

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ СО РАН

На правах рукописи



ЭРДЫНЧЕЕВА Елена Базыровна

**МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ЩЕЛОЧНЫХ ОЗЁР ПУСТЫНИ
БАДАИН ЖАРАН (КИТАЙ) И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ**

03.02.08 – экология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Е.В. Лаврентьева

Научный консультант:
доктор биологических наук
Я.Е. Дунаевский

Иркутск, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Щелочные экосистемы.....	9
1.1.1. Типы содовых озёр.....	9
1.1.2. Механизм формирования содово-соленых озёр.....	11
1.1.3. Формирование озёр в пустыне Бадаин Жаран.....	12
1.1.4. Характеристика и распределение современных содовых озёр.....	14
1.2. Алкалофильное и галофильное микробное сообщество.....	17
1.2.1. Функциональное разнообразие алкалофильного и галофильного микробного сообщества.....	18
1.2.2. Роль микробных сообществ в биогеохимических циклах.....	22
1.2.3. Распространение бактерий в содовых и соленых озёрах Монгольского плато.....	27
1.2.4. Механизм адаптации алкалофильных и галофильных бактерий к высокой щелочности и солёности.....	32
1.2.5. Применение алкалофильных и галофильных гидролитических бактерий в биотехнологическом производстве.....	35
1.3. Протеолитические ферменты. Классификация.....	41
1.3.1. Физиологические функции внеклеточных протеолитических ферментов алкалофильных и галофильных бактерий.....	45
1.3.2. Микробные аминопептидазы. Применение.....	48
1.4. Заключение к литературному обзору.....	50
ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования	52
2.1. Объекты исследования.....	52
2.2. Методы исследования.....	54
2.2.1. Отбор проб.....	54

2.2.2. Физико-химические и гидрохимические методы исследования....	56
2.2.3. Методы молекулярно-генетического анализа.....	56
2.2.4. Методы учёта численности и выделения чистых культур из содово-соленых озёр.....	57
2.2.5. Метод элементного анализа CHN.....	58
2.2.5. Изучение эколого-физиологических свойств чистых культур.....	58
2.2.6. Методы определение внеклеточной протеолитической активности.....	59
2.2.7. Статистическая обработка данных.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	64
3.1. Характеристика экологических условий среды обитания микроорганизмов.....	64
3.2. Таксономическое разнообразие микробных сообществ в различных биотопах.....	68
3.2.1. Влияние экологических факторов на формирование микробных сообществ в различных биотопах.....	71
3.3. Элементный состав CHN в нативных пробах и внеклеточная протеолитическая активность	84
3.4. Эколого-физиологическая характеристика протеолитических бактерий	88
3.5. Внеклеточная протеолитическая активность чистых культур и их функциональная роль.....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	108
ВЫВОДЫ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	137

ВВЕДЕНИЕ

Содово-солёные озёра являются удобной моделью для изучения микробной экологии галоалкалофильных бактерий в природных экстремальных местах обитания и являются объектом интенсивных исследований (Sorokin et al., 2015; Grant et al., 2016; Kulkarni et al., 2019). Это связано с выяснением роли микроорганизмов в функционировании данных экстремальных мест обитания, открытием новых видов галофильных и алкалофильных представителей микробного сообщества, а также с возможностью использования ферментов и других метаболитов этих микроорганизмов в различного рода биотехнологических производствах (Casamayor, 2013; Parmar et al., 2014; Kumar et al., 2015; Malekabadī et al., 2017; Sorokin et al., 2017; Karray et al., 2018; Kevbrin, 2019).

В микробном сообществе гидролитические бактерии являются инициаторами процесса деструкции органического вещества в природных местообитаниях. В составе органического вещества одним из основных компонентов является белок, разложение которого осуществляется пептидазами протеолитических бактерий. Процесс деструкции белка ферментами имеет важное биологическое значение, так как играет регулируемую роль в функционировании как клетки, так и экосистемы в целом (Boltyanskaya et al., 2016; Ruvindy et al., 2016; Vavourakis et al., 2016; Boltyanskaya et al., 2018).

В пустыне Бадаин Жаран расположено более 100 малоизученных трудноступных содово-соленых озёр, различающихся по минерализации, pH и химическому составу. В настоящий момент исследования по изучению разнообразия микробных сообществ в этих содово-соленых озёрах проведены эпизодически (Li et al., 2015; Vanda et al., 2019). Также определение метаболических свойств и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов, выделенных из данных экосистем, ранее не проводились. Это делает актуальным проведение новых исследований, связанных с изучением

распространения, разнообразия и функциональной активности протеолитических бактерий в микробных сообществах экстремальных водных систем.

Цель работы: установить разнообразие галоалкалофильного микробного сообщества и функциональную активность протеолитических бактерий в содово-соленых озёрах пустыни Бадаин Жаран.

Основные задачи исследования:

1. Определить экологические условия, влияющие на формирование состава экстремальных микробных сообществ в содово-соленых озёрах пустыни Бадаин Жаран;

2. Выявить таксономическую структуру микробного сообщества. Установить влияние солёности на формирование состава основных доминирующих групп прокариот с помощью метода секвенирования фрагментов гена 16S рРНК;

3. Определить филогенетическую принадлежность чистых культур протеолитических бактерий и охарактеризовать эколого-физиологические свойства;

4. Установить диапазон функционирования ферментов (рН, температура и солёность) и определить функциональную роль галоалкалофильных пептидаз в деструкции органического вещества.

Научная новизна работы.

Впервые дана характеристика таксономического разнообразия микробных сообществ различных экотопов в содово-соленых озёрах пустыни Бадаин Жаран (Китай) методом высокопроизводительного секвенирования по гену 16S рРНК.

Впервые охарактеризованы протеолитические галоалкалофильные бактерии из содово-соленых озёр пустыни Бадаин Жаран. По эколого-физиологическим свойствам выделенные бактерии относятся к алкалофилам и облигатным алкалофилам, оптимум рН роста которых находится в пределах 8 – 10 с диапазоном роста 7 - 10,5. По отношению к NaCl бактерии проявили свойства облигатных и экстремальных галофилов с диапазоном роста от 20 до 300 г/л.

Впервые дана характеристика протеолитических ферментов у выделенных галоалкалофильных чистых культур на различных *пара*-нитроанилидных

субстратах. Получены препараты пептидаз и охарактеризованы их физико-химические свойства. Показано, что щелочные пептидазы бактерий выдерживают Солёность до 200 г/л и рН до 10,5.

Связь работы с научными программами.

Работа выполнена в рамках темы госзадания № госрегистрации АААА-А17-117011810034-9, и при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки РФ № 6.9754.2017/БЧ.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Полученные данные расширяют представления о разнообразии микробных сообществ в содово-соленых озёрах. Выделенные штаммы бактерий обладают высокой рН и галостабильностью пептидаз. Установлено, что штамм *Halomonas mongoliensis* - активный продуцент металлопептидаз, является устойчивым к воздействию детергентов (SDS, Triton X -100 и H₂O₂). Получены и охарактеризованы 3 лабораторных ферментных препарата.

Результаты исследований используются в учебном процессе при изучении экологии, микробиологии в высших учебных заведениях и подготовке учебно-методических пособий.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Распределение доминирующих таксонов зависит от конкретных экологических условий (солёность, гидрохимические условия и др.). В биотопах с солёностью до 200 г/л доминируют бактерии филумов *Proteobacteria* и *Cyanobacteria*, с увеличением солёности до 277 г/л обнаружена высокая доля бактерий филума *Bacteroidetes*, при минерализации до 495 г/л преобладают экстремально галофильные археи филума *Euryarchaeota*.

2. Протеолитические бактерии семейства *Bacillaceae* и *Halomonadaceae* принимают участие в деструкции органических соединений в местах обитания за счет активного синтеза галоалкалофильных пептидаз. Активность и стабильность пептидаз изученных бактерий позволяют установить границы приспособляемости и функционирования прокариотной клетки в экстремальных условиях среды обитания.

Апробация работы.

Результаты исследований были доложены и обсуждены на конференциях: III Пушчинская школа – конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, 2016), II Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 2017), 13th International Conference on Salt Lake Research (Улан-Удэ, 2017).

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК для публикации материалов кандидатских диссертаций.

Личный вклад.

Автор принимал участие в экспериментальной работе, обработке и обсуждении результатов. Все результаты за исключением химического анализа воды и проведения секвенирования получены автором. Автор проанализировал литературу по теме диссертационной работы, провел статистическую обработку, участвовал в подготовке материала и написании научных статей в рецензируемых журналах.

Объем и структура работы.

Диссертационная работа изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация содержит 15 таблиц и 22 рисунка.

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю к.б.н. Е.В. Лаврентьевой за постановку задач и всестороннюю поддержку и научному консультанту д.б.н., проф. Я.Е. Дунаевскому за помощь в проведении исследовательской работы и интерпретации полученных результатов; д.б.н., проф. Б.Б. Намсараеву и к.б.н. З.Б. Намсараеву за предоставление проб; к.б.н. Н.Л. Бельковой за помощь в обработке молекулярно-генетических результатов, д.б.н., проф. М.А. Белозёрскому и всем сотрудникам лаборатории белков

растений НИИ Физико-Химической биологии МГУ им. Белозёрского за помощь в проведении биохимических анализов и доброе отношение. Автор искренне признателен всем сотрудникам и аспирантам лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН за предоставление технической базы, содействие в процессе работы и моральную поддержку.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Щелочные экосистемы

Содово-солёные озёра встречаются на всех континентах Земли и представляют собой естественно встречающиеся сильнощелочные водные среды, большинство из них являются небольшими водохранилищами с экстремальными физико-химическими условиями, особыми биогеохимическими циклами и уникальными сообществами (Boros et al., 2018). Щелочные экосистемы имеют значительную эстетическую, культурную, экономическую, рекреационную, научную, природоохранную и экологическую ценность (Williams, 2002).

1.1.1. Типы содовых озёр

Содовые озёра содержат большое количество ионов натрия (Na^+) и карбонатные соединения ($\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$), pH в них чаще всего больше 9. Также в содовых озёрах присутствуют высокая концентрация хлоридов, различные концентрации сульфатов и калия и низкая концентрация 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).

Существуют различные комбинации ионов в содовых рассолах, таких как Na-CO_3 , $\text{Na-HCO}_3\text{-CO}_3$, $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-Cl-SO}_4$ и $\text{Na-HCO}_3\text{-CO}_3\text{-Cl}$. Для классификации щелочных экосистем в России используется метод М.Г. Валяшко (Валяшко, 1962), согласно которому выделяют три основных типа: карбонатный, сульфатный и хлоридный.

1. Карбонатный или содовый тип. Главными компонентами рассола являются ионы Na^+ (K^+), Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} . Содержания ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} в жидкой

фазе лежат в пределах растворимости CaCO_3 , MgCO_3 , которые не влияют на ход кристаллизации более растворимых минералов.

