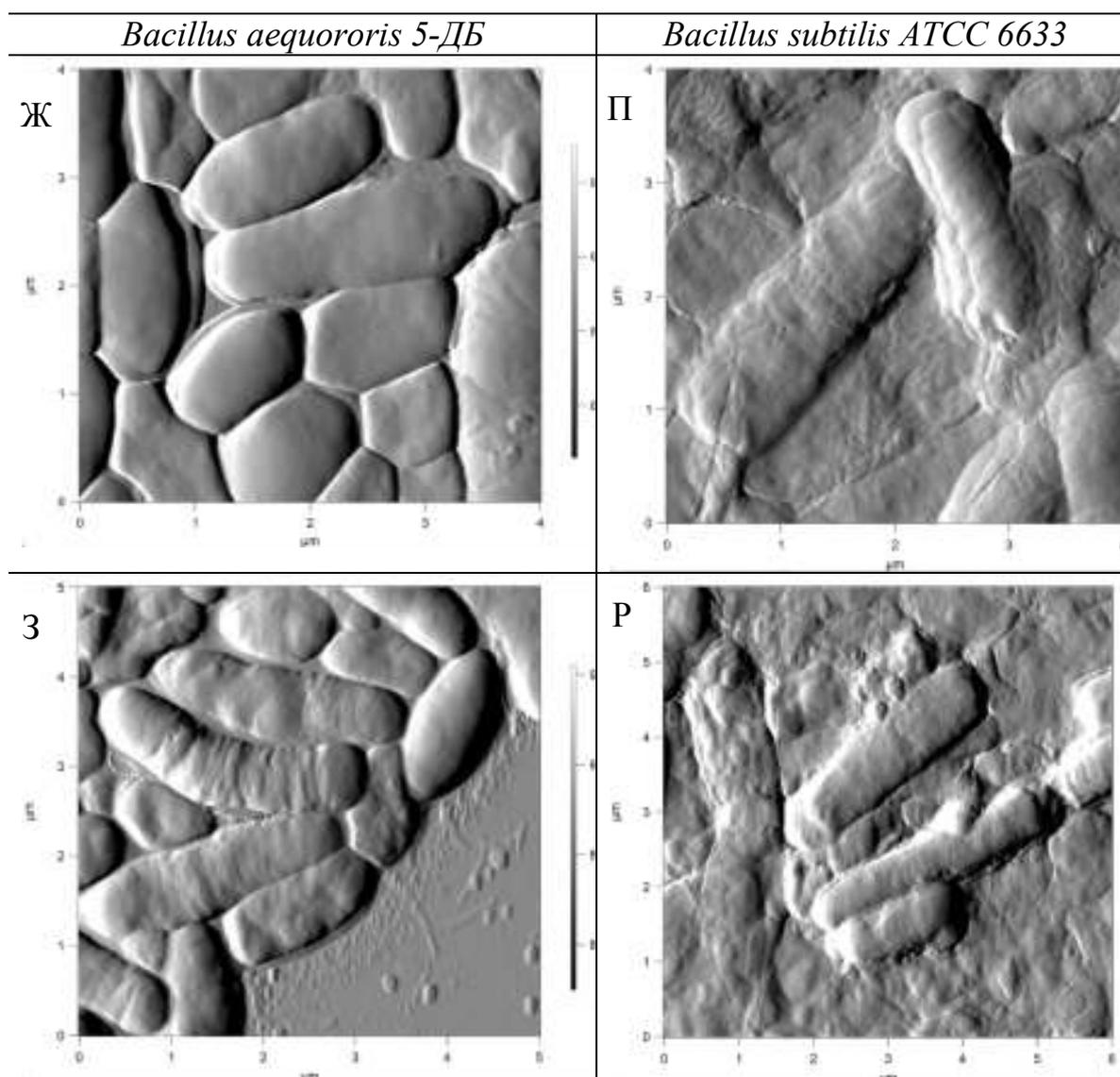


Рисунок 17 – АСМ-изображения клеток *B. aequororis* 5-ДБ: А – 0,5 г/л NaCl, pH 11 (контроль); Б – 50 г/л NaCl, pH 11 (сразу); В – 50 г/л NaCl, pH 11 (адаптация сутки); Г – 0,5 г/л NaCl, pH 8 (сразу); Д – 0,5 г/л NaCl, pH 8 (адаптация сутки); Е – 50 г/л NaCl, pH 8 (адаптация сутки); Ж – pH 5 (сразу); З – pH 5 (адаптация сутки). *B. subtilis* ATCC 6633: И – 0,5 г/л NaCl, pH 8 (контроль); К – 50 г/л NaCl, pH 8 (сразу); Л – 50 г/л NaCl, pH 8 (адаптация сутки); М – 0,5 г/л NaCl, pH 11 (сразу); Н – 0,5 г/л NaCl, pH 11 (адаптация сутки); О – 50 г/л NaCl, pH 11 (адаптация сутки); П – pH 5 (сразу); Р – pH 5 (адаптация сутки)

Таким образом, установлено, что морфология клеток алкалофильного *B. aequororis* 5-ДБ менее подвержена изменениям в среде с высокой

концентрацией соли (50 г/л), чем нейтрофильного *B. subtilis* ATCC 6633, клетки которого значительно уменьшаются в размерах, а после суточной адаптации к 50 г/л NaCl при pH 8, наоборот, увеличиваются в объеме за счет удлинения. Клетки *B. aequororis* 5-ДБ, являясь преадаптированными к высокой минерализации и щелочной среде, мало изменяются под влиянием условий, отличных от таковых культивирования. Шероховатость поверхности клеток и нейтрофильного, и алкалофильного штамма бацилл незначительно увеличивалась при возрастании концентрации соли в среде, что может говорить о потере воды клеткой, особенно на первых этапах адаптации к высокому содержанию соли. Интересным фактом является повышенная устойчивость факультативного алкалофила *B. aequororis* 5-ДБ к низкому pH, что является подтверждением общей неспецифической адаптивной способности данного штамма к неблагоприятным условиям окружающей среды.

5.4. Влияние концентрации хлорида натрия и pH среды на внутриклеточный pH *Bacillus aequororis* 5-ДБ

Кислотность среды (концентрация водородных ионов, pH) является важным фактором, определяющим возможность существования прокариотов. Концентрация ионов водорода в окружающей среде действует на организм прямо (непосредственное воздействие протонов) или косвенно (через влияние на ионное состояние и доступность многих неорганических ионов и метаболитов, стабильность макромолекул, равновесие электрических зарядов на поверхности клетки). Следовательно, микроорганизмам, обитающим в экстремальных условиях, а именно в щелочных средах, необходимо иметь клеточные механизмы, которые способствуют удалению из клетки ионов H^+ или OH^- и поддерживают внутриклеточный pH в области, близкой к нейтральной. В поддержании разницы между внутриклеточным и внешним pH участвуют как метаболические процессы (протонные или анионные насосы), так и клеточные барьеры (клеточная стенка и цитоплазматическая

мембрана), которые обеспечивают в итоге устойчивость этих организмов к экстремальному рН.

У облигатных алкалофилов пока не обнаружено каких-либо особенностей в строении и химическом составе их клеточных стенок и цитоплазматической мембраны. Алкалофилы представляют большой интерес с точки зрения их энергетики, так как при культивировании в оптимальных условиях (рН 9,0-10,5) концентрация H^+ во внешней среде, как правило, ниже, чем в клеточной цитоплазме (рН 8-9) и, следовательно, создание протонного градиента в соответствии с хемиосмотической теорией Питера Митчелла встречает определенные трудности. Было показано, что алкалотолерантные и алкалофильные бактерии при работе дыхательной электронтранспортной цепи откачивают во внешнюю среду не протоны, а ионы натрия. Получено доказательство существования в мембране, генерирующей натриевый потенциал, Na^+ -зависимой АТФ-синтазы, способной синтезировать АТФ за счет $\Delta\mu Na^+$. Все ли алкалофильные и алкалотолерантные бактерии могут таким путем получать энергию, не известно. Однако есть данные о том, что облигатные алкалофилы сохранили способность синтезировать АТФ с участием H^+ -АТФ-синтазы. Поскольку ΔpH у них имеет противоположную направленность, движущей силой служит электрический компонент – $\Delta\psi$, значение которого может достигать 150-180 мВ (Gandbhir et al., 1995; Liu et al., 2005; Yang et al., 2006; Meng et al., 2014; Zhang et al., 2014).

Нами были получены данные об изменении внутриклеточного рН (pH_{in}) алкалофильного *Bacillus aequororis* и нейтрофильного *Bacillus subtilis* при изменении внеклеточного рН (pH_{out}). Для измерения рН в работе использовали флуоресцентный зонд cFSE (5 (и 6-)-карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловый эфир). Флуоресценция cFSE зависит от рН, зонд в виде диацетатного эфира cFDASE поглощается бактериями во время инкубации. При включении в клетку его сукцинимидильная группа образует конъюгаты с алифатическими аминами. Флуоресценцию можно обнаружить только

после расщепления эфира внутриклеточной эстеразой. Карбоксифлуоресцеин, представляющий собой ратиометрический рН-зонд, не проявляет чувствительности к рН при возбуждении излучением с длиной волны 440 нм и имеет максимальную рН-чувствительность при возбуждении на длине волны 490 нм. После получения флуоресцентного сигнала на каждой длине волны возбуждения, было вычислено независимое от концентрации соотношение между рН-чувствительными и нечувствительными к рН сигналами. В данном методе отсутствует утечка флуоресцентного зонда cFSE, что обеспечивает точную калибровку сигнала флуоресценции.

Полученные экспериментальные данные соотносили с данными калибровочной кривой, построенной для исследуемых культур микроорганизмов (рис. 18).

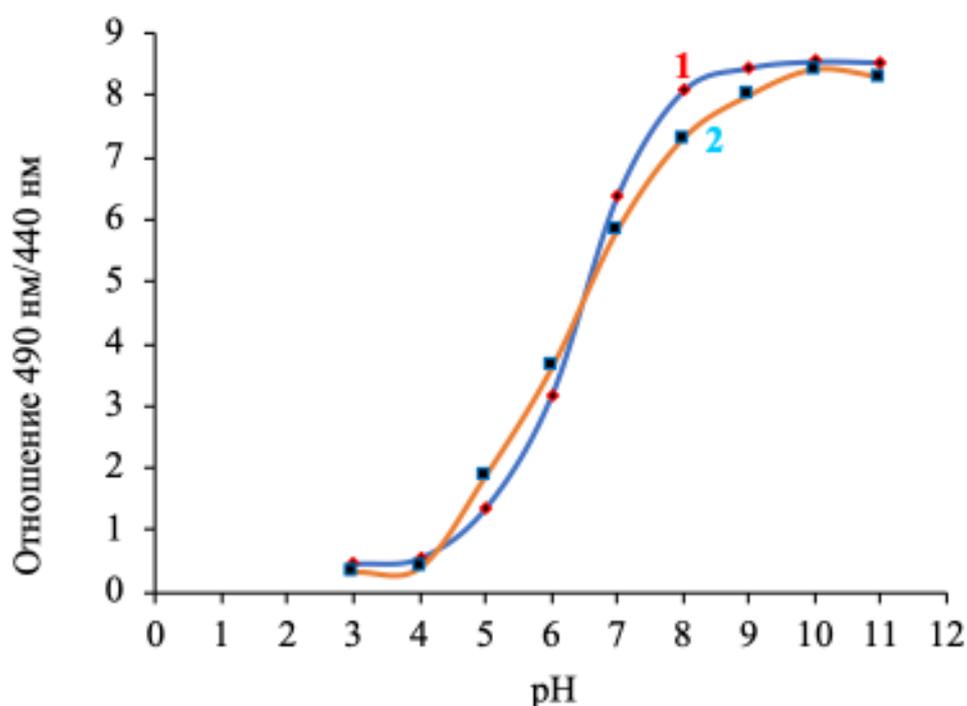


Рисунок 18 – Взаимосвязь между рН и отношением (490 нм к 440 нм) cFSE в клетках *Bacillus subtilis* (1) и в клетках *Bacillus aequororis* (2). рН_{in} и рН_{out} были уравновешены инкубацией с валиномицином (1 мкМ) и нигерицином (1 мкМ).