2. Сульфатный тип. Главными компонентами являются 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. Есть два подтипа: сульфатномагниевый и сульфатнонатриевый.

3. Хлоридный тип, главными компонентами которого являются 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 и гипсом.

Другую классификацию дает разделение природных вод на нейтральные и щелочные по Эгстеру и Харди (Eugster et al., 1978). Испарение по нейтральному пути определяется отношением $2m [\text{Ca}^{2+}] > 2m [\text{CO}_3^{2-}] + m [\text{HCO}_3^-]$. Щелочной путь осуществляется при отношении карбонатов $2m[\text{Ca}^{2+}] < 2m [\text{CO}_3^{2-}] + m [\text{HCO}_3^-]$. При этом pH составляет 9-10.

Mianping и соавторы предлагают подразделять карбонатный тип 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). Подтип считается сильным, когда $K_c > 29$; умеренным, когда $K_c = 8-29$; слабым, когда $K_c = 0,1-8$.

Авторы Boros and Kolpakova предлагают использовать терминологию «содовый» и «содово-солевой» для различных типов рассолов, соленых или солоноватых вод с карбонатами и бикарбонатами, если состав соответствует следующим критериям:

– содовый: ионы Na^+ и сумма $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$ являются наиболее доминирующими ($> 25 \%$);

– содово-соленый раствор: Na^+ занимает первое место среди доминирующих катионов ($> 25 \%$), но сумма $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$ не является самым доминирующим компонентом анионов ($< 25 \%$) (Boros and Kolpakova, 2018).

Расширенная классификация содовых рассолов не меняет общепринятой классификации химических типов воды, но дает более точное представление об исследуемом объекте. Анализ ясно демонстрирует, что измерение рН само по себе не является надежным индикатором для классификации газообразно-химического типа внутренних и поверхностных рассолов.

1.1.2. Механизм формирования содово-соленых озёр

Процесс выветривания и литогенеза обусловлен взаимодействием географических оболочек Земли, таких как атмосфера, гидросфера и литосфера. При выветривании и седиментогенезе происходит геохимическая дифференциация пород. Она протекает в субаквальных условиях на дне океана и в субаэральных условиях суши. В результате субаэрального химического выветривания происходит формирование химического состава континентальных вод и речного стока в океан. Активным химическим компонентом атмосферы, определяющим кислотно-щелочные реакции, является углекислота. В процессе выветривания углекислота атмосферы расходуется на реакцию с минералами горных пород и приводит к выносу из выветриваемых пород ряда элементов, оставляя алюмосиликатный скелет, компоненты которого стабилизируются в виде глинистых минералов и окислов. Таким образом, получается карбонат-бикарбонатный раствор, выщелачивающий окружающие минералы. Химия содовых озёр сложна и зависит от местных факторов и географического расположения (Grant, 2009; Заварзин, 2007). Щелочность озёр зависит от незначительного количества катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , в большинстве сред подземные воды быстро насыщаются Ca^{2+} и это приводит к осаждению кальцита (CaCO_3) в сочетании с магнезитом (MgCO_3) и доломитом ($\text{MgCa}(\text{CO}_3)_2$). Когда содержания Ca^{2+} и Mg^{2+} превышает концентрацию CO_3^{2-} , то из раствора удаляются карбонаты, тем самым предотвращается образование щелочности и высоко соленые озёра имеют низкий уровень рН (Рис. 1). Если концентрация CO_3^{2-} превышает

концентрацию Mg^{2+} и Ca^{2+} , щелочность увеличивается в результате испарения и, как следствие, сдвига равновесия $CO_2 / HCO_3^- / CO_3^{2-} / O^-$ (Grant, 2009).

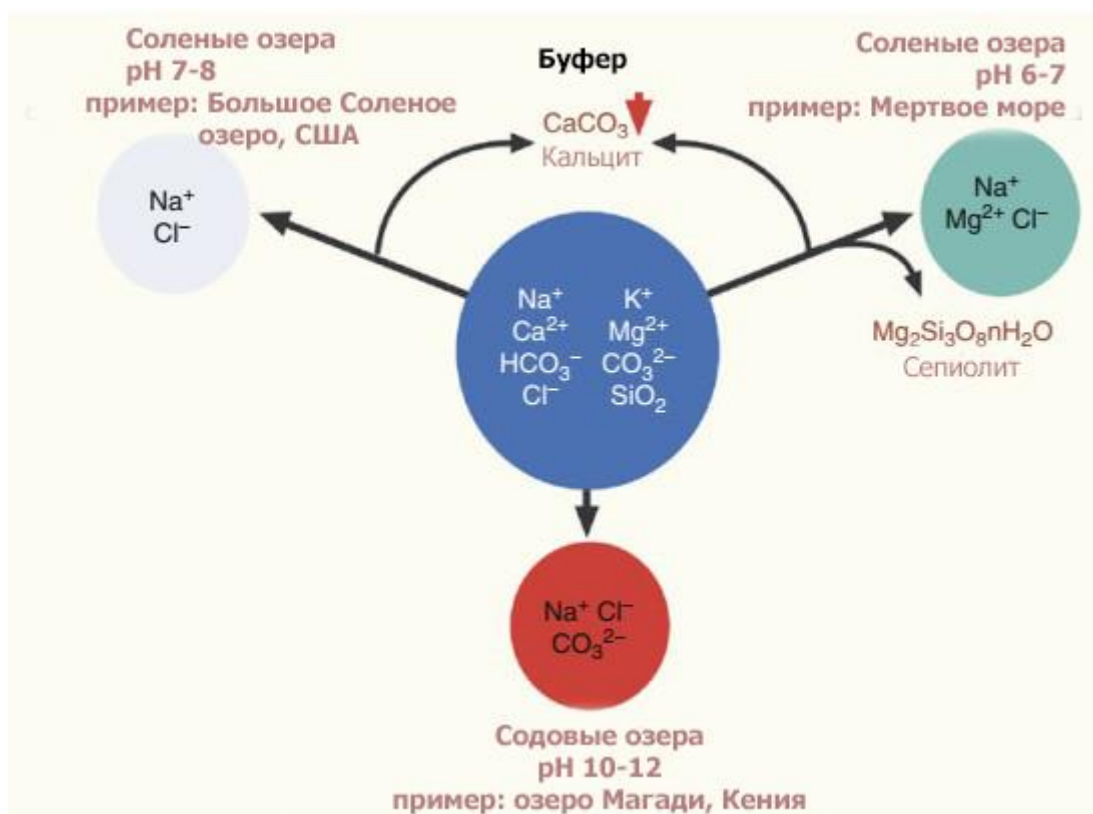


Рисунок 1. Схематическое изображение генезиса соленых и содовых озёр (Grant, 2009)

Таким образом, содовые озёра представляют локальную естественную модель, где происходит процесс континентального углекислотного выветривания в субэрадных условиях под действием атмосферного гидрологического цикла (Заварзин, 2007).

1.1.3. Формирование озёр в пустыни Бадаин Жаран

Пустыня Бадаин Жаран образовалась как минимум 1100 тыс. лет назад в результате поднятия Тибетского плато (Wang et al., 2015a). В ландшафте пустыни Бадаин Жаран преобладают многочисленные большие песчаные дюны и более 100 озёр и родников. Большинство озёр представляют собой постоянные

поверхностные водоемы без явных тенденций к высыханию. Было проведено много исследований по изучению происхождения воды в озёрах (Geyh et al., 1992; Chen et al., 2004; Ma et al., 2006; Gates et al., 2008; Yang et al., 2010; Wu et al., 2014a). Ранние исследования показывают, что озёра образованы подземными водами, которые возникли из-за осадков, а многочисленные песчаные и проницаемые дюны служат эффективным хранилищем для подземных вод, питающих озёра (Hofmann, 1996). Исследования авторов (Chen et al., 2004; Chen et al., 2006) выявили, что вода в озёре в пустыне Бадаин Жаран произошла из озёр Гьяринг, Нгоринг и от таяния снегов на горе Цилян (находится в 500 км к юго-западу пустыни), которые пополнили подземные воды плато Алякса через зону разлома Зигейз-Лангшан. Зона разлома Зигейз-Лангшан рассматривается, как соединение двух платформ, возникших из-за столкновения тектонических плит Индии и Евразии, а также подъема Цинхай-Тибетского плато; земная кора астеносферы (верхняя мантия Земли) была деформирована под действием силы тяжести, так что вся восточная платформа сместилась на восток. Вода из озёр Гьяринг и Нгоринг проникла в зону разлома, и в пустыню Бадаин Жаран вылилось много теплых подземных вод, а затем образовались группы озёр.

Ранние научные исследования многих авторов показали, что вода в озёре и подземных водах пополнялись осадками в начале эпохи Голоцен, когда климат был намного влажнее, чем на сегодняшний день. В эпоху Голоцен из глубоких слоев поступало большое количество CO_2 в подземные воды. При выходе воды из источников из-за перепада давления растворимая в воде CO_2 осаждалась в виде карбоната кальция и со временем образовывались известковые агломераты и известковые слои цементации. Таким образом, на сегодняшний день вода доставляется в озёра пустыни через трещины глубоких карбонатных слоев (Yang et al., 2010; Wang et al., 2015a; Chen et al., 2019). Исследование Wu и соавторов еще раз показали, что подземные воды, которые снабжают озёра в районе песчаных дюн, получены из атмосферных осадков, а возможные области пополнения включает восточные и юго-восточные районы пустыни и прилегающие горы к востоку и югу (Wu et al., 2017). Также подземные воды в

озёрах компенсируют потерю воды от интенсивного испарения. К северо-западу аллювиально-озёрной равнины песчаные дюны постепенно уменьшаются в размерах, а озёра постепенно исчезают (Wang et al., 2015a).

1.1.4. Характеристика и распределение современных содовых озёр

Хорошо изученные содовые озёра расположены в Восточно-Африканской рифтовой долине, в ливийской пустыне (озёро Вади-Натрун) и в Северной Америке (озёро Моно и Мыльное). Также имеются данные о содовых озёрах в Индии и Центральной Азии. В Центральной Азии большое количество степных содовых озёр находится во Внутренней Монголии (Северо-Восточный Китай) и Южной Сибири (Забайкальский край, Республика Тыва и Кулундинская степь) (Zavarzin et al., 1999; Foti et al., 2008; Gorlenko et al., 2010; Grant et al., 2016)

Содовые озёра Восточно-Африканской рифтовой долины являются частью огромного вулканического рифта, который тянется с севера Африки с восточной ветвью через Кению и Танзанию (Grant, 2013). Это закрытые бассейны, образованные грунтовыми водами и сезонными потоками, вытекающими из окружающих горных районов. Климат рифта полусухой или сухой. Скорость испарения превышает скорость притока воды, образуя едкий щелочной рассол с рН от 8,5 до 12. Солёность этих озёр колеблется от 5 до 30 %, отмечается преобладание ионов Na^+ (Jones et al., 1999).