Установлено, что для обеих культур почти во всех образцах внутриклеточный рН ниже внеклеточного (табл. 13, 14), что является нормой для алколофильных микроорганизмов. Нейтрофилы, растущие при рН 7 имеют маленький ΔpH , сопровождаемый значительным $\Delta\psi$, отрицательным внутри. У алкалофилов внутриклеточный рН значительно ниже внешнего, $\Delta\psi$ алкалофилов выше, чем у нейтрофилов, но он частично компенсируется большим «реверсивным» ΔpH .

Таблица 13 – Изменение pH_{in} в клетках *Bacillus aquovororis* в среде с разной концентрацией соли и рН

Концентрация NaCl, г/л	pHout	pH _{in}	\Delta pH	pH _{in}	\Delta pH
		2 часа адаптации		48 часов адаптации	
0,5	3	4,4	1,4	4,4	1,4
	7	6,2	0,8	7,4	0,4
	8	7,7	0,3	7,4	0,6
	9	7	2	8,2	0,8
	11	8,6	2,4	9,3	1,7
50	3	3,9	0,9	3	0
	7	6	1	7,25	0,25
	8	7	1	7,2	0,8
	9	6,8	2,2	8	1
	11	7,9	3,1	9,1	1,9

Таблица 14 – Изменение рН_{in} в клетках *Bacillus subtilis* в среде с разной концентрацией соли и рН

Концентрация NaCl, г/л	рН _{out}	рН _{in}	ΔрН	рН _{in}	ΔрН
		2 часа адаптации		48 часов адаптации	
0,5	3	3	0	3	0
	8	7,6	0,4	7,5	0,5
	9	7,6	1,4	7,8	1,2
	11	9,1	1,9	8,3	2,7
50	3	3	0	3	0
	8	7,7	0,3	7,5	0,5
	9	7,6	1,4	7,9	1,1
	11	8,2	2,8	8,1	2,9

У культуры *B. aequororis* через 48 ч адаптации отмечено увеличение внутриклеточного рН в сравнении с адаптацией в течение 2-х ч, что можно объяснить отсутствием источника углерода в среде, и, следовательно, активного энергетического метаболизма, необходимого для работы натриевых АТФаз и Na⁺/H⁺ антипортера.

Таким образом, установлено, что *B. aequororis* имеет более широкий диапазон толерантности к крайним значениям рН. Даже при рН 3 отмечена небольшая разница в концентрации протонов в отличие от *B. subtilis*, где она равнялась нулю.

Также следует отметить, что у *B. aequororis* разница концентраций протонов ΔрН выше при рН 11, NaCl 50 г/л, чем при рН 11, NaCl 0,5 г/л и при рН 8 NaCl 0,5 и 50 г/л, следовательно, клетки находятся даже в более выгодном энергетическом состоянии. Создаваемый ΔрН является реверсивным, однако разница в концентрации протонов увеличивает значение электрического потенциала. Увеличение внешнего рН также дает клетке возможность лучше перенести высокую концентрацию соли, при этом обеспечивая более высокий ΔрН, то есть более выгодную энергетику.

Для культуры *B. subtilis* низкие значения рН являются губительными, а при защелачивании среды разница концентраций протонов повышается и

незначительно отличается от таковой у *B. aequororis*. Таким образом, даже нейтрофильные бациллы способны выдерживать высокий рН внешней среды, но при этом было показано, что факультативный алкалофил более устойчив к низкому рН за счет общей адаптивной способности. В экспериментах по определению гидролитической активности, уровня метаболизма, внутриклеточного рН и морфометрических показателей было отмечено, что сочетание высокий рН – высокая концентрация хлорида натрия (в наших экспериментах, рН 11 и 50 г/л NaCl) для клеток даже более благоприятно, чем сочетания слабощелочная среда – высокая концентрация NaCl (рН 8, 50 г/л) и высокий рН – низкая концентрация NaCl (рН 11, 0,5 г/л). Такая реакция клеток может быть связана с повышенной концентрацией ионов натрия, которая требуется для обеспечения энергетического метаболизма в щелочных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Техногенные щелочные местообитания характеризуются уникальными условиями среды. Следовательно, микробное сообщество в данном биотопе также является уникальным и обладает рядом физиологических особенностей, которые обусловлены средой обитания. В результате исследований нами впервые проведена оценка микробного сообщества в содовом шламохранилище АО «Березниковский содовый завод», расположенного на северо-западной окраине г. Березники Пермского края. Изучено изменение микробного состава при восстановлении территорий после эксплуатации (осушение, частичное восстановление растительного покрова). Для оценки микробного разнообразия были использованы молекулярно-генетические методы, что позволило показать разнообразие прокариотов в экстремальных условиях, созданных деятельностью человека.

Изучен элементный состав образцов щелочной техногенной среды, созданной в результате производства соды. Показано доминирование кальция во всех образцах, также обнаружены значительные количества катионов натрия и магния. Среди анионов в образцах осадков и поверхностных техногенных образований действующего содового шламохранилища преобладали хлориды, а в образцах грунта осушенного содового озера – гидрокарбонаты. Данная среда бедна питательными веществами, органическое вещество поступает в основном из воздуха, с пылевыми наносами и частично продуцируется автотрофными организмами. Минеральный состав изучаемой нами среды отличается от естественных щелочных биотопов, что, очевидно, и является важнейшим фактором отличий в составе микробиоты этих экосистем.

Бактериальное сообщество в щелочной техногенной высокоминерализованной среде, по данным метагеномного анализа, сформировано 7 филумами: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Candidatus Saccharibacteria*.

Показано, что в исследованных образцах действующего содового шламонакопителя доминируют представители филумов *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Установлено, что в дистиллерной жидкости и техногенных поверхностных образованиях содового шламохранилища преобладали представители филума *Firmicutes*, тогда как в осадках (донные отложения) и в объединенном образце грунта старой карты шламонакопителя – *Proteobacteria*. В микробиоме объединенного образца грунта осушенного шламохранилища преобладали семейства *Moraxellaceae* и *Staphylococcaceae* (20–23%), а также *Pseudomonadaceae* и *Burkholderiaceae* (11–13%), тогда как на глубине 10 см в большей степени были представлены семейства *Streptococcaceae* и *Cellulomonadaceae*.

Изучена сукцессия бактериального сообщества при восстановлении территорий старой карты шламохранилища. Обнаружены изменения микробного сообщества, связанные со сменой состава техногенного образования, которые могут быть использованы в качестве индикаторов восстановления среды. Оценено α -разнообразие и выровненность бактериального сообщества сред содового шламохранилища. Показано, что бактериальное сообщество этих сред отличается крайне низким разнообразием и доминированием отдельных филогенетических групп.

Методом посева на селективные среды определено количество бактерий с липолитической, протеолитической, амилолитической и целлюлозолитической активностями, минимальное количество бактерий-гидролитиков (до 10000 клеток на 1 г) обнаружено в осадке соды (рН 11). Показано, что максимальная численность микроорганизмов амило-, целлюло- и протеолитиков наблюдается в образцах, содержащих ризосферу, а также в верхнем слое грунтов восстанавливаемых территорий, имеющих растительный покров. Данное распределение микроорганизмов соответствует содержанию в изучаемых средах биополимеров. С увеличением глубины количество легко гидролизующихся биогенных веществ снижается, а

количество целлюлозы, составляющей большую массу в составе растительных остатков, остается высоким.

Выделены алкалотолерантные бактерии, способные расти в широком диапазоне кислотности (от нейтральных до рН 11) и алкалофильные изоляты, растущие при рН 11, проявляющие высокую активность гидролитических ферментов. Изолированные культуры представляют интерес для биотехнологии как продуценты ферментов, устойчивых к щелочным значениям рН и высокой минерализации среды.

Изучен биотехнологический потенциал выделенных и идентифицированных бактериальных изолятов, устойчивых к щелочной среде и высокому содержанию солей, с различными гидролитическими активностями. Показано, что амилазы культур, выделенных на среде с рН 11 и 8, проявляют наибольшую активность при рН 10 и 6 соответственно, тогда как удельная активность внеклеточной липазы изолятов *P. peli*, выделенных при рН 8, максимальна при рН 11. На среде с рН 11 выделены *Bacillus aequororis*, *Brevibacterium pityocampae*, *Microbacterium kitamiense*, *Microcella putealis*, *Oerskovia paurometabola*, *O. enterophila*, *O. jenensis*, обладающие активностью щелочной амилазы.

Наибольшая липазная активность обнаружена у гамма-протеобактерий *Pseudomonas peli*. Липолитическая активность этого штамма незначительно изменяется в интервале концентраций соли от 0,5 до 200 г/л. При этом высокая активность проявляется в интервале рН от 8 до 11 с максимумом при рН 11. Лучшими продуцентами щелочной амилазы оказались актинобактерии рода *Microbacterium* - *M. kitamiense*, проявляющие высокую активность внеклеточной амилазы в диапазоне рН от 7 до 11, в широком диапазоне концентрации соли (до 200 г/л), с максимумом при рН 11 и концентрации соли 100 г/л. Обнаруженные свойства селекционированных культур и их ферментов представляют интерес для биотехнологического применения.

Таким образом, на среде с рН 8 и селективными субстратами (твин-80, пептон, крахмал, целлюлоза) выделено 67 алкалотолерантных изолятов, обладающих соответствующими гидролитическими активностями; на полноценной среде с рН 11 выделено 11 алкалофильных изолятов, обладающих гидролитическими активностями, сопоставимыми с таковыми изолятов, выделенных первым способом. Идентифицировано 58 штаммов и последовательности 16S рРНК депонированы в GenBank.

Для наиболее продуктивного штамма, обладающего липолитической активностью, оптимизирована среда культивирования. Установлено, что мочевины способствует индукции липазной активности. Продукция внеклеточной липазы индуцируется при использовании в качестве субстратов глицерина или растительных масел. Уровень ассоциированной с клетками активности возрастает при использовании глицерина или твин-20.

Исследованы морфологические и физиолого-биохимические свойства факультативного алкалофила *Bacillus aequororis* 5-ДБ в сравнении с нейтрофильным *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Данный штамм проявил высокую активность амилазы в широком диапазоне рН и степени минерализации. Вычислены морфометрические параметры клеток после инкубации в щелочной среде с высокой концентрацией хлорида натрия. Показано, что адаптация *B. aequororis* 5-ДБ не сопровождается значительными изменениями морфометрических параметров, при этом незначительно (в 1–1,5 раза) снижается объем клеток и возрастает шероховатость их поверхности. Нейтрофильная бацилла, наоборот, реагирует на увеличение концентрации соли и рН (50 г/л, рН 11) значительными изменениями клетки: в 2–3 раза уменьшается объем клетки, а при суточной адаптации к 50 г/л соли с рН 8 возрастает в 2,4 раза за счет увеличения длины клетки. Морфология клеток алкалофильной бациллы, в отличие от таковой нейтрофильной, не претерпевает значительных изменений при высокой минерализации среды как при непосредственном воздействии, так и после суточной адаптации.

Исследована физиологическая активность культур при инкубации в щелочной среде с высокой концентрацией хлорида натрия. Показано, что клетки *B. subtilis* ATCC 6633 для проявления физиологической активности нуждались в длительной адаптации и проявляли наиболее выраженную жизнеспособность при pH 9, тогда как культура *B. aequororis* не нуждалась в предварительной адаптации и проявляла сходную метаболическую активность в широком диапазоне pH от 5 до 11. Таким образом, выявлены особенности адаптивных реакций и функционирования выделенных бактерий в экстремальных условиях высокоминерализованной и щелочной среды.

Анализ полученных данных позволил заключить, что выделенные штаммы при условии дальнейшей селекции могут являться перспективными объектами в биотехнологии: в производстве моющих средств, биоремедиации, пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Перспективой дальнейшей разработки темы диссертационного исследования является селекция выделенных штаммов в направлении увеличения ферментативной активности, создание биопрепаратов на их основе и изучение филогенетического разнообразия домена *Archaea* содового шламохранилища.

ВЫВОДЫ

1. Изучено филогенетическое разнообразие микробиоценоза действующей и старой карты содового шламохранилища г. Березники (Пермский край). Установлено, что бактериальное сообщество в исследуемом биотопе сформировано 7 филумами: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* и *Candidatus Saccharibacteria*, среди которых доминирующими являются *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Появление представителей семейства *Cellulomonadaceae* в грунте старой карты свидетельствует о восстановлении территорий. Показано, что изученные среды отличаются крайне низким α -разнообразием и выравненностью, и максимальный индекс Шеннона, рассчитанный для микробного сообщества сред содового шламохранилища, не превышает 1,86.
2. Показано, что на поверхности грунта старой карты 73% гидролитических бактерий составляли протеолитики, а на глубине 10 см 43% приходилось на долю целлюлолитиков. Подавляющее содержание липолитиков отмечено в содовом шламе и поверхностных техногенных образованиях новой карты содового шламохранилища. Максимальное количество алкалофильных гетеротрофных культивируемых бактерий достигало $8,9 \times 10^7$ КОЕ/г в образцах старой карты содового шламохранилища.
3. Сочетание двух способов выделения чистых культур бактерий-гидролитиков из высокоминерализованной щелочной среды, таких как выделение на среде с селективными субстратами в отсутствие экстремальных условий (рН 8) и на полноценной среде с рН 11 без селективных субстратов, позволило получить обширный материал для скрининга гидролитических активностей среди галоалкалотолерантных бактерий.
4. Выделены и идентифицированы культуры, проявляющие активность гидролитических ферментов (амилазы, липазы, протеазы, целлюлазы). Изолированы наиболее перспективные штаммы, обладающие как внеклеточными так и связанными с клетками активностями амилазы (*Ensifer morelensis*, 30,32 мкмоль/(л·мин); *Paenisporasarcina quisquiliarum*, 20,03 мкмоль/(мг·мин); *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* 14,7 мкмоль/(л·мин) и 8,65

мкмоль/(мг·мин)), липазы (*Pseudomonas peli*, 0,83 мкмоль/(л·мин) и 2,97 мкмоль/(мг·мин)), протеазы (*Arthrobacter halodurans*, 12 мм; *Micrococcus aloeverae*, 10 мм) и целлюлазы (*Microbacterium pygmaeum*, 0,49 ммоль/(л·сут); *Lisobacter soli*, 0,47 ммоль/(л·сут); *Bacillus indicus*, 0,7 ммоль/(мг·сут)). Наибольшую активность амилазы у культур, полученных на среде с рН 11 и 8, отмечали при рН 10 и 6 соответственно, тогда как удельная активность внеклеточной липазы изолятов *P. peli*, выделенных при рН 8, была наибольшей при рН 11.

5. В результате экспериментов по оптимизации среды культивирования перспективного в биотехнологическом отношении штамма *Pseudomonas peli* 3-Т – продуцента липазы, был скорректирован ее состав, обеспечивающий получение максимального количества активной биомассы. В качестве основы предложена среда Пфеннига, источник углерода - глицерин (0,5%), источник азота - мочевины (0,03%). Активность липазы на оптимизированной среде культивирования составляла 1,26 мкмоль/мин/л, урожай биомассы 6,9 г/л, удельная скорость роста в логарифмической фазе 0,08 ч⁻¹, экономический коэффициент потребления субстрата 138%.

6. Изучены морфологические и физиолого-биохимические особенности факультативного алкалофила *Bacillus aequororis* в условиях повышенной минерализации и широком диапазоне рН среды. Показано, что продуцент амилазы *B. aequororis* 5-ДБ адаптирован к экстремальным условиям и способен к активному метаболизму в широком диапазоне рН (5–11), а сочетание рН 11 с 50 г/л хлорида натрия в среде обеспечивает наибольшую амилазную и липазную активность этого штамма. Установлено, что морфология клеток алкалофильного *B. aequororis* 5-ДБ менее подвержена изменениям в среде с высокой концентрацией соли (50 г/л), чем нейтрофильного *B. subtilis* ATCC 6633.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андронов, Е.Е. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды / Е.Е. Андронов, А.Г. Пинаев, Е.В. Першина, Е.П. Чижевская. – Санкт-Петербург: ВНИИСХМ РАСХН, 2011. – 23 с.
2. Безбородов, А.М. Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (обзор) / А.М. Безбородов, Н.А. Загустина // Прикл. биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50, № 4. – С. 347-373.
3. Блинов, С.М. Минералогические основы утилизации отходов ОАО «Березниковский содовый завод» / С.М. Блинов, Н.Г. Максимович, Н.Ф. Найданова, В.Г. Шлыков, С.С. Потапов // Минералогия техногенеза. – 2003. – Т. 4. – С. 51-55.
4. Болтянская, Ю.В. Осмоадаптация у представителей галоалкалофильных бактерий из содовых озер / Ю.В. Болтянская // Микробиология. – 2005. – Т. 74, №6. – С. 738-744.
5. Борзенко, С.В. Сульфатредукция как фактор формирования содовых вод озера Доронинское (Восточное Забайкалье) / С.В. Борзенко, Л.В. Замана // Вестник ТГУ. – 2008. – Т. 312. – С. 188-193.
6. Валяшко, М.Г. Классификационные признаки соляных озер / М.Г. Валяшко. Под ред. А.П. Виноградова // Труды ВНИИГ. – М.: Московский университет, 1952. – С. 13-14.
7. Воронин, М.Ю. Рекомендации по происхождению эколого-генетической учебной практики. Раздел Экология: Учебное пособие / М.Ю. Воронин. Саратов: Издательство Саратовского университета, 2014. – 7 с.
8. Галиев, В.В. Сравнение методов выделения метагеномной ДНК из образцов почвы / В.В. Галиев, А.О. Цырульников. // Вестник НГПУ. – 2011. – №1. – С. 75-84.
9. Гловер, Д. Клонирование ДНК. Методы / под ред. Д. Гловера – М.: Мир, 1988. – 538 с.

10. ГОСТ 26423-85. Почвы. Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки. – М.: Стандартифирм, 2011. – 4 с.
11. Деткова, Е.Н. Связь между стратегией осмоадаптации, аминокислотным составом общего клеточного белка и свойствами некоторых ферментов галоалкалофильных бактерий / Е.Н. Деткова // Микробиология. – 2006. – Т. 75, №3. – С. 312-319.
12. Деткова, Е.Н. Осмоадаптация галоалкалофильных бактерий: роль осморегуляторов и возможности их практического применения / Е.Н. Деткова, Ю.В. Болтянская // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 5. – С. 581-593.
13. Дмитриева, О.М. Особенности состава органического вещества микробных матов щелочных водных экосистем Байкальского региона / О.М. Дмитриева, Д.Д. Бархутова // Современные проблемы науки и образования. – 2017, № 3. – 9 с.
14. Ерохин, П.С. Атомно-силовая микроскопия как инструмент определения чувствительности бактерий к факторам биотической и абиотической природы: дис. канд. ...физ.-мат. наук: 03.01.02 / Павел Сергеевич Ерохин. – 2015. – 126 с.
15. Ждан-Пушкина, С.М. Основы роста микроорганизмов. Учебное пособие / под ред. В.П. Гончарова. – Л.: Издательство Ленинградского университета, 1983. – 188 с.
16. Заварзин, Г.А. Изучение микробного разнообразия в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского / Г.А. Заварзин // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 5. – С. 598-612.
17. Заварзин, Г.А. Образование содовых условий как глобальный процесс / Г.А. Заварзин // Труды Института микробиологии им. С. Н. Виноградского. Вып. 14. Алкалофильные микробные сообщества. Под ред. В.Ф. Гальченко. М.: Наука. – 2007. – С. 8-57.
18. Заварзин, Г.А. Содовые озера — природная модель древней биосферы

- континентов / Г.А. Заварзин, Т.Н. Жилина // Природа. – 2000, № 2. – С. 45-55.
19. Заварзин, Г.А. Алкалофильное микробное сообщество и его функциональное разнообразие / Г.А. Заварзин, Т.Н. Жилина, В.В. Кевбрин // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – С. 579-599.
20. Зайцева, С.В. Микробное сообщество донных осадков солончатого щелочного озера Белое (Забайкалье) / С.В. Зайцева, Е.Ю. Абидуева., Б.Б. Намсараев, Л. Ванг, Л. Ву // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 6. – С. 722-729.
21. Зайцева, С.В. Структура микробных сообществ в осадках щелочных озер Забайкалья с различной минерализацией / С.В. Зайцева, Е.Ю. Абидуева, А.А. Раднагуруева, С.М. Базаров, С.П. Бурюхаев // Микробиология. – 2018. – Т. 87, № 4. – С. 421–431.
22. Ившина, И.Б. Адаптационные механизмы неспецифической устойчивости алканотрофных актинобактерий к ионам тяжелых металлов / И.Б. Ившина, М.С. Куюкина, Л.В. Костина // Экология. – 2013, № 2. – С. 115.
23. Каленов, С.В. Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсоленых сред: дис. доктора техн. наук: 03.01.06 / Сергей Владимирович Каленов. – 2020. – 588 с.
24. Кашкак, Е.С. Формирование и функционирование микробных матов минерального источника Хойто-Гол (Восточный Саян) / Е.С. Кашкак, Е.С. Гайсин, О.П. Дагурова, И.А. Брянцева, Э.В. Данилова // Изв. Самарского научного центра РАН. – 2016. – Т.18, № 2. – С. 397–402.
25. Морозкина, Е.В. Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение (обзор) / Е.В. Морозкина, Э.С. Слуцкая, Т.В. Фёдорова, Т.И. Тугай, Л.И. Голубева, О.В. Королёва // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46, №1. – С. 5-20.
26. Новожилов, Е.В. Биотехнологии в производстве целлюлозы для химической переработки (обзор) / Е.В. Новожилов, Д.Н. Пошина // Химия растительного сырья. – 2011. – Т. 3. – С. 15–32.