В ливийской пустыне находится множество мелких гиперсоленых озёр Вади-Натрун (Египет), которые впадают в подземные воды реки Нил. рН озёр составляет около 11 с высоким содержанием ионов Na^+ и K^+ в качестве основных катионов. Общая концентрация растворенной соли от 9,0 % до 39 % (Kulkarni et al., 2019).

В Северной Америке - озёро Моно (штат Калифорния), большое мелководное соленое озеро. Уровень рН воды в озёре Моно составляет около 9,8, а концентрация соли достигает 8,4 % - 9,5 %. Концентрация сульфата также высока - 100 мМ (Kulkarni et al., 2019). Озёро Мыльное, расположенное в центральном

штате Вашингтон, содержит высокие концентрации карбоната и сульфата натрия, что приводит к высокой щелочности и рН (около 10), характерным для содовых озёр. Это озеро отличается от многих других из-за резкого расслоения вод с различными характеристиками и из-за высокой концентрации сульфида в анаэробном слое. Нижний слой озера (монимолимнион) является гиперсоленным (140 г/л) и высокосульфидным, с анаэробными водами, содержащими до 200 мМ сульфида, а это самая высокая концентрация, когда-либо зарегистрированная в природной воде. В противоположность этому, верхний слой является солоноватым (около 15 г/л) и аэробным. Он отделен от монимолимниона хемоклином с концентрацией кислорода, изменяющейся от насыщения до нуля. Несмотря на большую разницу в плотности между двумя слоями, сульфид диффундирует в аэробный слой (Sorokin et al., 2007).

Озеро Лонар, расположенное в Индии, является уникальной экосистемой, которая образована воздействием метеорита на базальтовые породы. Кратер Лонар - третье по величине озеро и единственный метеоритный кратер в мире. Водоём пополняется от поступления дождевых, подземных вод и вод от источников, расположенных в скалах на краю озера. Вода в озере является щелочной с рН 10 - 10,5, концентрация сульфата составляет 67 мг/мл, хлорида 2816 мг/мл. Щелочность и солёность увеличиваются в сезон муссонов и после муссонов (Khobragade et al., 2016; Kulkarni et al., 2019). Озеро Самбхар является крупнейшим внутренним соленным и щелочным озером Индии. Это озеро эллиптической формы, область около озера Самбхар состоит из соляных резервуаров и соляных ванн (Gaur et al., 2016). Озера имели значения рН $9,5 \pm 0,2$ и общее содержание соли в диапазоне от 7 % до более 30 %. Хлорид натрия, карбонат натрия, бикарбонат натрия и сульфат натрия были основными солями, присутствующими в озерах, в которых не было двухвалентных катионов (кальция и магния) (Urasani et al., 1990).

Озеро Цинхай - самое большое соленое озеро в Китае, расположено на Цинхай-Тибетском плато на высоте 3196 м над уровнем моря. Солёность озера

составляет 12,5 г/л, рН 9,4. Вода озёра содержит низкие концентрации сульфата и железа (<1 мМ), но высокие концентрации ацетата (40 - 70 мМ) (Dong et al., 2006).

Содовые озёра Кулундинской степи (Алтай, Россия) – Кок-Сода (Север), Соленое, Танатар, Горькое – расположены в зоне сухого климата, в четырех разных частях региона. Характерной особенностью всех этих озёр являются минеральные отложения карбонат/бикарбоната натрия, дающие высокую щелочность и Солёность. рН содовых озёр составил 10 - 10,3, а Солёность варьировала от 6 % до 20 % (Kulkarni et al., 2019).

Около трети всех соленых и содовых озёр в мире можно найти в области, которая простирается от Тибета до всей провинции Цинхай и до автономного района Внутренняя Монголия, хотя многие из них не названы. Эти озёра расположены в криоаридных зонах, где выпадает небольшое количество осадков, и эти, в основном, эфемерные участки подвержены случайному выщелачиванию осадков, на которые дополнительно влияют процессы испарения от постоянного воздействия ветра (Grant et al., 2011).

Таким образом, содовые озёра имеют всемирное распространение (Табл. 1) и являются природными щелочными средами на земле, где значения рН 9 и выше обычное явление (Grant et al., 2011; Grant et al., 2016).

Таблица 1. Всемирное распространение содовых озёр (Grant et al., 2016)

Африка	
Ливия	Феццан
Египет	Вади Натрун
Судан	Малое Кратерное озеро, Дариба
Эфиопия	Арангуади, Килотес, Абиятта, Шала, Читу, Хертале, Метакхара
Кения	Богория, Накуру, Эльментейта, Магади, Симби, Соначи, Туркана
Танзания	Натрон, Эмбаги, Магад, Маньяра, Кусаре, Тулусия, Эль Кехотоито, Момела, Лекандиро, Решитани, Лгария, Ндуту, Балангида, Кратерное озеро Басоту
Уганда	Руква, Катве, Махега, Кикоронго, Нямунука, Мурумумули, Муньянганге, Нуньямпака.
Чад	Боду, Ромбу, Диджикаре, Момбойо, Йоан
Ботсвана	Нгами, Макгадикгади Пан

Остальной мир	
Канада	Озёро Маниту, Гуденау
США	Щелочная долина, Альберт-Лейк, озёро Ленор, Мыльное озёро, Биг-Сода, Оуэнс, Моно, Сирлс, Глубокие источники, Болото Родос, Харни, Летнее озёро, Долина Сюрприз, озёро Пирамид, Уокер, Щелочное, Бура, Юнион Пасифик Лейкс (Грин Ривер), Рагтаун Сода Лейкс
Мексика	Тескоко, Альчичица
Венесуэла	Долина Лагунилья
Чили	Антофагаста, Атаками
Венгрия	Фехер, Келемен-Шек
Россия	Кулундинская степь, Кункуская степь, Алтайская степь, Танатарские озёра, группа озёр Онон-Керуленская, Хатынь, Малые Кастыту, Забайкалье, Шулуутай Каракуль, Араксинская равнина, Верхнее Белое, Нижнее Белое, Гурджиганское, Киранское, Остоже, Доронинское, Приононья, Соленое, Хилганта
Турция	Ван, Салда
Иран	Урмия
Индия	Лонар, Самбхар
Китай	Циньхай, Суй-Юань, Хэйлункян, Кирин, Джехол, Чахар, Шанси, Шэньси, Кансу; Чаханнор, Чаганнор, Чабьер-Цака, Банге, Баер, Удунао, Хаматай, Ксиаринаер, Дали, Сяокуле, Багаеджинор, Хаоджи
Монголия	Хорсмено, Дзун Ульцинъ, Хяргас нуур, Урег-Нуур, Увс-Нуур, Улангом, Ачит-Нуур, Телмен-Нуур, Хара-Ус-Нуур, Хара-Нуур, Дерген-Нуур
Австралия	Корангамит, Ред-Рок, Вероврап, Чиднуп

1.2. Алкалофильное и галофильное микробное сообщество

Микроорганизмы, населяющие содовые и соленые озёра, представлены алкалофильными или галофильными бактериями. Эти бактерии очень хорошо растут при значениях рН выше 9, с оптимум рН около 10, демонстрируя незначительный рост или почти без роста при близких к нейтральным значениям рН. Микроорганизмы, населяющие гиперсоленые содовые озёра, называют галоалкалофилами, которым дополнительно необходим хлорид натрия по меньшей мере 1,5 - 2 М для оптимального роста (Grant et al., 2011; Grant et al., 2016).

1.2.1. Функциональное разнообразие алкалофильного и галофильного микробного сообщества

Содовые и соленые озёра представляют собой сильнощелочные экстремальные среды с концентрацией соли, превышающей в три раза морскую воду до насыщения. Хотя высокая солёность и щелочность чаще всего считаются смертельной для большинства организмов, эти среды часто богаты жизнью и могут содержать высокую биомассу функциональных и таксономически разнообразных сообществ (Jones et al., 1998; Naghoni et al., 2017). Трофическая структура микробного сообщества согласно Заварзину определяется взаимодействиями между функциональными группами микроорганизмов, обладающих специализированными наборами ферментов, дающими им возможность использовать те или иные вещества (Заварзин и др., 2001).

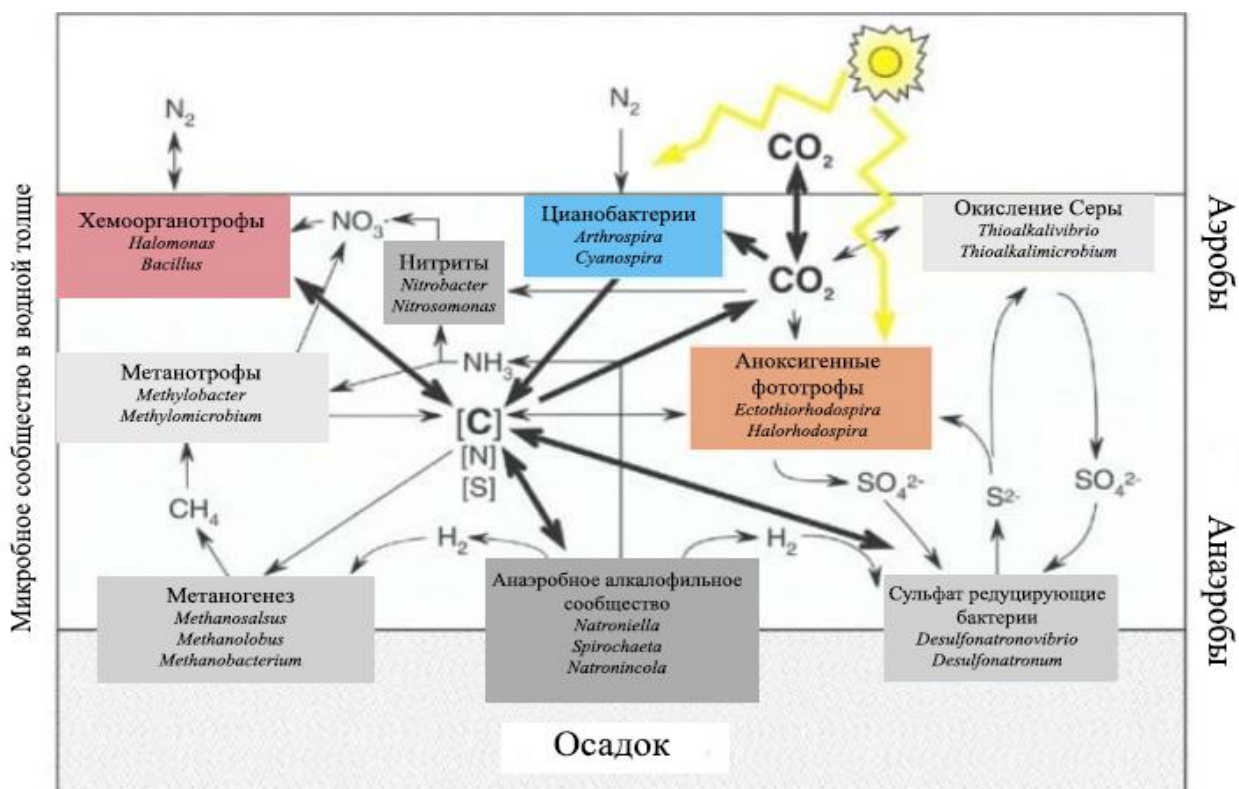


Рисунок 2. Трофическое взаимодействие в экосистеме содового озёра (Grant, 2009).

Продуценты алкалофильного и галофильного микробного сообщества.
Содовые озёра весьма продуктивны из-за высоких температур окружающей

среды, высокой интенсивности света и неограниченной поставки CO_2 через равновесие $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}/\text{CO}_2$. Средняя производительность первичной продукции в озёрах составляет около $0,6 \text{ г/м}^2$ углерода в день. Первичная продукция образуется в результате фотосинтеза, в основном из-за плотного цветения цианобактерий (до 13000 цианобактериальных нитей на миллилитр), являясь основой в пищевой цепи микробного сообщества в любой точке мира (Grant et al., 2016). Цианобактерии важны не только для фиксации CO_2 , и образованию углерода для гетеротрофов, но также способствуют фиксации азота в этих средах и выработке кислорода (Grant et al., 2011).

В микробных матах цианобактерий чаще всего доминирует *Arthrospira* spp. (ранее называлась *Spirulina* spp.), которая играет существенную роль в фиксации азота и образованию кислорода. В зависимости от сезонных факторов могут преобладать *Cyanospira* spp. и одноклеточные цианобактерии родов *Synechococcus* или *Chroococcus* в щелочных экосистемах (Jones et al., 1998; Jones et al., 2000). В исследовании (Samylina et al., 2014) о цианобактериальном сообществе в гиперминерализованном содовом озёре Кулундуйской степи (Россия) было показано доминирование двух нитевидных форм, принадлежащих родам *Nodosilinea* и *Geitlerinema*, тогда как цианобактерией, приспособленной для выживания в насыщенных содовых водоемах, является одноклеточная *Euhalothese natronophila*, одной из первых обнаруженная и выделенная в чистую культуру из содового озёра Магади (Кения) (Sorokin et al., 2015). В соленых озёрах Южного Забайкалья выделены и идентифицированы нитчатые цианобактерии родов *Phormidium*, *Nodularia* и *Pseudanabaena*, которые имеют оптимум развития в щелочном pH и способны развиваться при концентрации NaCl от 0 до 100 г/л (Цыренова и др., 2011). Было обнаружено, что для одноклеточных цианобактерий благоприятен рост при более высоких концентрациях соли (около 7 % хлорида натрия и 10 % соды), а трихомные цианобактерии лучше развиваются при низкой солености и щелочности (Zavarzin et al., 1999).

Аноксигенные фототрофные бактерии вносят существенный вклад в производство первичной продукции в гиперминерализованных содовых озёрах, осуществляющих аноксигенный фотосинтез при участии бактериохлорофиллов. Первое исследование, основанное на чистой культуре, было осуществлено авторами Grant, Mills и Schofield в 1979 г., которые выделили *Ectothiorhodospira* sp. из содового озёра Кении (Grant et al., 1979). Позже Imhoff и соавторы в 1981 г. подтвердили, что анаэробные фототрофные бактерии являются постоянными компонентами содовых озёр, выделив *Ectothiorhodospira vacuolata* из восточноафриканских озёр и соленого болота Иордании (Imhoff et al., 1981). На сегодняшний день имеется различное количество аноксигенных фототрофных изолятов, зарегистрированных в содовых озёрах. Grant, Сорокин и соавторы изучили активность и состав нескольких геохимически активных физиологических групп бактерий в более чем 20 содово-соленых озёрах северо-восточной монгольской степи с солёностью воды от 3 до 390 г/л и значениями pH от 9,0 до 10,6 (Sorokin et al., 2004; Grant et al., 2016). Наибольшая популяция была представлена пурпурными серными бактериями семейства *Ectothiorhodospiraceae*. Солёность была ключевым фактором в определении активности и состава микробных сообществ. Самые разнообразные и активные популяции прокариот, включая аэробные и анаэробные фототрофы, были обнаружены в озёрах с Солёностью менее 60 г/л. В исследовании Горленко и соавторов рассмотрели видовой состав микроорганизмов содового озёра Доронинское (Забайкальский район), акцентируя внимание в отношении фототрофных организмов (Gorlenko et al., 2010). Были обнаружены бактериохлорофилл α содержащие аэробные аноксигенные фототрофные бактерии *Roseinatronobacter* sp., способные окислять тиосульфаты. Пурпурные серные бактерии, принадлежащие к видам *Thioalkalicoccus limnaeus*, *Ectothiorhodospira variabilis* и *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* выделены из донных осадков.

Анаэробные алкалофильные фототрофы в содовых озёрах представлены умеренно солеустойчивыми семействами *Chromatiaceae* (*Thiorhodospira*,

Thiorhodovibrio) и высоко солеустойчивыми *Ectothiorhodospiraceae* (роды *Halorhodospira* и *Ectothiorhodospira*) (Горленко, 2007; Sorokin et al., 2015).

Деструкторы алкалофильного микробного сообщества. Аэробные алкалофильные бактерии используют продукты фотосинтеза и продукты анаэробного разрушения, они весьма разнообразны и изучались в основном с целью поиска источника щелочных ферментов (Zavarzin et al., 1999). В настоящее время существует более 150 описанных бактериальных видов, которые были выделены из содово-соленых мест обитания по всему миру. В выделенных бактериальных штаммах численно доминируют представители филумов *Proteobacteria* и *Firmicutes* с примерно равным количеством аэробов и анаэробов. Подавляющее большинство имеет ближайших гомологов, живущих в менее экстремальных условиях (Grant et al., 2016).

Halomonas sp. являются факультативными анаэробами и составляют, по меньшей мере, 30 % аэробных хемоорганотрофов в культивируемой популяции, при благоприятных обстоятельствах *Halomonas* sp. представляют до 70 % штаммов (Grant et al., 2016). Недавно из солончака был выделен умеренно галофильный штамм *Halomonas saliphila* с оптимальным pH роста 8,0 и Солёностью 10-15 % (Gan et al., 2018).

Спорообразующие алкалофильные бактерии рода *Bacillus* являются основными обитателями содовых озёр, их главное преимущество - это образование спор, на этой стадии *Bacillus* может выдерживать высушивание в сильно минерализованных донных осадках и иле и, следовательно, храниться в сухих образцах (Zavarzin et al., 1999).

Рода *Nocardiopsis* и *Streptomyces* широко распространены и были изолированы из различных содовых озёр по всему миру (He et al., 2015; Zhao et al., 2016). Также было показано существование алкалофильных *Corynebacterium*, *Micrococcus* и *Pseudomonas*, которые обладают большим органотрофным потенциалом и используют глюкозу, пептон, дрожжевой экстракт, казеин, целлюлозу, крахмал и оливковое масло. Многие из них не могут расти при pH <8 (Zavarzin et al., 1999). Хемоорганотрофные бактерии гидролизуют полимеры и

производят аминокислоты и сахара, которые в свою очередь используют анаэробные микроорганизмы.

Анаэробы в содовых озёрах вероятнее всего являются «вторичными органотрофами», использующими продукты первичного гидролиза, обеспечиваемые аэробами и факультативными анаэробами. Анаэробы состоят из двух подгрупп: те, которые деградируют полимеры, и те, которые используют полученные мономеры. В содовых озёрах преобладают галоалкалофильные анаэробы филума *Firmicutes*, такие рода как *Anoxynatronum*, *Anaerovirgula*, *Alkaliphilus*, *Natranaerobius* и *Natranaerobaculum* и некоторые виды *Anaerobranca*, *Spirochaeta* и *Anaerobacillus* (Zavarzin et al., 1999; Grant et al., 2011; Grant et al., 2016).

Аэробные и анаэробные хемоорганотрофы способны ферментировать ряд полимеров, таких как хитин (Sorokin et al., 2012a), целлюлоза (Zhilina et al., 2005a), пектин (Sorokin et al., 2012b), а также сбраживают сахара и аминокислоты до конечных продуктов, таких как ацетат, формиат, лактат и водород. Выделенные штаммы из содовых озёр могут осуществлять нитрат редукицию, фиксировать азот, восстанавливать железо и мышьяк (Grant et al., 2016).

Хемолитотрофы учувствуют во взаимопревращении различных валентных состояний углерода, азота и серы в содовых озёрах. Изучение этих циклов начали проводить в Кулундинской степи (Алтай, Россия), хотя первые выделения аэробных сульфатредуцирующих и сульфатвосстанавливающих бактерий были из африканских содовых озёр. Первые хемолитотрофные нитрифицирующие бактерии также были одновременно изолированы из африканских и российских содовых озёр (Grant et al., 2011).

1.2.2. Роль микробных сообществ в биогеохимических циклах

Цикл серы. Сульфидогенез (Рис. 3В) является характерным процессом для содовых озёр, приводящим к образованию сульфидов из сульфата, сульфита, тиосульфата и серы. Эти реакции могут выполнять облигатно анаэробные и

облигатно галоалкалофильные бактерии. (Sorokin et al., 2014a). Большинство содовых озёр показывают наличие черного осадка, хотя высокий уровень pH препятствует высвобождению H_2S , сохраняя его в виде сульфидного аниона (S^{2-}). Измеренные нормы сокращения сульфатов в содовых озёрах сопоставимы с уровнями в морских отложениях (Grant, 2009).

К концу XX столетия были успешно выделены два штамма класса дельтапротеобактерий *Desulfonatrovibrio hydrogenovorans* (Zhilina et al., 1997) и *Desulfonatronum lacustre* (Pikuta et al., 1998). Оба организма используют водород в качестве донора электронов и, вероятно, играют важную роль в потреблении водорода в сообществе содового озёра. В этом отношении потребление H_2 этими бактериями на 3-4 порядка значительнее, чем метаногенами, использующими водород (Grant, 2009). Анаэробные алкалофильные сульфатвосстанавливающие бактерии, которые могут образовывать водород, демонстрируют высокие показатели использования углерода, указывая на их важную роль в межвидовом переносе водорода.

При низкой концентрации соли в содовых озёрах микробное сообщество включает ассоциацию «*Candidatus Contubernalis alkalaceticum*» и *Desulfonatronum cooperativum* (Zhilina et al., 2005b), а в гиперминерализованных озёрах сообщество содержит коалицию «*Candidatus Syntrophonatronum acetioxidans*» и *Desulfonatronospira* sp. (Sorokin et al., 2014b).