27. Раднагуруева, А.А. Разнообразие прокариот – деструкторов экстремальных местообитаний Байкальской рифтовой зоны: Учебное пособие / А.А. Раднагуруева, Е.В. Лаврентьева, Д.Д. Бархутова, Т.Г. Банзаракцаева, Б.Б. Намсараев. Улан-Уде, 2012. – 64 с.
28. Самойлова, Ю.В. Изучение свойств бактериальных термостабильных липолитических ферментов и биокатализаторов в реакциях гидролиза и переэтерификации: дис. ...канд. биол. наук: 03.01.06 / Юлия Валерьевна Самойлова. – 2018. – 130 с.
29. Самутин, Н.М. Санитарно-гигиеническая оценка отходов содового производства / Н.М. Самутин, Я.И. Вайсман, Л.В. Рудакова, Е.В. Калинина, И.С. Глушанкова, Г.М. Батракова // Гигиена и санитария. – 2013. – Т. 2. – С. 30-33.
30. Саралов, А.И. Адаптивность экстремофилов *Archaea* и *Bacteria* / А.И. Саралов // Микробиология. – 2019. – Т. 88, № 4. – С. 377-400.
31. Соляникова, И.П. Физиолого-биохимические свойства актинобактерий как основа их высокой биodeградативной активности (обзор) / И.П. Соляникова, Л.А. Головлёва // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 132.
32. Сорокин, Д.Ю. Окисление неорганических серных соединений облигатно хемогетеротрофными бактериями / Д.Ю. Сорокин // Микробиология. – 2003. – Т. 72. – С. 725-739.
33. Турова, Т.П. Исследование филогенетического разнообразия бактерий в стратифицированных осадках содовых озер / Т.П. Турова, М.А. Гречникова, Б.Б. Кузнецов, Д.Ю. Сорокин // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 6. – С. 730-742.
34. Чернов, Т.И. Метагеномный анализ прокариотных сообществ профилей почв европейской части России: дис. канд. ...биол. наук: 03.02.03 / Тимофей Иванович Чернов – 2015. – 111 с.
35. Чернов, Т.И. Оценка различных индексов разнообразия для характеристики почвенного прокариотного сообщества по данным

метагеномного анализа / Т.И. Чернов, А.К. Ткахахова, О.В. Кутовая // Почвоведение. – 2015. – № 4. – С. 462-468.

36. Шмакова, М.А. Бактерии рода *Acinetobacter* как внутрибольничные патогены: эпидемиологические особенности / М.А. Шмакова // Фундаментальная и клиническая медицина. – Т. 4, № 1. – С.66-72.

37. Эрдынеева, Е.Б. Алкалогалофильные бактерии семейства Bacillaceae в озерах пустыни Бадаин Жаран (Китай) / Е.Б. Эрдынеева, А.А. Раднагуруева, Н.Л. Белькова, З.Б. Намсараев, Е.В. Лаврентьева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22, № 3. – С. 370-378

38. Aino, K. Microbial communities associated with indigo fermentation that thrive in anaerobic alkaline environments / K. Aino, K. Hirota, T. Okamoto, Z. Tu, H. Matsuyama, I. Yumoto // Front Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 2196.

39. Aino, K. Bacterial community characterization and dynamics of indigo fermentation / K. Aino, T. Narihiro, K. Minamida, Y. Kamagata, K. Yoshimune, I. Yumoto // FEMS Microbiol Ecol. – 2010. – V. 74. – P. 174-183.

40. Akolkar, A.V. *Halobacterium* sp. SP1 (1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation / A.V. Akolkar, D. Durai, A.J. Desai // Journal of Applied Microbiology. – 2010. – V. 109, № 1. – P. 44-53.

41. Ali, S.S. Screening and characterization of alkaliphilic bacteria from industrial effluents / S.S. Ali, I. Habib, T. Riaz // Punjab Univ. J. Zool. – 2009. – V. 24, № 1-2. – P. 49-60.

42. Amoozegar, M.A. Systematics of *haloarchaea* and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes / M.A. Amoozegar, M. Siroosi, S. Atashgahi, H. Smidt, A. Ventosa // Microbiology. – 2017. – V. 163, № 5. – P. 623-645.

43. Amoozegar, M.A. Hydrolytic enzymes in halophilic bacteria, properties and biotechnological potential / M.A. Amoozegar, M. Siroosi // Halophiles, biodiversity and sustainable exploitation. Ed. D. Maheshwari, M. Saraf. New York: Springer International Publishing, 2015. – P. 355-378.

44. Andrew, M. Sea ice, extremophiles and life on extra-terrestrial ocean worlds / M. Andrew, M. Andrew // Int. J. Astrobiology. – 2017. – P. 1-16.

45. Anish, R. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims / R. Anish, M.S. Rahman, M. Rao // *Biotechnol. Bioeng.* – 2007. – V. 96, № 1. – P. 48-56.
46. Antranikian, G. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts / G. Antranikian, C.E. Vorgias, C. Bertoldo // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2005. – V. 96. – P. 219-262.
47. Arikan, B. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15 / B. Arikan // *Biores. Technol.* – 2008. – V. 99. – P. 3071-3076.
48. Atlas, R.M. *Handbook of Microbiological Media* / R.M. Atlas // Ed. by L.C. Parks. USA: CRC press, 1993. – 1079 pp.
49. Behel, A. Characterization of alkaline α -amylase from *Bacillus* sp. AB 04 / A. Behel, M.K. Singh, M.K. Sharma, P. Puri, N. Batra // *International Journal of Agricultural Biology.* – 2006. – V. 8. – P. 80-83.
50. Biswas, J. Diversity and production of extracellular polysaccharide by halophilic microorganisms / J. Biswas, A.K. Paul // *Biodiversity Int. J.* – 2017. – V. 1, № 2. – P. 32-39.
51. Bonch-Osmolovskaya, E.A. Editorial overview: Extremophiles: from extreme environments to highly stable catalysts / E.A. Bonch-Osmolovskaya, H. Atomi // *Current Opinion in Microbiology.* – 2015. – V. 25. – P. 88-96.
52. Boros, E. A review of the defining chemical properties of soda lakes and pans: An assessment on a large geographic scale of Eurasian inland saline surface waters / E. Boros, M. Kolpakova // *PLoS One.* – 2018. – V. 13, № 8. – P. 1-20.
53. Borsodi, A.K. Diversity and ecological tolerance of bacteria isolated from the rhizosphere of halophyton plants living nearby Kiskunság soda ponds, Hungary / A.K. Borsodi, Á. Bárány, G. Krett, K. Márialigeti, T. Szili-Kovács // *Acta microbiologica et immunologica Hungarica.* – 2015. – V. 62, № 2. – P. 183-197.
54. Bradoo, S. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp / S. Bradoo, R.K. Saxena, R. Gupta // *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* – 1999. – V. 15, № 1. – P. 87-91.

55. Brazelton, W.J. Bacterial communities associated with subsurface geochemical processes in continental serpentinite springs / W.J. Brazelton, P.L. Morrill, N. Szponar, M.O. Schrenk // *Appl Environ Microbiol.* – 2013. – V. 79. – P. 3906-3916.
56. Breeuwer, P.A. Novel method for continuous determination of the intracellular pH in Bacteria with the internally conjugated fluorescent probe 5 (and 6-)-carboxyfluorescein succinimidyl ester / P. Breeuwer, J-L. Drocourt, M. Frank, F.M. Rombouts, J. Abee // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – V. 61, № 1. – P. 178-183.
57. Bugnicourt, E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging / E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V.A. Alvarez // *Express Polymer Letters.* – 2014. – V. 8, № 1. – P. 791-808.
58. Bulow, L. The expression in *E. coli* of a polymeric gene coding for an esterase mimic catalyzing the hydrolysis of p-nitrophenyl esters / L. Bulow, K. Mosbach // *FEBS Lett.* – 1987. – V. 210. – P. 147-152.
59. Canfora, L. Salinity and bacterial diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil? / L. Canfora, G. Bacci, F. Pinzari, G. Lo Papa, C. Dazzi, A. Benedetti // *PLoS ONE.* – 2014. – P. 9:e106662.
60. Charlesworth, J.C. Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea / J.C. Charlesworth, B.P. Burns // *Archaea.* – 2015. – V. 2015. P. 1-7.
61. Chavagnac, V. Characterization of hyperalkaline fluids produced by low-temperature serpentinization of mantle peridotites in the Oman and Ligurian ophiolites / V. Chavagnac, C. Monnin, G. Ceuleneer, C. Boulart, G. Hoareau // *Geochem Geophys Geosyst.* – 2013. – V. 14. – P. 2496-2522.
62. Chiulan, I. Recent advances in 3D printing of aliphatic polyesters / I. Chiulan, A.N. Frone, C. Brandabur, D.M. Panaitescu // *Bioengineering.* – 2018. – V. 5, № 1. P. 1-18.

63. Chróst, R.J. Environmental Control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes / R.J. Chróst, I. Chiulan, A.N. Frone, C. Brandabur, D.M. Panaitescu // *Microbial Enzymes in Aquatic Environments. Series in Contemporary Bioscience*. Ed. by R.J. Chróst. New York.: Springer, 1991. – P. 29-59.
64. Crespo-Medina, M. Methane dynamics in a tropical serpentinizing environment: the Santa Elena Ophiolite, Costa Rica / M. Crespo-Medina, K.I. Twing, R. Sánchez-Murillo, W.J. Brazelton, T.M. McCollom, M.O. Schrenk // *Front Microbiol.* – 2017. – V. 8. – P. 916.
65. Cunha, A. Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems / A. Cunha, A. Almeida, F.J. Coelho, N.C. Gomes, V. Oliveira, A.L. Santos // *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* / Ed. by A. Mendez-Vilas. Badajoz, Spain.: Formatex Research Center, 2010. – P. 124-135.
66. Dahiya, P. Characterization and application of alkaline α -amylase from *Bacillus licheniformis* MTCC1483 as a detergent additive / P. Dahiya, R.B. Rathi Amity // *Int. Food Res. J.* – 2015. – V. 22. – P. 1293-1297.
67. DasSarma, P. Halophiles, industrial applications / P. DasSarma, J. A. Coker, V. Huse, S. DasSarma // *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*. Ed. by M.C. Flickinge. John Wiley & Sons, 2009. – P. 1-43.
68. De Carvalho, R.V. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp./ R.V. De Carvalho, T.L.R. Correa, J.C.M. da Silva, L.R.C. de Oliveira Mansur, M.L.L. Martins // *Braz. J. Microbiol.* – V. 39. – P. 102-107.
69. de Lourdes Moreno, M. Halophilic bacteria and archaea as producers of lipolytic enzymes / M. de Lourdes Moreno, M. C. Márquez, M. T. García, E. Mellado // *Biotechnology of Extremophiles. Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. Ed. by P.H. Rampelotto. Cham.: Springer, 2016. – P. 375-397.