Poser и соавторы впервые сообщают о диспропорционировании элементарной серы тремя чистыми культурами галогеналкилильных бактерий, выделенных из содовых озёр: *Deltaproteobacteria* - *Desulfurivibrio alkaliphilus* и *Desulfurivibrio* sp. AMeS2 и член *Clostridia*, *Dethiobacter alkaliphilus*. Изолированные штаммы не требуют присутствия трехвалентного железа для осаждения токсичных сульфидных соединений (Poser et al., 2013).

В анаэробных условиях фототрофные бактерии, такие как *Halorhodospira* spp. и *Thiorhodospira* spp., окисляют восстановленную серу. В содовых и соленых озёрах Моно (Калифорния), Магади (Кения), Кулундинской степи (Алтай, Россия) и озёр Забайкалья были обнаружены литотрофные сульфидные бактерии родов

Thioalkalimicrobium и *Thioalkalivibrio*. Они используют восстановленные соединения серы, включая сульфид, полисульфид, тиосульфат, политионаты и элементарную серу в качестве донора (Sorokin et al., 2014a).

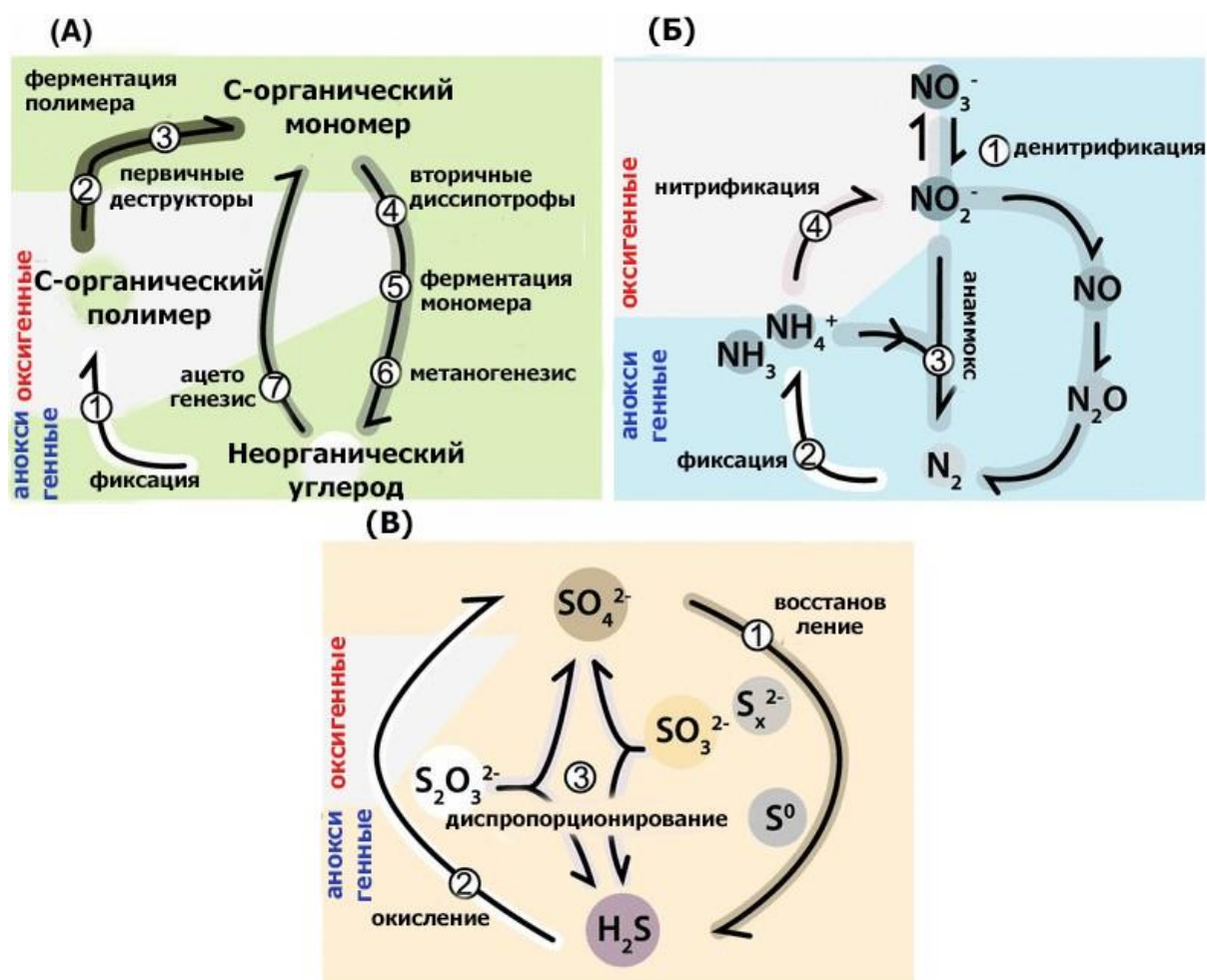


Рисунок 3. Микробные опосредованные биогеохимические окислительно-восстановительные циклы в содовых озёрах. (А) Цикл углерода, (Б) Цикл азота и (В) Цикл серы (Sorokin et al., 2014a).

Цикл азота. В алкалофильном микробном сообществе осуществляется сложный цикл взаимопревращений N_2 и его различных соединений с участием кислорода или водорода (Рис. 3Б). Денитрификация в содовых озёрах осуществляется хемолитотрофными бактериями рода *Thioalkalivibrio*, способными восстанавливать нитрат до нитрита, и органотрофными микроорганизмами рода *Halomonas*, играющими немаловажную роль в цикле азота (Sorokin et al., 2014a).

Фототрофные бактерии, присутствующие в содовых озёрах, вероятно, способны фиксировать азот. Автор Oremland в 1990 году зафиксировал азотфиксацию для нитевидных не содержащих гетероцисты цианобактерий подобных *Phormidium* и зеленых водорослей, относящихся к *Ctenocladus*, озёра Моно (Калифорния). Но до конца неясно, отвечали ли фототрофные или гетеротрофные бактерии за наблюдаемую diaзотрофию (Sorokin et al., 2014a). Гетеротрофные анаэробные галоалкалифалы активно фиксируют азот в содовых озёрах. Эти организмы представлены двумя группами *Firmicutes*: умеренным солеустойчивым *Anaerobacillus diazotrophicus* (переклассифицированным из *Bacillus alkalidiazotrophicus*) (Sorokin et al., 2008a) и галотолерантным *Natronobacillus azotifigans* (Sorokin et al., 2008b).

Аммоний, образующийся при фиксации азота в содовых озёрах, может быть окислен до нитрата через нитрит галогеналкилильными нитрификаторами. Окисление аммония до нитрита осуществляется *Nitrosomonas*, окисление нитритов, возможно, выполняется умеренным алкалофилом *Nitrobacter alkalicus* (Sorokin et al., 2014a).

Цикл метана в содовых озёрах является неотъемлемой частью цикла микробиологического углерода и тесно взаимодействует с бактериями, выделяющими водород (Рис. 3А) (Болтянская, 2006). Метаногенные археи, выделенные на сегодняшний день, в основном, являются метилотрофными, использующие целый ряд углеродных соединений, включая метанол и метиламин. Алкалофильные метаногены были отнесены к родам *Methanosalsum*, *Methanolobus*, *Methanohalophilus* и *Methanocalculus*. Существуют также водород-утилизирующие алкалотолерантные метаногены рода *Methanobacterium* spp. Метан-окисляющие бактерии требуют аэробные или микроаэрофильные условия и относятся к родам *Methylobacter* и *Methylomicrobium*. Метанотрофия обеспечивает возвращение метанового углерода в общий пул органических веществ (Grant, 2009).

Археи в содово-соленых озёрах. В высокоминерализованных содовых и соленых рассолах были обнаружены галофильные и алкалофильные прокариоты

домена *Archaea* на таких географических объектах, как озеро Магади в Кении, Вади Натрун в Египте, озеро Оуэнс в Калифорнии, содовые озера Китая, Внутренней Монголии и Тибета, содовые почвы России и содового озера в Индии (Grant et al., 2011). Галоалкалофильные археи представляют собой отдельную физиологическую группу, которая окрашивает озера в ярко-красный цвет из-за производства каротиноидов. Эти организмы связаны с обязательной щелочностью, обычно растут при pH 8,5 - 11,0 с оптимумом 9,5-10,0 и с не менее 1,5 М концентрацией NaCl.

Первый зарегистрированный штамм был выделен из озера Магади в Кении, где авторы разработали подходящую высоко щелочную солевую среду. Помимо обязательного требования к высокому pH, проявляемому галоалкалофильными штаммами в отличие от нейтрофильных галоархей, этот штамм имел очень низкие требования к Mg^{2+} , что являлось следствием жизни в щелочных рассолах, по существу лишенных Mg^{2+} , который удалялся осаждением в виде нерастворимого $MgSO_4$ (Tindall et al., 2009). Позже из озера Вади Натрун в Египте выделили и описали еще один штамм рода *Halobacterium* (переименован *Natronomonas*) (Soliman et al., 1982). На сегодняшний день более 20 валидированных алкалофильных и галофильных штаммов зарегистрировано в разных родах, которые относятся к классу *Haloarchaea* (порядок *Halobacteriales*, семейство *Halobacteriaceae*), типичными представителями являются: *Halobacterium salinarum*, *Halococcus morrhuae*, *Natronobacterium gregoryi*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloferax volcanii*, *Natronococcus occultus*, *Halobaculum gomorense*, *Halorubrum saccharovororum*, *Natrialba asiatica*, *Natronomonas pharaonis*, *Halovivax asiaticus*, *Halopagnicola larsenii*, *Haladaptatus paucihalophilus*, *Halopiger xanaduensis*, *Haloplanus natans*, *Haloquadratum walsbyi*, *Halosarcina pallida* и *Natronoarchaeum mannanilyticus* (Kocur et al., 1973; Tindall et al., 1984; Torreblanca et al., 1986; Kamekura et al., 1995; Oren et al., 1995; Bardavid et al., 2007; Burns et al., 2007; Castillo et al., 2007; Gutiérrez et al., 2007; Savage et al., 2008; Kamekura et al., 2009; Oren et al., 2009; Shimane et al., 2010; Minegishi et al., 2012). Классификация основана главным образом на трех таксономических признаках:

последовательности гена 16S рРНК, полярной липидной композиции и ДНК-ДНК-гибридизации (Grant et al., 2011).

В высокоминерализованных озёрах относительно низкое содержание кислорода из-за его пониженной растворимости (2×10^{-6} в насыщенном NaCl по сравнению с 7×10^{-6} в морской воде), в связи с этим было отмечено, что анаэробные аноксигенные бактерии, такие как *Halorhodospira* spp., сосуществуют с алкалофильными *Haloarchaea*. Они являются аэробными гетеротрофами, иногда использующими другие акцепторы электронов, такие как нитрат (Itoh et al., 2005). Вероятно, в высокоминерализованных озёрах *Haloarchaea* развиваются до высоких плотностей, получая углерод и клеточный белок из аноксигенных фототрофных бактерий и менее солеустойчивых ционабактерий, которые появляются во время сезонного разведения в дождливые сезоны (Grant et al., 2016). Известно, что галофильные археи способствуют кристаллизации в нейтральных солнечных солеварнях и также почти наверняка в щелочных средах галита (Grant et al., 2011).