70. de Lourdes Moreno, M. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes / M. de Lourdes Moreno, D. Pérez, M.T. García, E. Mellado // *Life*. – 2013. – 36 № 1. – P. 38-51.
71. Detkova, E.N. Energy metabolism in halophilic and alkaliphilic acetogenic bacteria / E.N. Detkova, M.A. Pusheva // *Microbiology*. – 2006. – V. 75, № 1. – P. 1-11.
72. Dhakar, K. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology / K. Dhakar, A. Pandey // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – V. 100. – P. 2499-2510.
73. Dimitru, P.A. Spatial and temporal patterns in the microbial diversity of a meromitic soda lake in Washington State / P.A. Dimitru, H.C. Pinkart, B.M. Peyton, M.R. Mormile // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – P. 4877-4888.
74. Edbeib, M.F. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments / M.F. Edbeib, R.A. Wahab, F. Huyop // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – V.32.– P. 1–23.
75. Eggink, G. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida* / G. Eggink, H. van der Wal, G. N. Huijberts, P. de Waard // *Industrial crops and products*. – 1992. – V. 1, № 2-4. P. 157-163.
76. Elleuche, S. Extremozymes biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms / S. Elleuche, C. Schroeder, K. Sahm, G. Antranikian // *Current opinion in biotechnology*. – 2014. – V. 29. – P. 116-123.
77. Eugster, H. Lakes. Chemistry, Geology, Physics. / H. Eugster, L. Hardie, H. Eugster, L. Hardie // Ed. by A. Lerman. Springer. Verlag Berlin Heidelberg, 1978. – P. 237-293.
78. Febriani. Low molecular weight alkaline thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. nov. / Febriani, Rayyana, M. Ulya, F. Oesman, Akhmaloka, T.M. Iqbalsyah // *Heliyon*. – 2019. – V. 5. – P. e02171.

79. Felföldi, T. Microbial communities of soda lakes and pans in the Carpathian Basin: a review / T. Felföldi // *Biologia Futura*. – 2020. – V. 71. – P. 393-404.
80. Ferrer, M. Taxonomic and functional metagenomic profiling of the microbial community in the anoxic sediment of a sub-saline shallow Lake (Laguna de Carrizo, Central Spain) / M. Ferrer [*et al.*] // *Microb. Ecol.* – 2011. – V. 62, № 4. – P. 824-837.
81. Fierer, N. The diversity and biogeography of soil bacterial communities / N. Fierer, R. B. Jackson // *PNAS*. – 2006. – V. 103, № 3. – P. 626-631.
82. Foti, M. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes / M. Foti, D.Y. Sorokin, B. Lomans, M. Mussman, E.E. Zacharova, N.V. Pimenov, J.G. Kuenen, G. Muyzer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73. – P. 2093-2100.
83. Foti, M. Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda steppe (Altai, Russia) / M. Foti, D.Y. Sorokin, E.E. Zacharova, N.V. Pimenov, J.G. Kuenen, G. Muyzer // *Extremophiles*. – 2008. – V. 12. – P. 133-145.
84. Fritze, D. *Bacillus haloalkaliphilus* sp. Nov / D. Fritze // *Int. J. Bacteriol.* – 1996. – V. 46. – P. 98-101.
85. Fukui, T. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain / T. Fukui, Y. Doi // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1998. – V. 49, № 3. – P. 333-336.
86. Gandbhir, M. Convergent evolution of amino acid usage in archaeobacterial and eubacterial lineages adapted to high salt / M. Gandbhir, I. Rashed, P. Marlière, R. Mutzel // *Res. Microbiol.* – 1995. – V. 146. – P. 113-120.
87. Gao, X. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels / X. Gao, J.C. Chen, Q. Wu, G.Q. Chen // *Current opinion in biotechnology*. – 2011. – V. 22, № 6. – P. 768-774.
88. Ghorbel, R.E. New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability / R.E. Ghorbel, S. Maktouf, E.B. Massoud, S. Bejar, S.E. Chaabouni // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2009. – V. 157. – P. 50-60.

89. Gong, Y. Groundwater contributions in water-salt balances of the lakes in the Badain Jaran Desert, China / Y. Gong, X. Wang, B.X. Hu, Y. Zhou, C. Hao, L. Wan // *J. Arid Land*. – 2016. – V. 8, № 5. – P. 694-706.
90. Grant, W.D. Alkaliphiles: ecology, diversity and applications / W.D. Grant, W.E. Mwatha, B.E. Jones // *FEMS Microbiol Letters* – 1990. – V. 75. – P. 255–269.
91. Grant, W.D. Distribution and Diversity of Soda Lake Alkaliphiles / W.D. Grant, D.Yu. Sorokin // *Extremophiles handbook*. / Ed. by Horikoshi K., Antranikian G., Bull A., Robb F., Stetler K. Tokyo.: Springer-Verlag, 2011. – P. 27-54.
92. Grätzel, M. Dye-sensitized solar cells / M. Grätzel // *Journal of photochemistry and photobiology C: Photochemistry Reviews*. – 2003. – V. 4, № 2. – P. 145-153.
93. Gricajeva, A. Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: Cloning, expression and characterization / A. Gricajeva, V. Bendikienė, L. Kalėdienė // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – V. 92. – P. 96-104.
94. Guffanti, A.A. Features of apparent nonchemiosmotic energization of oxidative phosphorylation by alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 / A.A. Guffanti, T.A. Krulwich // *J. Biol. Chem*. – 1992.– V. 267. – P. 9580-9588.
95. Gupta, R. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications / R. Gupta, Q.K. Beg, P. Lorenz // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. – 2002. – V. 59, № 1. – P. 15-32.
96. Gutiérrez, R.T. Quantification and characterization of native microorganisms under contrasting rainforest environment in Ecuadorian Amazon / R.T. Gutiérrez, B.R. Medin, A.C. Pérez, J.R. Freile, J.R. Ramos, R.M. Chiliquinga, M.D. Lozada, D.G. Llerena // *In Proceedings of the MOLNET International Conference on Multidisciplinary Sciences*. – 2016. – V. 2. – P. – 2016-2025.
97. Hartman, W.H. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils / W.H. Hartman, C.J. Richardson, R. Vilgalys, G.L.

Bruland // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – V. 105, № 46. – P. 17842-17847.

98. Hasan, F. Enzymes used in detergents: lipases / F. Hasan, A.A. Shah, S. Javed, Hameed A. // Afr. J. Biotechnol. – 2010. – V. 9, № 31. – P. 4836-4844.

99. Hmidet, N. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive / N. Hmidet, N. E. H. Ali, A. Haddar, S. Kanoun, S. K. Alya, M. Nasri // Biochemical Engineering Journal. – 2009. – V. 47, № 1-3. – P. 71-79.

100. Hollibaugh, J.T. Stratification of microbial assemblages in Mono Lake, California, and response to a mixing event / J.T. Hollibaugh, P.S. Wong, N. Bano, S.K. Pak, E.M. Prager, C. Orrego // Hydrobiologia. – 2001. – V. 466. – P. 45-60.

101. Horikoshi, K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology / K. Horikoshi // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. – V. 63, № 4. – P. 735-750.

102. Horikoshi, K. Extremophiles handbook. / Ed. by K. Horikoshi, G. Antranikian, A.T. Bull, F.T. Robb, K.O. Setter. Japan.: Springer, 2011. – 400 p.

103. Hou, S. Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria / S. Hou, R. W. Larsen, D. Boudko, C. W. Riley, E. Karatan, M. Zimmer, G. W. Orda, M. Alam // Nature. – 2000. – V. 403, № 6769. – P. 540-544.

104. Humayoun, S.B. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California / S.B. Humayoun, N. Bano, J.T. Hollibaugh // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – P. 1030-1042.

105. Ibrahim, A.S.S. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerantalkaliphilic *Bacillus sp.* NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes / A.S.S. Ibrahim, A.A. Al-Salamah, Y.B. Elbadawi, M.A. El-Tayeb, S.S.S. Ibrahim // Electronic Journal of Biotechnology. – 2015. – V. 18. – P. 236–243.

106. Jagtap, S. Purification and properties of a low molecular weight 1, 4-beta-D-glucan glucohydrolase having one active site for carboxymethyl cellulose and xylan from an alkalothermophilic *Thermomonospora sp.* / S. Jagtap, M. Rao // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – V. 329, № 1. – P. 111-116.

107. Jan-Roblero, J. Phylogenetic analysis of bacterial populations in waters of the former Texcoco Lake, Mexico / J. Jan-Roblero, X. Magos, L. Fernández, C. Hernández-Rodríguez, S. Le Borgne // *Can J Microbiol.* – 2004. – V. 50, № 12. – P. 1049-1059.
108. Janssen, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rDNA and 16S rRNA genes / P.H. Janssen // *Applied and environmental microbiology.* – 2006. – V. 72, № 3. – P. 1719-1728.
109. Jebbar, M. Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes / M. Jebbar, B. Franzetti, E. Girard, P. Oger // *Extremophiles.* – 2015. – V. 19. – P. 721-740.
110. Johnson, R.M. Namib Desert edaphic bacterial, fungal and archaeal communities assemble through deterministic processes but are influenced by different abiotic parameters / R.M. Johnson, J.B. Ramond, E. Gunnigle, M. Seely, D.A. Cowan // *Extremophiles.* – 2017. – V. 21, № 2. – P. 381-392.
111. Jones, B.E. Microbial Diversity and Ecology of Alkaline Environments / B.E. Jones, W.D. Grant // *Journey to Divers. Microb. Worlds.* – 2000. – V. 2. – P. 177-190.
112. Jones, B.E. Microbial diversity of soda lakes / B.E. Jones, W.D. Grant, A. W. Duckworth, G. G. Owenson // *Extremophiles.* – 1998. – V. 2. – P. 191-200.
113. Joshi, A.A. Cultivable bacterial diversity of alkaline Lonar Lake, India / A.A. Joshi [*et al.*] // *Microb. Ecol.* – 2008. – V. 55. – P. 163-172.
114. Kalwasińska, A. Microbial communities associated with the anthropogenic, highly alkaline environment of a saline soda lime / A. Kalwasińska, T. Felföldi, A.J. Szab, E. DejaSikora, P. Kosobucki, M. Walczak // *Ant. Van Leeuwenhoek.* – 2017. – V. 110, № 7. – P. 945-962.
115. Karray, F. Extracellular hydrolytic enzymes produced by halophilic *Bacteria* and *Archaea* isolated from hypersaline lake / F. Karray, B.M. Abdallah, N. Kallel, M. Hamza, M. Fakhfakh, S. Sayadi // *Mol. Biol. Rep.* – 2018. – V. 45, № 5. – P. 1297-1309.

116. Kaur, G. Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India / G. Kaur, A. Singh, R. Sharma, V. Sharma, S. Verma, P. K. Sharma // 3 Biotech. – 2016. – V. 6, № 1. – P. 49.
117. Kevbrin, V.V. Isolation and cultivation of alkaliphiles / V.V Kevbrin // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology / Ed. by G. Mamo, B. Mattiasson. Cham.: Springer, 2019. – V. 172. – P. 53-84.
118. Khan, S. Membrane ultra-structure of alkaliphilic *Bacillus species* studied by rapid-freeze electron microscopy / S. Khan, D. Mackivey, T.A. Krulwich // Bacteriol J. – 1992. – V. 174, № 15. – P. 5123-5126.
119. Kiran, K.K. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK / K.K. Kiran, T.S. Chandra // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 77. – P. 1023-1031.
120. Konings, W.N. The cell membrane plays a crucial role in survival of *Bacteria* and *Archaea* in extreme environments / W.N. Konings, S.V. Albers, S. Koning, A.J.M. Driessen // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2002. – V.1, № 4. – P. 61-72.
121. Kopejtká, K. The complete genome sequence of *Rhodobaca barguzinensis* alga05 (DSM–19920) documents its adaptation for life in soda lakes / K. Kopejtká, J. Tomasch, B. Bunk, C. Spröer, I. Wagner-Döbler, M. Koblížek // Extremophiles. – 2018. – V. 22, № 6. – P. 839-849.
122. Krivoruchko, A. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies / A. Krivoruchko, M. Kuyukina, I. Ivshina // Catalysts. – 2019. – V. 9, № 3. – P. 236.
123. Krishnaveni, K. Production and optimization of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* isolated from dairy effluent / K. Krishnaveni, D.J. Mukeshkumar, M.D. Balakumaran, S. Ramesh, P.T. Kalaichelvan // Der Pharmacia Lettre. – 2012. – V. 4, № 1. – P. 98-109.

124. Krulwich, T.A. PH homeostasis and bioenergetic work in alkaliphiles / T.A. Krulwich, A.A. Guffanti, D. Seto-Young // FEMS Microbiol. Rev. – 1990. – V. 75. – P. 271-278.
125. Krulwich, T.A. PH homeostasis and ATP synthesis: studies of two processes that necessitate inward proton translocation in extremely alkaliphilic *Bacillus* species / T.A. Krulwich, M. Ito, D.B. Hicks, R. Gilmour, A.A. Guffanti // Extremophiles. – 1998. – V. 2. – P. 217-222.
126. Krulwich, T.A. Alkaliphilic Prokaryotes, in The Prokaryotes. / T.A. Krulwich // A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Ed. by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Scheifer, E. Stackebrandt. New York: Springer, 2000. – 1155 pp.
127. Krulwich, T.A. Alkaliphilic bacteria / T.A. Krulwich, A.A. Guffanti // Annu Rev Microbiol. 1989. – V. 43. – P. 435-463.
128. Kulshreshtha, N.M. *Exiguobacterium alkaliphilum* sp. nov. isolated from alkaline wastewater drained sludge of a beverage factory / N.M. Kulshreshtha, R. Kumar, Z. Begum, S. Shivaji, A. Kumar // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – V. 63. – P. 4374-4379.
129. Kubrak, O.I. Production and properties of α -amylase from *Bacillus* sp. BKL20 / O.I. Kubrak, J.M. Storey, K.B. Storey, V.I. Lushchak // Can. J. Microbiol. – 2010. – V. 56. – P. 279-288.
130. Kumar, P. Biotechnological aspects of thermophilic fungal glucoamylases / P. Kumar, T. Satyanarayana / In Book: Emerging Trends in Mycology, Plant Pathology and Microbial Biotechnology Ed. by G. Bagyanarayana, B. Bhadraiah, I. K. Kunwar. Hyderabad: B.S. Publications, 2014. – P. 539-563.
131. Kusum, D. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology / D. Kusum, A. Pandey // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – V. 100. – P. 2499-2510.
132. Lageveen, R.G. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates / R.G. Lageveen, G.W. Huisman, H. Preusting, P.

- Ketelaar, G. Eggink, B. Witholt // *Applied and environmental microbiology*. – 1988. – V. 54, № 12. – P. 2924-2932.
133. Lauber, C.L. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale / C.L. Lauber, M. Hamady, R. Knight, N. Fierer // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2009. – V. 75, № 15. – P. 5111-5120.
134. Likar, M. Ecological and conventional viticulture gives rise to distinct fungal and bacterial microbial communities in vineyard soils / M. Likar, B. Stres, D. Rusjan, M. Potisek, M. Regvar // *Applied Soil Ecology*. – 2017. – V. 113. – P. 86-95.
135. Lim, J. Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds / J. Lim, M. You, J. Li, Z. Li // *Materials Science and Engineering: C*. – 2017. – V. 79. – P. 917-929.
136. Litchfield, C.D. Potential for industrial products from the halophilic *Archaea* / C.D. Litchfield // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. – 2011. – V. 38, № 10. – P. 1635-1647.
137. Liu, J. The activity profile of the NhaD-type Na⁺(Li⁺)/H⁺ antiporter from the soda lake haloalkaliphile *Alkalimonas amylolytica* is adaptive for the extreme environment / J. Liu, Y. Xue, Q. Wang, Y. Wei, T.H. Swartz, D.B. Hicks, M. Ito, Y. Ma, T.A. Krulwich // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187, № 22. – P. 7589-7595.
138. Liu, S. pH levels drive bacterial community structure in sediments of the Qiantang River as determined by 454 pyrosequencing / S. Liu, H. Ren, L. Shen, L. Lou, G. Tian, P. Zheng, B. Hu // *Front Microbiol.* – 2015. – V. 6. – P. 285.
139. Ma, Y. Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lake as revealed by 16S rRNA gene sequence analyses / Y. Ma, W. Zang, Y. Xue, P. Zhou, A. Ventosa, W.D. Grant // *Extremophiles*. – 2004. – V. 8. – P. 45-51.
140. Madern, D. Halophilic adaptation of enzymes / D. Madern, C. Ebel, G. Zaccai // *Extremophiles*. – 2000. – V. 4. – P. 91-98.

141. Margesin, R. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology / R. Margesin, F. Schinner // *Extremophiles*. – 2001. – V. 5, № 2. – P. 73-83.
142. Margesin, R. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology / R. Margesin, F. Schinner // *Extremophiles*. – 2001. – V. 5. – P. 73-83.
143. Maturrano, L. Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes / L. Maturrano, F. Santos, R. Rossello-Mora, J. Anton // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72, № 6. – P. 3887-3895.
144. Mc Tighe, M.A. The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370 / M.A. Mc Tighe, C.T. Kelly, E.M. Doyle, W.M. Fogarty // *Enzyme Microb. Technol.* – 1995. – V. 17, № 6. – P. 570-573.
145. Meng, L. Cloning and identification of Group 1 mrp operon encoding a novel monovalent cation/proton antiporter system from the moderate halophile *Halomonas zhaodongensis* / L. Meng, S. Hong, H. Liu, H. Huang, H. Sun, T. Xu, J. Jiang // *Extremophiles*. – 2014. – V. 18, № 6. – P. 963–972.
146. Mesbah, N.M. Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the Wadi An Natrun, Egypt / N.M. Mesbah, S.H. Abou-El-Ela, J. Wiegel // *Microb. Ecol.* – 2007. – V. 54. – P. 598-617.
147. Mianping, Z. Chinese saline lakes / Z. Mianping, J. Tang, J. Liu, Z. Fasheng // *Hydrobiologia*. – 1993. – V. 267, № 23. – P. 23-36.
148. Mokashe, N. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector / N. Mokashe, B. Chaudhari, U. Patil // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – V. 117, № 1 – P. 493-522.
149. Mwirichia, R. Bacterial diversity in the haloalkaline Lake Elmenteita / R. Mwirichia, S. Cousin, A.W. Muigai, H.I. Boga, E. Stackebrandt // *Curr. Microbiol.* – 2011. – V. 62. – P. 209-221.

150. Mwirichia, R. Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya / R. Mwirichia, A.W. Muigai, B. Tindall, H. I. Boga, E. Stackebrandt // *Extremophiles*. – 2010. – V. 14. – P. 339-348.
151. Naghoni, A. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran / A. Naghoni [*et al.*] // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7, № 1. – P. 1-13.
152. Namsaraev, Z.B. *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, Central Mongolia / Z.B. Namsaraev, O.B. Babasanova, Y.E. Dunaevsky, V.N. Akimov, D.D. Barkhutova, V.M. Gorlenko, B.B. Namsaraev // *Microbiology*. – 2010. – V. 79, № 4. – P. 491-499.
153. Nazeeruddin, M.K. Dye-sensitized solar cells: a brief overview / M.K. Nazeeruddin, E. Baranoff, M. Grätzel // *Solar energy*. – 2011. – V. 85, № 6. – P. 1172-1178.
154. Neubeck, A. Microbial community structure of a serpentine-hosted abiotic gas seepage at the Chimaera ophiolite, Turkey / A. Neubeck, L. Sun, B. Müller, M. Ivarsson, H. Hosgörmez, D. Özcan, C. Broman, A. Schnürer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2017. – V. 83. – P. e03430-e03416.
155. Nishita, M. Development of media to accelerate the isolation of indigo-reducing bacteria, which are difficult to isolate using conventional media / M. Nishita, K. Hirota, H. Matsuyama, I. Yumoto // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – V. 3. – P. 133.
156. Niyonzima, F.N. Detergent-compatible bacterial amylases / F.N. Niyonzima, S.S. More // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2014. – V. 74(4). – P. 1215–1232.
157. Ntougias, S. *Alkalibacterium olivoapovliticus* gen. nov., sp. nov., a new obligately alkaliphilic bacterium isolated from edible-olive wash waters / S. Ntougias, N.J. Russell // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. – V. 51. – P. 1161-1170.
158. Nusrat, A. Comparative studies on the production of extracellular amylase by three mesophilic *Bacillus* isolates / A. Nusrat, S.R. Rahman // *Bangladesh Journal of Microbiology*. – 2007. – V. 24. – P. 129-132.

159. Okamoto, T. Analysis of microbiota involved in the aged natural fermentation of indigo / T. Okamoto, K. Aino, T. Narihiro, H. Matsuyama, I. Yumoto // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – V. 33. – P. 70.
160. Oren, A. Bioenergetic aspects of halophilism / A. Oren // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1999. – V. 63. – P. 334-348.
161. Oren, A. Halophilic microorganisms and their environments / A. Oren // *Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Netherlands.: Springer, 2002. – 558 pp.
162. Oren, A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms / A. Oren // *Environ. Technol.* – 2010. – V. 31, № 8–9. – P. 825-834.
163. Oren, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity / A. Oren., M. Haldal, S. Norland, E.A. Galinski // *Extremophiles*. – 2002. – V. 6. – P. 491-498.
164. Padan, E. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights / E. Padan, E. Bibi, M. Ito, T.A. Krulwich // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1717. – P. 67-88.
165. Pedersen, K. Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyper-alkaline spring waters of Maqarin in Jordan / K. Pedersen, E. Nilsson, J. Arlinger, L. Hallbeck, A. O'Neill // *Extremophiles*. – 2013. – V. 8. – P. 151-164.
166. Pete, H.Y. Conversion of industrial food wastes by *Alcaligenes latus* into polyhydroxyalkanoates / H.Y. Peter, H. Chua, A.L. Huang, K.P. Ho // *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. NJ.: Humana Press, Totowa, 1999. – P. 445-454.
167. Philip, S. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications / S. Philip, T. Keshavarz, I. Roy // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*. – 2007. – V. 82, № 3. – P. 233-247.
168. Pikuta, E.V. Microbial extremophiles at the limits of life / E.V. Pikuta, R.B. Hoover, J. Tang // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2007. – V. 33. – P. 183-209.

169. Pirog, T.P. Non-traditional producers of microbial exopolysaccharides / T.P. Pirog, A.A. Voronenko, M.O. Ivakhniuk // *Biotechnologia Acta*. – 2018. – V. 11, № 4. – P. 5-27.
170. Poli, A. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities / A. Poli, G. Anzelmo, B. Nicolaus // *Marine drugs*. – 2010. – V. 8, № 6. – P. 1779-1802.
171. Poli, A. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by *Archaea* / A. Poli, P. Di Donato, G. R. Abbamondi, B. Nicolaus // *Archaea*. – 2011. – V. 2011 – P. 693253.
172. Poli, A. Microbial diversity in extreme marine habitats and their biomolecules / A. Poli, I. Finore, I. Romano, A. Gioiello, L. Lama, B. Nicolas // *Microorganisms*. – 2017. – V. 5, № 2. – P. 25.
173. Pramanik, N. Characterization and evaluation of curcumin loaded guar gum/polyhydroxyalkanoates blend films for wound healing applications / N. Pramanik, T. Mitra, M. Khamrai, A. Bhattacharyya, P. Mukhopadhyay, A. Gnanamani, R.K. Basu, P.P. Kundu // *RSC Advances*. – 2015. – V. 5, № 78. – P. 63489-63501.
174. Purohit, M.K. Haloalkaliphilic bacteria: molecular diversity and biotechnological applications / M.K. Purohit, V.H. Raval, S.P. Singh // *Geomicrobiology and Biogeochemistry*. Ed. by N. Parmar, A. Singh. Berlin, Springer, 2013. – P. 61–79.
175. Purohit, M.K. Comparative analysis of enzymatic stability and amino acid sequences of thermostable alkaline proteases from two haloalkaliphilic bacteria isolated from Coastal region of Gujarat, India / M.K. Purohit, S.P. Singh // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2011. – V. 49, № 1. – P. 103–112.
176. Quéméneur, M. Endolithic microbial communities in carbonate precipitates from serpentinite-hosted hyperalkaline springs of the Voltri Massif (Ligurian Alps, Northern Italy) / M. Quéméneur, A. Palvadeau, A. Postec, C. Monnin, V. Chavagnac, B. Ollivier, G. Erauso // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2015. – V. 22. – P. 13613-13624.