1.2.3. Распространение галоалкалофильных бактерий в содово-соленых озёрах Монгольского плато

Для представления о структуре и функциях микробного сообщества содовых и соленых озёр необходимо охарактеризовать их таксономический состав. До развития молекулярных методов характеристику разнообразия осуществляли классическим методом культивирования на различных средах. Физиологические типы включали протеолитические, сахаролитические, ацетогенные, сульфатредуцирующие бактерии, метаногенные и галофильные археи (Jones et al., 1998; Zavarzin et al., 1999). Из-за трудности в культивировании многих организмов традиционные методы не дают полную оценку микробного разнообразия содовых озёр. Молекулярные методы, разработанные в течение последних нескольких десятилетий, позволили изучить микробное разнообразие во всей его полноте, независимо от их способности расти в лабораторных

условиях (Gilbert, 2010). Технологические достижения в секвенировании, клонировании и сравнительном анализе последовательностей дают ценную информацию о микробной экологии и открывают представление о полном биологическом разнообразии (Mering Von et al., 2007; Purohit et al., 2013; Ferrer et al., 2011). Следуя этим прогрессивным методам, многие авторы изучили филогенетическое разнообразие содовых и соленых озёр Монгольского плато, а именно Китая, Внутренней Монголии и Забайкальского края.

Так, Ма и соавторы изучили бактериальное разнообразие содового озёра во Внутренней Монголии (Китай). В библиотеке доминировали 16S рДНК грамтрицательных бактерий (24 % *a-Proteobacteria*, 31 % *b-Proteobacteria*, 33 % *c-Proteobacteria* и 2 % *d-Proteobacteria*), более низкий процент клонов соответствовал грамположительным бактериям (Ma et al., 2004). Сорок клонированных последовательностей были аналогичны последовательностям известных бактериальных изолятов (> 97 % сходства последовательностей), представленных видами родов *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas* и *Klebsiella*. Восемнадцать клонированных последовательностей показали меньшую принадлежность к известным таксонам (<97 % сходства последовательностей) и могут представлять собой новые таксоны.

Был проанализирован микробный состав озёра Цинхай (Китай) по глубине, по характеристике библиотек генов 16S рРНК. *Alpha-*, *Beta-* и *Gamma*proteobacteria и *Bacteroidetes* доминировали на границе в водно-осадочном слое, *Firmicutes* стал преобладающей группой в бескислородных отложениях (Dong et al., 2006). Авторы пришли к выводу, что присутствие *Actinobacteria* и *Acidobacteria/Holophaga* в существенной пропорции в осадках озёра Цинхай уникально. Разнообразие архей было намного ниже, и последовательности клонов отнесены к филумам *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota*. Клоны архей не были связаны ни с одной известной культурой, но были связаны с последовательностями, ранее обнаруженными в богатых метаном осадках.

Также исследовали микробиологическое разнообразие и структуру сообщества в поверхностных осадках девяти Цинхай-Тибетских озёр с

использованием методики секвенирования Illumina Miseq (Yang et al., 2016). Результаты показали, что состав общего микробного сообщества изученных озёр значительно коррелировал ($r = 0,631$, $P < 0,001$) с солёностью озёра вместо географической дистанции. Это говорит о том, что солёность озёра важнее географической дистанции при формировании микробного разнообразия и структуры сообщества в исследуемых образцах. Редкие таксоны более чувствительны к солёности. Доминирующими филумами (среднее относительное содержание $> 1\%$) в изученных осадках были *Euryarchaeota*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Thermi* и *Verrucomicrobia*.

Pagaling и соавторы использовали независимые методы исследования прокариотической биогеографии водного столба в шести солёных озёрах Внутренней Монголии (Китай) и солёном озёре в Аргентине (Pagaling et al., 2009). Эти озёра имели разный солевой состав и значения pH и находились на разных географических расстояниях как на местном, так и на межконтинентальном уровнях, что позволило исследовать состав микробного сообщества в контексте, как современных условий окружающей среды, так и географической дистанции. Матрицы биотического подобия использовались в сочетании с матрицами подобия окружающей среды и матрицей расстояний по тесту Мантелла, чтобы обнаружить, какие факторы существенно влияют на биотическое подобие. Было показано, что на биогеографию архей влияют только современные факторы окружающей среды (концентрация ионов Na^+ , $\text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^-$, pH и температура). На бактериологическую биогеографию влияли, как современные факторы окружающей среды (концентрация ионов Na^+ , Mg^{2+} , HCO_3^- , pH), а также географическое расстояние. По сути, озёра, относительно близкие друг к другу, с аналогичными химическими веществами, имели сходные популяции, но большие географические расстояния между озёрами влияют на популяционную структуру бактериального сообщества.

Было охарактеризовано прокариотическое сообщество солёных озёр в пустыне Бадаин Жаран (Внутренняя Монголия, Китай) с помощью библиотеки

генов 16S рРНК (Li et al., 2015). Солёность воды в озёрах варьировала от 165 до 397 г/л с рН выше 10. В образцах доминировали *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria*, *Firmicutes* и *Verrucomicrobia*, археи принадлежали к филумам *Halobacteriaceae* и *Euryarchaeota*.

Представлено описание макроструктуры, ультраструктуры и видового разнообразия алкалофильного мата из озёра Хилганта (Бурятия) (Gerasimenko et al., 2003). Было установлено, что структура этого мата аналогична структуре галофильных матов из гиперсоленых лагун озёра Сиваш (Крым). *Microcoleus chthonoplastes* была доминирующей формой цианобактерий в обоих матах. Видовое разнообразие микроорганизмов в алкалофильном мате было столь же богатым, как и у галофильного мата; однако в галофильном мате распределение организмов между слоями было более четким. В алкалофильном мате наибольшее разнообразие видов наблюдалось в верхних слоях, на границе между зонами кислородного и аноксигенного фотосинтеза. Этот факт можно объяснить эфемерным характером содовых озёр.

Методом ПЦР-ДГГЭ, основанным на разделении амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК в химическом денатурирующем градиенте, показали таксономический состав микробиоценозных матов и поверхностного слоя илистых песков озёра Соленое (Кяхтинский район, Республика Бурятия) (Егорова и др., 2011). В отобранных образцах доминировали нитчатые *Oscillatoria brevis* и одноклеточная *Gloeocapsa minuta*. На поверхности черного сероводородного ила в береговой зоне наблюдается развитие матов пурпурного цвета, образованных пурпурными бактериями. Озеро отнесено к содовым водоемам с гидрокарбонатно-хлоридным типом вод.

Горленко и соавторы рассмотрели видовой состав и вертикальное распределение микроорганизмов в водном столбе, микробном мате береговой линии и небольших грязевых вулканах стратифицированного содового озёра Доронинское (Забайкальский край) (рН воды составляет 9,72, минерализация 32,3 г/л) (Gorlenko et al., 2010). Были обнаружены алкалофильный вид сероокисляющих бактерий рода *Thioalkalivibrio*, литогетеротрофные бактерии

Halomonas spp., а также бактериохлорофилл α -содержащие аэробные аноксигенные фототрофные бактерии (AAP) *Roseinatronobacter* sp., способные окислять тиосульфаты. Согласно результатам анализа гена 16S рРНК, пурпурные серные бактерии относятся к виду *Thioalkalicoccus limnaeus*, *Ectothiorhodospira variabilis*, “*Ect. magna*,” и *Ect. shaposhnikovii* и были выделены из образцов глубоководных осадков.

Было изучено микробное сообщество донных осадков солоноватого озёра Белое (Забайкальский край) (Zaitseva et al., 2014). Установлено значительное разнообразие микроорганизмов с преобладанием цикла серы в микробном сообществе верхнего слоя осадка. По результатам пиросеквенирования гена 16S рРНК бактерии, участвующие в образовании и окислении H_2 , были численно преобладающими и очень разнообразными. По количеству последовательностей и родов преобладали филумы *Proteobacteria* (52,98 %), *Bacteroidetes* (18,40 %) и *Firmicutes* (6,5 %). *Hydrogenophaga* spp., доминирующая в сообществе, является аэробным или факультативно анаэробным хемолитоавтотрофом, использующим окисление водорода в качестве источника энергии. Она играет важную роль в переходных зонах смешения подземных и поверхностных вод.

Представлены результаты анализа микробных сообществ в 13 содово-соленых озёрах Онон-Керуленской группы (Забайкалье и Северо-Восточная Монголия) (Абидуева и др., 2006). рН у исследуемых озёр составлял от 8,5 до 10,5, а минерализация достигала до 382,8 г/л. Также авторы показали в микробных матах и донных осадках сезонную и межгодовую динамику численности различных физиологических групп бактерий-деструкторов органического вещества и скорости микробных процессов.

Были изучены щелочные и соленые озёра Приононья, Забайкальского края (рН до 10,1 и минерализация до 470 г/л) (Абидуева и др., 2017). Исследованием микробных сообществ в воде и донных осадках установлено, что доминирующими филумами являются *Proteobacteria* (30 - 52 %), *Firmicutes* (5 - 20 %) и *Bacteroidetes* (11 - 24 %) с отличиями на уровне классов и родов. В

микробном сообществе высокоминерализованного озёра Борзинское выявлена существенная доля археобактерий класса *Euryarchaeota* (33 %).

Лаврентьева и соавторы по результатам секвенирования суммарной ДНК изучили микробное сообщество в соленом озёре Гуджирганское (Баргузинская долина, Северное Прибайкалье), относящемуся к сульфатно-натриевому типу (Лаврентьева и др., 2018). Показано, что в донных осадках, преобладали типичные представители засоленных мест обитания. В микробном сообществе доминировали классы *Clostridia* 19,9 % и *Gammaproteobacteria* 27,4 %, ответственные за деструкцию органического вещества. *Gammaproteobacteria* представлена большой группой хемоорганотрофных бактерий — *Alcanivorax*.

1.2.4. Механизм адаптации алкалофильных и галофильных бактерий к высокой щелочности и солёности

Алкалофильные и галофильные микроорганизмы обладают специализированной клеточной адаптацией для сохранения осмотического баланса в окружающей агрессивной среде. Микроорганизмы, которые не приспособлены к сильно засоленной среде, будут терять воду, в результате чего клетки будут усыхать и это приведет к утрате клеточной структуры и функции (Рис. 4а). Галофильные бактерии во избежание чрезмерной потери воды адаптировались – разработали две стратегии для увеличения осмотического давления в цитоплазме до сопоставимого с внешней средой:

1. Производство совместимых органических растворенных веществ – осмопротекторов (Рис. 4б);

2. Достижение равновесного состояния, при котором общая концентрация соли в клетках совпадает с концентрацией в окружающей среде (Рис. 4в) (Edbeib et al., 2016).