177. Quillaguamán, J. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects / J. Quillaguamán, H. Guzmán, D. Van-Thuoc, R. Hatti-Kaul // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – V. 85, № 6. – P. 1687-1696.
178. Rampelotto, P.H. Extremophiles and extreme environments / P.H. Rampelotto // *Life*. – 2013. – V. 3– P. 482-485.
179. Rao, M.B. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases / M.B. Rao, A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – V. 62, № 3. – P. 597-635.
180. Rawlings, N.D. Asparagine Peptide Lyases. A seventh catalytic type of proteolytic enzymes / N.D. Rawlings, A.J. Barrett, A. Bateman // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286, № 44. – P. 38321-38328.
181. Rawlings, N.D. *Handbook of Proteolytic Enzymes Volume 1.* / Ed. by N.D. Rawlings, G. Salvesen. India: Elsevier Ltd, 2013. – 984 pp.
182. Reed, J.C. Protein adaptations in archaeal extremophiles / J.C. Reed, H. Lewis, E. Trejo, V. Winston, C. Evilia // *Archaea Article*. – 2013. – V. 1448. – P. 373275.
183. Rees, H.C. Diversity of Kenyan soda lake alkaliphiles assessed by molecular methods / H.C. Rees, W.D. Grant, B.E. Jones, S. Heaphy // *Extremophiles*. – 2004. – V. 8. – P. 63-71.
184. Rempfert, K.R. Geological and geochemical controls on subsurface microbial life in the Samail Ophiolite, Oman / K.R. Rempfert, H.M. Miller, N. Bompard, D. Nothaft, J.M. Matter, P. Kelemen, N. Fierer, A.S. Templeton // *Front Microbiol.* – 2017. – V. 8. – P. 56.
185. Ren, L. Isolation, identification and primary application of bacteria from putrid alkaline silica sol / L. Ren, Y. Han, S. Yang, X. Tan, J. Wang, X. Zhao, J. Fan, T. Dong, Z. Zhou // *Front. Chem. Sci. Eng.* – 2014. – V. 8. – P. 330-339.
186. Rios, N.S. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications / N.S. Rios, B.B. Pinheiro, M.P. Pinheiro,

R.M. Bezerra, J.C. Sousa dos Santos, L.R.B. Gonçalves // *Process Biochem.* – 2018. – V. 75. – P. 99-120.

187. Rioual, P. Diatom-environment relationships and a transfer function for conductivity in lakes of the Badain Jaran Desert, Inner Mongolia, China / P. Rioual, Y. Lu, H. Yang, L. Scuderi, G. Chu, J. Holmes, B. Zhu, X. Yang // *J. Paleolimnol.* – 2013. – V. 50, № 2. – P. 207-229.

188. Roadcap, G.S. Extremely alkaline (pH > 12) ground water hosts diverse microbial community / G.S. Roadcap, R.A. Sanford, Q. Jin, J.R. Pardinas, C.M. Bethke // *Ground Water.* – 2006. – V. 44, № 4. – P. 511-517.

189. Roohi, R. Cold-active detergentstable extracellular α -amylase from *Bacillus cereus* GA6: biochemical characteristics and its perspectives in laundry detergent formulation / R. Roohi, M. Kuddus, S. Saima // *J. Biochemical Technol.* – 2013. – V. 4. – P. 636-644.

190. Rothschild, L.J. Life in extreme environments / L.J. Rothschild, R.L. Manicynelli // *Nature.* – 2001. – V. 409. – P. 1092-1101.

191. Roy, J.K. Characterization and application of a detergent-stable alkaline alpha-amylase from *Bacillus subtilis* strain AS-S01a / J.K. Roy, S.K. Rai, A.K. Mukherjee // *Int. J. Biol. Macromol.* – V. 50, № 1.– P. 219-229.

192. Sabotic, J. Microbial and fungal protease inhibitors - Current and potential applications / J. Sabotic, J. Kos // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2012. – V. 93, № 4. – P. 1351–1375.

193. Salazar-Ardiles, C. *Staphylococcus sciuri* Strain LCHXa is a Free-Living Lithium-Tolerant Bacterium Isolated from Salar de Atacama Chile / C. Salazar-Ardiles, T. Caimanque, A. Galetović, C. Vilo, J.E. Araya, N. Flores, B. Gómez-Silva // *Microorganisms.* – 2020. – V. 8, № 5.– P. 668.

194. Sarethy, I.P. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology / I.P. Sarethy, Y. Saxena, A. Kapoor, M. Sharma, S.K. Sharma, V. Gupta, S. Gupta // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 38, № 7. – P. 769-790.

195. Sarkar, A. Isolation and characterization of thermophilic, alkaliphilic, cellulose- degrading *Bacillus thermoalcaliphilus* sp. nov. from termite

(*Odontotermes obesus*) mound soil of a semiarid area / A. Sarkar // *Geomicrobiol. J.* – 1991. – V. 9. – P. 225-232.

196. Satpute, S.K. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms / S.K. Satpute, I.M. Banat, P.K. Dhakephalkar, A.G. Banpurkar, B.A. Chopade // *Biotechnology advances.* – 2010. – V. 28, № 4. – P. 436-450.

197. Satyanarayana, T. Extremophilic microbes: diversity and perspectives / T. Satyanarayana, C. Raghukumar, S. Shivaji // *Curr Sci.* – 2005. – V. 89, № 1. – P. 78-90.

198. Sauer, T. Bacterial Milking: A Novel bioprocess for production of compatible solutes / T. Sauer, E.A. Galinski // *Biotechnol. Bioeng.* – 1998. – V. 57, № 3. – P. 306-313.

199. Saxena, K.R. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5 / K.R. Saxena, K. Dutt, L. Agarwal, P. Nayyar // *Biores. Technol.* – 2007. – V. 98. – P. 260-265.

200. Schagerl, M. Dipping into the Soda Lakes of East Africa / M. Schagerl, R.W. Renaut // *Soda Lakes of East Africa*. Ed. by M. Schagerl.: Springer International Publishing, 2016. – V. 1. – P. 3-24.

201. Schmidt, M. High microbial diversity in permanently cold and alkaline ikaite columns from Greenland / M. Schmidt, A. Priemé, P. Stougaard // *Extremophiles.* – 2006. – V. 10. – P. 551-562.

202. Schrenk, M.O. Serpentinization, carbon, and deep life / M.O. Schrenk, W.J. Brazelton, S.Q. Lang // *Mineralogy and Geochemistry.* – 2013. – V. 75, № 1. – P. 575-606.

203. Seckbach, J. Polyextremophiles: Life under multiple forms of stress / J. Seckbach, A. Oren, H. Stan-Lotter. Netherlands. Dordrecht.: Springer, 2013. – 566 pp.

204. Sedlacek, P. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances / P. Sedlacek, E. Slaninova, M.

- Koller, J. Nebesarova, I. Marova, V. Krzyzanek, S. Obruca // *New biotechnology*. – 2019. – V. 49. – P. 129-136.
205. Shariff, F.M. A Newly Isolated Thermostable Lipase from *Bacillus* sp / F.M. Shariff [*et al.*] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – V. 12, №5. – P 2917-2934.
206. Sharma, K.M. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties / K.M. Sharma, R. Kumar, S. Panwar, A. Kuma // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* – 2017. – V. 15. – P. 115-126.
207. Shivanand, P. Utilization of renewable agricultural residues for the production of extracellular halostable cellulase from newly isolated *Halomonas* sp. strain PS47 / P. Shivanand, G. Mugeraya, A. Kumar // *Annals of microbiology*. – 2013. – V. 63, №4. – P. 1257-1263.
208. Singh, A. Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential / A. Singh, A. K. Singh // *Biotechnology letters*. – 2017. – V. 39, № 12. – P. 1793-1800.
209. Singh, P. Potential applications of nanoshells in biomedical sciences / P. Singh, S.S. Cameotra // *J. Drug Target*. – 2004. – V. 22, №. 3. – P. 142-146.
210. Singhal, P. Studies on production, characterization and applications microbial alkaline proteases / P. Singhal, A. Vidyarthi, V. Nigman // *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* – 2012. – V. 3, № 3 – P. 653–669.
211. Skulachev, V.P. Membrane-linked energy transductions. Bioenergetic functions of sodium: H⁺ is not unique as a coupling ion / V.P. Skulachev // *Eur. J. Biochem.* – 1985. – V. 151. – P. 199-208.
212. Slobodkina, G.B. *Inmirania thermothiophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively autotrophic, sulfuroxidizing gammaproteobacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent / G.B. Slobodkina, R.V. Baslerov, A.A. Novikov, M.B. Viryasov, E.A. Bonch-Osmolovskaya, A.I. Slobodkin // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – V. 66, № 2. – P. 701-706.

213. Slonczewski, J.L. pH-regulated genes and survival at extreme pH in *Escherichia coli* and *Salmonella* / J.L. Slonczewski, J.W. Foster // Cell. and Mol. Biol. Ed. by F.C. Niedhardt [*et al.*]. Washington DC.: American Society for Microbiology, 1996. – P. 1539-1549.
214. Sorokin, D.Yu. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov / D.Yu. Sorokin, S. Pelt, T.P. Tourova, S. Takaichi, G. Muyzer // Microbiology. – 2007. – V. 153. – P. 1157-1164.
215. Sorokin, D.Yu. Microbial Isobutyronitrile Utilization under Haloalkaline Conditions / D.Yu. Sorokin, S. Pelt, T.P. Tourova, S. Takaichi, G. Muyze // Applied Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73, № 17. – P. 5574-5579.
216. Sorokin, D.Y. Functional microbiology of soda lakes / D.Y. Sorokin, H.L. Banciu, G. Muyzer // Curr. Opin. Microbiol. – 2015. – V. 25. – P. 88-96.
217. Sorokin, D.Yu. Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian lakes / D.Yu. Sorokin [*et al.*] // Hydrobiologia. – 2004. – V. 522. – P. 235-248.
218. Souza, P.M. A biotechnology perspective of fungal proteases / P.M. Souza [*et al.*] // Brazilian J. Microbiol. – 2015. – V. 46, № 2. – P. 337-346.
219. Suzuki, S. Microbial diversity in The Cedars, an ultrabasic, ultrareducing, and low salinity serpentinizing ecosystem / S. Suzuki [*et al.*] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – V. 110. – P. 15336-15341.
220. Thongthai, C. Halophiles in Thai fish sauce (Nam Pla) / C. Thongthai, P. Suntainalert // General and applied aspects of halophilic microorganisms. New York.: Plenum Press, 1991. – 388 pp.
221. Tiago, I. Microbial and functional diversity of a subterrestrial high pH groundwater associated to serpentinization / I. Tiago, A. Veríssimo // Environ Microbiol. – 2013. – V. 15. – P.1687-1706.
222. Torregrosa-Crespo, J. Biocompounds from *Haloarchaea* and their uses in biotechnology / J. Torregrosa-Crespo, C. Pire Galiana, R.M. Martínez-Espinosa // *Archaea - New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications*. Ed. by H. Sghaier, A. Najjari, K. Ghedira. – 2017. – P. 63-82.

223. Trampe, E. Phototrophic microbes form endolithic biofilms in ikaite tufa columns (SW Greenland) / E. Trampe, R.W. Castenholz, J.E. Larsen, M. Kühl // *Environ. Microbiol.* – 2017. – V. 19. – P. 4754-4770.
224. Tviverdi, R. Microbial diversity of culturable heterophilic bacteria in the tropical saline lakes / R. Tviverdi // *Proceedings of Taal.* – 2007. – P. 2014-2017.
225. Ulukanli, Z. Alkaliphilic Microorganisms and Habitats / Z. Ulukanli, M. Digrak // *Turk. J. Biol.* – 2002. – V. 26. – P. 181-191.
226. Unemoto, T. The bacteria: a treatise of structure and function / T. Unemoto, H. Tokuda, M. Hayashi // *Bacterial Energetics*. Ed. by T.A. Krulwich Orlando.: Academic. – 1990. – V. 12. – P. 33-541
227. Vanitha, N. Optimization and Production of alkaline protease enzyme from *Bacillus subtilis* 168 isolated from food industry waste / N. Vanitha, S. Rajan, A.G. Murugesan // *Int.J. Curr. Microbiol. App. Sci.* – 2014. – V. 3, № 6. – P. 36-44.
228. Ventosa, A. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms/ A. Ventosa, J.J. Nieto // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 1995. – V. 11, № 1. – P. 85-94.
229. Ventosa, A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria / A. Ventosa, J.J. Nieto, A. Oren // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – V. 62. – P. 504–544.
230. Vörös, L. Planktonic bacterial community composition of an extremely shallow soda pond during a phytoplankton bloom revealed by cultivation and molecular cloning / L. Vörös, B. Somogyi // *Extremophiles.* – 2013. – V. 17. – P. 575-584.
231. Vranova, V. Proteolytic activity in soil: A review / V. Vranova // *Applied Soil Ecology.* – 2013. – V. 70. – P. 23-32.
232. Waditee-Sirisattha, R. Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology / R. Waditee-Sirisattha, H. Kageyama, T. Takabe // *AIMS Microbiol.* – 2016. – V. 2, № 1. – P. 42-54.
233. Wang, J. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications / J. Wang, D. R. Salem, R. K. Sani // *Carbohydrate polymers.* – 2019. – V. 205. – P. 8-26.

234. Wani, A.A. Molecular analyses of microbial diversity associated with the Lonar soda lake in India: an impact crater in a basalt area / A.A. Wani [*et al.*] // *Res. Microbiol.* – 2006. – V. 157. – P. 928-937.
235. Wiegel, J. Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles / J. Wiegel // *Extremophiles.* – 1998. – V. 2, № 3. – P. 257-267.
236. Woycheese, K.M. Out of the dark: transitional subsurface-to-surface microbial diversity in a terrestrial serpentinizing seep (Manleluag, Pangasinan, the Philippines) / K.M. Woycheese, D.R. Meyer-Dombard, D. Cardace, A.M. Argayosa, C.A. Arcilla // *Front Microbiol.* – 2015. – V. 6. – P. 44.
237. Wu, Y. pH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution / Y. Wu, J. Zeng, Q. Zhu, Z. Zhang, X. Lin // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – P. 40093.
238. Yadav, A.N. Extreme Cold Environments: A Suitable Niche for Selection of Novel Psychrotrophic Microbes for Biotechnological Applications / A.N. Yadav, P. Verma, V. Kumar, S.G. Sachan, A.K. Saxena // *Biotechnology&Microbiology.* – 2017. – V. 2, № 2. – P. 1-4.
239. Yang, L.F. A Na⁺/H⁺ antiporter gene of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T: Cloning and molecular characterization / L.F. Yang, J.Q. Jiang, B.S. Zhao, B. Zhang, D.Q. Feng, W.D. Lu, L. Wang, S.S. Yang // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2006. – V. 255, № 1. – P. 89-95.
240. Yang, X. The ion chemistry of lakes and late Holocene desiccation in the Badain Jaran Desert, Inner Mongolia, China / X. Yang, M.A.J. Williams // *Catena.* – 2003. – V. 51, № 1. – P. 45-60.
241. Yin, J. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology / J. Yin, J. C. Chen, Q. Wu, G. Q. Chen // *Biotechnology Advances.* – 2015. – T. 33, № 7. – P. 1433-1442.
242. Yu, J. Microbial production of bioplastics from renewable resources / J. Yu // *Bioprocessing for value-added products from renewable resources.* Ed. by S. Yang. Elsevier, 2007. – P. 585-610.

243. Yumoto, I. *Alkalibacterium psychrotolerans* sp. nov., a psychrotolerant obligate alkaliphile that reduces an indigo dye / I. Yumoto, K. Hirota, Y. Nodasak, Y. Yokota, T. Hoshino, K. Nakajima // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2004. – V. 54. – P. 2379-2383.
244. Zhang, G. Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10 / G. Zhang, S. Li, Y. Xue, L. Mao, Y. Ma // *Extremophiles.* – 2012. – V. 16, № 1. – P. 35-43.
245. Zhang, H. Cloning and identification of a novel NhaD-type Na⁺/H⁺ antiporter from metagenomic DNA of the halophilic bacteria in soil samples around Daban Salt Lake / H. Zhang, Z. Wang, L. Wang, R. Mu, Z. Zou, K. Yuan, Y. Wang, H. Wu, J. Jiang, L. Yang // *Extremophiles.* – 2014. – V. 18, № 1. – P. 89-98.
246. Zhang, J. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications / J. Zhang, E. I. Shishatskaya, T.G. Volova, L.F. da Silva, G.Q. Chen // *Materials Science and Engineering.* – 2018. – V. 86. P. 144-150.
247. Zhang, W. Diversity of alkaliphilic bacteria in Hailersoda lakes, Inner Mongolia Autonomous Region of China / W. Zhang, W. Mao, Y. Xue, Y. Ma, P. Zhau // *Biodivers. Sci.* – 2001. – V. 9. – P. 44-50.
248. Zhang, X. Halophiles as chassis for bioproduction / X. Zhang, Y. Lin, G.Q. Chen // *Advanced Biosystems.* – 2018. – V. 2, № 11. – P. 1-12.
249. Zhang, X. Application of (R)-3- hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels / X. Zhang, R. Luo, Z. Wang, Y. Deng, G. Q. Chen // *Biomacromolecules.* – 2009. – V. 10, № 4. – P. 707-711.
250. Zhang, L. Bacterial community changes along a salinity gradient in a Chinese wetland / L. Zhang, G. Gao, X. Tang, K. Shao, S. Bayartu, J. Dai // *Can. J. Microbiol.* – 2013. V. 59, № 9. – P. 611-619.
251. Zhilina, T.N. *Natroniella acetigena* gen. nov., sp. nov., an extremely haloalkalophilic, *homoacetic* bacterium: a new member of Haloanaerobiales / T.N.

Zhilina, G.A. Zavarzin, E.N. Detkova, F.A. Rainey // *Curr. Microbiol.* – 1996. – V. 32. – P. 320-326.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Последовательность гена 16S рРНК штамма *Pseudomonas peli* 3-Т

```
>ТААТАСГААГГГТГСААГСГТТРАТССГГААТТАСТГГГСГТАААГМГКСГТА  
ГГГГТТСАГТРАГТСГГАТГТГАААТСССССГГСТСААСТГГГААСТГСАТСС  
АААСТГСТГАГСТВГАГТАСГГТАГАГГГТГГТГГААТТТСТТГТГАСГГТГА  
ААТГСГТАГАТАТАГГРАГГАААССАГТГГСГААГГСГАССАСТГГАСТГАТА  
СТГАСАСТГАГГТГСГАААГСГТГГГГГАСГАААСАГГАТТАГАТАСССТГГТАГТ  
ССАСГСССГТАААСГАТГТСААСТАГАСНТТГГГГАГТСТТГААСТСТТАГТГГСГС  
АГСТААСГСАТТААГТТГАССССТГГГГАГТАСГГСССГААГГТТААААСТСАА  
АТГААТТГАСГГГГСССГССАААГСГГТГГАГСАТГТГГТТТААТТСГААСГАА  
СГСГААГААСТТАССТГГССТТГАСАТГСТГАГАРСТТТСТАГАГАТАГАТТГГ  
ТГССТТСГГГААСТСАНАСААГГТГСТГСАТГГСГГТСГТСАГСТСГТГТСГТГ  
АГАТГТТГГГТТААНТССНГТААСНАСГСААСССТТГТССТТАГТТАССАГСАС  
ГТААТГГТГГГААСТСТАААГГАГАСТГСССГТГАСАААССГГАААГГТГГГГА  
ТГАСГТСААГТСАТСАТГГСССТТАСГГССАГГГСТАСАСАСГТГСТАСААТГГТ  
СГГТАСАААГГГТТГССААГСССГСАГГТГГАГСТААТСССАТААААССГАТСГТ  
АГТССГГАТСГСАТТСТГСААСТСГАСТГСГТГААГТСГГААТСГСТАГААТСГ  
ТГААТСАСААТГТСАСГГТГААТАСГТТССС
```

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Последовательность гена 16S рРНК штамма *Bacillus aequororis* 5-ДБ

```
>AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTCCTTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGA
GTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCCTCTGACACTCCTAGAGATAGGACGTTCCCCTTCGGGGGAC
AGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACT
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAANGTGGGGATGACGTCAAATCATC
ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACKTGSTACAATGGACGGTACAAAGGGCAG
CAAAACCGYGAGGTCGAGCCAATCCATAWAACCGTTYTCAGTT
```

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Родовой состав по данным метагеномного анализа содового
шламонакопителя завода ОАО «Березниковский содовый завод»
г. Березники, Пермский край

Новая карта			Старая карта	
Техногенные поверхн. образования	Донные осадки	Дистиллерная жидкость	Объединенная проба	Проба с глубины 10 см
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Lactovum</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Cellulomonas</i>
<i>Ralstonia</i>	<i>Sphingomonas</i>		<i>Pseudomonas</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Escherichia/ Shigella</i>	<i>Comamonas</i>		<i>Ralstonia</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Sphingomonas</i>	<i>Subdivision</i>		<i>Legionella</i>	<i>Acinetobacter</i>
	<i>Saccharibacteria</i>		<i>Mesorhizobium</i>	<i>Acetobacterium</i>
	<i>Gp6</i>		<i>Sphingomonas</i>	<i>Clostridium IV</i>
	<i>Aeromonas</i>		<i>Saccharibacteria</i>	<i>Desulfitobacterium</i>
			<i>Aquicella</i>	<i>Desulfosporosinus</i>
			<i>Pelomonas</i>	<i>Pelomonas</i>
				<i>Sphingomonas</i>