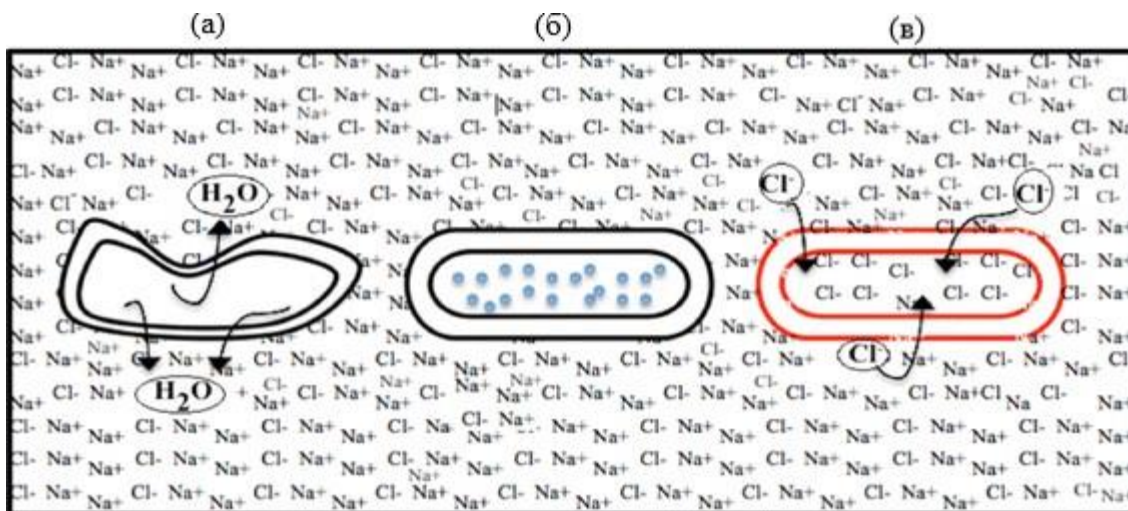


Рисунок 4. Адаптация галофильных бактерий к гиперсоляной среде. **а).** Не галофильная бактерия. **б).** Умеренная галофильная бактерия. **в).** Экстремальная галофильная бактерия (Edbeib et al., 2016).

Умеренные галофильные бактерии, которые процветают в средах с колеблющейся Солёностью, то есть концентрации соли могут достигать молярных уровней и затем упасть до почти пресноводных концентраций после дождя, демонстрируют гибкие средства для поддержания осмотического давления, как-то продукцию осмопротекторов (осмолитов). Эти осмолиты защищают микробные белки от денатурации в воде с низкой концентрацией соли, одновременно повышая устойчивость микробов к резким колебаниям во внешней солевой среде (Mevarecha et al., 2000). Наиболее предпочтительными органическими осмолитами бактерий являются эктоин и бетаин, далее следуют определенные аминокислоты (глутамат, пролин) и дисахариды (сахароза, трегалоза). Накопление осмолитов является частью адаптации к солевому стрессу у многих известных галотолерантных непатогенных и патогенных бактерий (например, штаммов *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Corynebacterium glutamicum*, *Listeria monocytogenes*) (Banciu et al., 2013).

Экстремальные галофилы адаптированы к высоким содержаниям солей в окружающей среде за счет накопления неорганических ионов внутриклеточно для баланса концентрации соли в среде. У галофильных бактерий есть Cl^- насос, который транспортирует Cl^- из окружающей среды в цитоплазму. На обоих

концах канала расположены аргинин или лизин, чтобы облегчить поглощение Cl^- и высвобождение (Edbeib et al., 2016).

Экстремальные археи, устойчивые к высокой солености, поддерживают свой осмотический баланс путем концентрации катиона K^+ внутри клеток, за счет согласованного действия мембраносвязанного бактериородопсина протонного насоса, АТФ-синтазы и антипортера Na^+/H^+ . Это приводит к появлению электрического потенциала, который управляет поглощением K^+ в клетках через механизм K^+ -унипорта. Электрический потенциал должен быть больше, чем диффузионный потенциал катиона K^+ , чтобы противоион Cl^- поглощался первичным или вторичным транспортерами (Kixmüller et al., 2012).

С развитием молекулярно-генетических методов было показано, что у прокариот имеются гены, которые отвечают за функционирование нескольких групп трансмембранных антипортерных белков $\text{Na}^+ (\text{Li}^+)/\text{H}^+$. Антипортеры $\text{Na}^+ (\text{Li}^+)/\text{H}^+$ играют важную роль в поддержании цитоплазматического гомеостаза Na^+ и высоких значений рН 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*, *narA*, *NhaP*, *mleN*, *nhaG*, *nhaK* и *nhaH*. Второй класс, содержащий несколько субъединиц, кодируется мультицистронным опероном (функциональная единица генома), таким как *mnp*, *mnh*, *pha* и *sha* (Meng et al., 2014; Zhang et al., 2014). Kopejtko и соавторы обнаружили, что у всех галоалкалифильных штаммов присутствует ген *mnpB*, кодирующий субъединицу В антипортера $\text{Na}^+ (\text{Li}^+)/\text{H}^+$ MRP. Этот ген отсутствует у всех не алкалофильных штаммов, что указывает на его важность для адаптации к высоким значениям рН (Kopejtko et al., 2018). Было показано, что у штаммов *Alkalimonas amylolytica* и *Halobacillus dabanensis* присутствует ген *NhaD*, который поддерживает антипортовую активность $\text{Na}^+ (\text{Li}^+)/\text{H}^+$ в диапазоне концентраций Na^+ от 6 до 50 г/л с оптимальным значением 35 г/л (Yang et al., 2006; Liu et al., 2005).

1.2.5. Применение алкалофильных и галофильных гидролитических бактерий в биотехнологическом производстве

Экстремальные алкалофильные и галофильные бактерии обладают метаболической активностью в условиях стресса (высокий рН и солёность). Эти микроорганизмы способны к производству экономически жизнеспособных продуктов, а именно: метаболитов, внеклеточных ферментов, осмотически активных веществ, экзополисахаридов и специальных липидов. Они имеют важное биотехнологическое значение в различных отраслях, таких как производство продуктов питания, фармацевтических препаратов, кожи, бытовой химии и т.д. (Li et al., 2012a ; Dawson et al., 2012; Charlesworth et al., 2016). Поиск и разработка новых продуктов, которые могут функционировать в экстремальных условиях окружающей среды, привлекают пристальное внимание научных сообществ в последние годы (Ruiz et al., 2012).

Бактериородопсин. Некоторые чрезвычайно галофильные и галоалкалофильные археи, содержащие мембранные ретинальные пигменты, бактериородопсин (БР) и галородопсин (ГР), могут использовать световую энергию для осуществления биоэнергетических процессов путем генерации протонного и хлоридного градиентов, соответственно.

БР способен преобразовывать свет в электрический импульс. Свет, ударяющий по датчику, может быть обнаружен с использованием оксидного электрода в электропроводящем геле, так как заряд, смещенный БР, может быть передан на электрод (Vsevolodov et al., 1994). БР 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). БР, выделенный из штамма *Halobacterium salinarum* S9 в виде готового продукта, предлагается как фиолетовые мембранные пластинки. Продажу осуществляет испанская компания (COBEL, Barcelona) и немецкая фирма (MIB, Мюнхенские инновационные

биоматериалы) в лиофилизированной форме с содержанием БР 75 % (по весу). МПВ также предлагает пленки и устройства, изготовленные из генетически модифицированного БР, для хранения и обработки оптической информации (Margesin et al., 2001).

Оптические свойства БР могут быть использованы для изготовления электронных чернил для дисплеев ноутбуков, компьютеров. Электронные чернила получают свой цвет, отражая окружающий свет, а не от внутреннего источника света, управляемого батареей. Это использование будет важным вкладом в проблему срока службы батареи в портативных компьютерах (Mathews et al., 2017).

Совместимые растворенные вещества. Осмотически активные вещества, либо совместимые растворенные вещества, поддерживают галотолерантную/галофильную клетку в положительном водном балансе и совместимы с клеточным метаболизмом. Эти низкомолекулярные вещества представляют собой водорастворимые сахара или сахарные спирты, другие спирты, аминокислоты или их производные (Ventosa et al., 1995). Совместимые растворенные вещества представляют интерес для биотехнологии в качестве стабилизаторов биомолекул (ферментов, ДНК, мембран) и целых клеток, антагонистов соли или стресс-защитных агентов (Margesin et al., 2001). Один из самых распространенных осмолитов в природе является эктоин. Для его получения был создан биотехнологический процесс под названием «бактериальное доение» из галотолерантного микроорганизма *Halomonas elongata*. Наиболее перспективное применение эктоина – в качестве стабилизатора в полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Sauer et al., 1998). Производные эктоина запатентованы как увлажняющие средства в косметологии для ухода за стареющей, сухой или раздраженной кожей (Motitschke et al., 2000).

Биополимеры. Биосурфактанты усиливают восстановление загрязненной нефтью почвы и воды. Уменьшая поверхностное натяжение, они повышают растворимость и, следовательно, подвижность гидрофобных углеводов, что может способствовать деградации. Таким образом, микроорганизмы,

продуцирующие биоповерхностные вещества, галофильные /галотолерантные, могут играть важную роль в ускоренном восстановлении засоленных сред, загрязненных нефтью (Singh et al., 2004).

Одним из наиболее эффективных биосурфактантов является ликенизин, циклический липопептид, полученный *Bacillus licheniformis* JF-2 (Thomas et al., 1993). Ликенизин не зависит от температур, диапазонов pH и концентраций соли, характерных для многих нефтяных резервуаров (McInerney et al., 1990). Для получения этого липопептида был разработан непрерывный процесс, что привело к увеличению выхода от 5,3 до 11,2 мг/л. Ликенизин коммерциализирован Multi-biotech (Geodyne Technology, ОАЭ)(Desai et al., 1997).

Галофильные и алкалофильные микроорганизмы синтезируют экзополисахариды, устойчивые к экстремальным значениям солености и pH. Была выделена группа галоалкалофильных штаммов рода *Halomonas*, которые способны производить экзополисахариды с биотехнологическим потенциалом (Bejar et al., 1998). Синтезируемые экзополисахариды состоят из трёх типов нейтральных сахаров (глюкозы, маннозы, рамнозы), белков, гексозаминов, уроновой кислоты, ацетиловых остатков и некоторых катионов. Также экзополисахариды показали высокое содержание серы (1,3-24,7 %) и псевдопластичность, т.е. увеличение скорости сдвига приводит к снижению вязкости полимерного раствора (Margesin et al., 2001; Enache et al., 2015; Kanekar et al., 2017). Благодаря этому свойству экзополисахариды могут быть использованы в качестве загустителя и эмульгатора в производственном процессе, а из-за большого содержания сульфата – в фармацевтической промышленности в качестве противовирусных, противоопухолевых и антикоагулянтных веществ. Из-за значительного количества уроновой кислоты такие полисахариды могут быть использованы в процессах обеззараживания сточных вод (Bejar et al., 1998; Ventosa et al., 1998; Margesin et al., 2001).

Галоалкалофильные бактерии имеют уникальные липиды, которые по своему химическому составу связаны с эфиром, в связи с этим обладают высокой химической стабильностью и устойчивостью к эстеразам, и, следовательно, более

высокой выживаемостью, чем липосомы на основе производных жирных кислот (Ventosa et al., 1995; Margesin et al., 2001). Новый тип липосом имеет большое значение в косметической и фармацевтической промышленности (Delgado-García et al., 2015). Из экстремальных галофильных архей *Halobacterium cutirubrum* были получены эфирные липиды, которые устойчивы к воздействию фосфолипазы A2 и B и могут храниться 60 дней в атмосфере воздуха (Margesin et al., 2001).

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой семейство биоразлагаемых и биосовместимых сложных полиэфиров, которые накапливаются алкалогалофильными микроорганизмами. Свойства некоторых ПГА сопоставимы со свойствами полиэтилена и полипропилена, полученных из нефти, и могут быть использованы в некоторых областях. Tan et al. (2011) разработали нестерильный и непрерывный процесс ферментации на основе галофильной бактерии *Halomonas* TD01, которая показала большой потенциал для производства низкокзатратных ПГА. *Halomonas* TD01 накапливает ПГА более 80 % на среде с глюкозой. Было обнаружено, что *Halomonas campaniensis* LS21 способен расти в искусственных смешанных субстратах, похожих на морские воды и отходы кухни, состоящих из целлюлозы, белков, жиров, жирных кислот, крахмала, и продуцирует ПГА до 70 % (Yin et al., 2015; Yue et al., 2014). Применение галофильных бактерий в промышленной биотехнологии является недорогой платформой для производства ПГА, поскольку может снижать затраты в процессах ферментации из-за высокой концентрации соли, предотвращая загрязнение негалогенофильными веществами, следовательно, снижая затраты на энергию и сложность процесса стерилизации; морская вода может использоваться в качестве солесодержащей среды, что снижает потребление пресной воды; недорогие субстраты, включая смешанные субстраты из кухонных отходов и/или целлюлозу, могут быть использованы для некоторых галофилов для снижения стоимости субстрата (Yin et al., 2015).

Гидролитические ферменты. Галоалкалофильные микроорганизмы способны секретировать внеклеточные гидролитические ферменты, такие как амилазы, липазы, протеазы, ксиланазы и целлюлазы. Гидролитические

галофильные ферменты адаптированы к высоким концентрациям соли и широкому диапазону pH. Благодаря этим уникальным свойствам галофильные ферменты привлекательны для биотехнологических применений в неблагоприятных условиях (Yin et al., 2015; Karray et al., 2018).

Амилазы представляют собой класс гидролаз, которые катализируют разложение крахмальных полимеров с образованием декстринов или различных глюкоолигосахаридов различной длины. Амилазы широко используются в биотехнологии, например, в пищевой промышленности, где они активно используются в хлебопекарстве для улучшения объема теста, цвета и мягкости мякиша. Амилазы также применяются в моющих средствах для ускорения удаления пятен и используются в целлюлозно-бумажной промышленности для модификации крахмалов для мелованной бумаги (Setati, 2010). Распространенными галофильными амилазами являются цикломальтодекстриназы. Их продуцируют *Micrococcus halobius*, *Halomonas meridiana*, *Halobacillus* spp., *Halothermothrix orenii* и *Streptomyces* spp. Как правило, оптимальная температура для амилаз составляет 50 °C, и они способны действовать в широком диапазоне pH. Амилазы, продуцируемые *Halobacillus* spp. и *Chromobacter* spp., стабильны при pH 7–10 (Setati, 2010; Delgado-Garcia et al., 2012; Yin et al., 2015).

Микробные протеазы являются одними из наиболее изученных ферментов, широко применяются в промышленных процессах и составляют примерно 40 – 60 % продаж от общих ферментов во всем мире (Setati, 2010; Zhou et al., 2018). Они обычно используются в качестве детергентов в стиральных порошках, в пищевой промышленности, в фармацевтических препаратах, при производстве кожи, в управлении отходами, а также в извлечении серебра (Setati, 2010). Большинство щелочных протеаз из галоалкалофильных бактерий обнаружено в грамположительных штаммах рода *Bacillus*, а также в грамотрицательных бактериях родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Vibrio*. Большинство щелочных протеаз относится к сериновым протеазам либо металлопротеазам и имеют

оптимальный рН около 8 - 11 и оптимальную температуру около 40 – 65 °С (Zhou et al., 2018).

Целлюлазы, полученные из галоалкалофильных микроорганизмов, могут быть использованы для обработки сельскохозяйственных отходов и биоремедиации целлюлозных материалов (Amoozegar et al., 2015). Галофильные целлюлазы были получены из штаммов родов *Bacillus* spp., *Salinivibrio* spp., *Halomonas* spp. и по своим физико-химическим параметрам являются солеустойчивыми, щелочеустойчивыми и термостабильными. В связи с этим могут быть применимы в прачечных, в текстильной и пищевой промышленности (Yin et al., 2015).

Липазы и эстеразы, полученные из микроорганизмов, получают все больше внимания из-за их стабильности, безопасности, широкого диапазона температур, солености и рН, простоты ферментации и очистки (Ai et al., 2018). Липазы необходимы для гидролиза жира, этерификации, переэтерификации, трансэтерификации и органического биосинтеза, при производстве лекарств в фармацевтической промышленности. Также могут быть использованы в молочной промышленности для гидролиза молочного жира, в кожевенной промышленности для удаления подкожного жира, в бумажной промышленности для удаления примесей из хлопкового сырья и в качестве добавок в моющие средства. Эстеразы гидролизуют водорастворимые сложные эфиры и могут быть использованы для стереоспецифического гидролиза, трансэтерификации и биосинтеза сложных эфиров и других органических соединений (Amoozegar et al., 2015). На сегодняшний день описаны галоалкалофильные липазы и эстеразы родов *Bacillus*, *Halobacillus*, *Salinivibrio*, *Chromohalobacter*, *Pelagibacterium* и *Planomicrobium* (Rohban et al., 2009; Li et al., 2012b; Amoozegar et al., 2015; Akbari et al., 2016; Esakkiraj et al., 2016; Malekabadi et al., 2017; Ai et al., 2018).

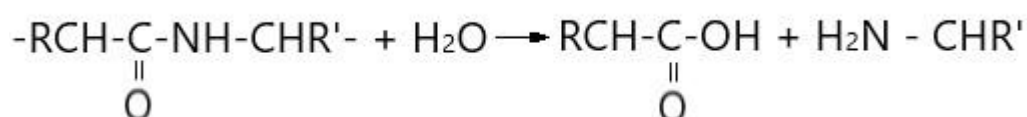
Ксиланазы представляют собой гидролазы, которые случайным образом расщепляют β -1,4-связь ксилана. Галоалкалофильные ксиланазы могут потенциально использоваться для биологического обесцвечивания бумаги и целлюлозы, для обработки сельскохозяйственных отходов, биоремедиации

ксилансодержащих материалов, а также для применения в текстильной промышленности (Menon et al., 2010; Yin et al., 2015). Эти ферменты были выделены из *Glaciecola mesophila*, *Chromohalobacter* sp., *Nesterenkonia* sp., *Streptomyces rochei* L10904 и *Bacillus pumilus* GESF-1. Они показали стабильность при pH 6-11 и температуре выше 60°C (Yin et al., 2015; Li et al., 2018).

Помимо гидролитических ферментов, упомянутых выше, сообщалось о галоалкалофильных бактериях, продуцирующих ферменты, такие как пуллулазазы, хитиназы, пектиназы, инулиназы и ДНКазы. Эти ферменты также являются полиэкстремофильными и необходимы в различных отраслях промышленности (Yin et al., 2015).

1.3. Протеолитические ферменты. Классификация

Протеолитические ферменты (пептидазы) относятся к классу гидролаз (класс 3), в составе которых образуют особый подкласс пептид-гидролаз. Пептид-гидролазы катализируют реакцию расщепления пептидной связи в белках и пептидах общего типа:



Очевидная функция внеклеточных протеолитических ферментов бактерий — это расщепление белков и других высокомолекулярных субстратов, содержащихся в окружающей среде, и превращение их в форму, способную легко проникать внутрь микробной клетки (Мосолов, 1971). Пептидазы обнаружены во всех живых организмах и необходимы для роста и дифференцировки клеток.

Пептидазы могут быть сгруппированы:

- по источнику производства: животному, растительному и микробному;
- в соответствии с местом расщепления пептидной связи: экзопептидазы (КФ 3.4.11-19) и эндопептидазы (КФ 3.4.21-99);
- по механизму действия и строению активного центра;

– по гомологии (выполняющие одну функцию) и молекулярной структуре (Silva da, 2017).

Они также могут быть классифицированы в соответствии с диапазоном pH, в котором они имеют более высокую активность: кислый (pH от 2,0 до 6,0), нейтральный (pH от 6,0 до 8,0) и щелочной (pH от 8,0 до 13,0) (Souza et al., 2015).

Экзопептидазы действуют только вблизи концов полипептидных цепей, расщепляют крайнюю (либо вторую-третью) с N- или C-конца пептидную связь, на этом основании они подразделяются на аминопептидазы и карбоксипептидазы.

Аминопептидазы (КФ 3.4.11.) действуют на свободный N-конец полипептидной цепи и высвобождают один аминокислотный остаток, дипептид или трипептид. Они широко распространены у животных, растений и микроорганизмов. В настоящее время микроорганизмы представляют собой наиболее перспективный источник получения аминопептидаз за счет высокого биохимического разнообразия бактерий и относительно высокой стабильности и активности фермента (Lei et al., 2017a). Аминопептидазы совместно с другими пептидазами осуществляют полную деградацию таких белков как казеин, глютен, коллаген и желатин (Wu et al., 2014b). Эти ферменты активно изучаются у экстремофильных микроорганизмов: термофильных (Porciero et al., 2005) и галофильных бактерий (Lei et al., 2017b; Lei et al., 2017a) и архей (Franzetti et al., 2002).

Карбоксипептидазы (КФ 3.4.12) действуют на C-концах полипептидной цепи и высвобождают одну аминокислоту или дипептид. Карбоксипептидазы можно разделить на три основные группы – сериновые карбоксипептидазы, металлокарбоксипептидазы и цистеинкарбоксипептидазы – в зависимости от природы аминокислотных остатков в активном центре ферментов (Souza et al., 2015). Сериновые карбоксипептидазы, выделенные из видов *Penicillium*, *Saccharomyces* и *Aspergillus*, похожи по своей субстратной специфичности, но немного отличаются по другим свойствам, таким как оптимум pH, стабильность, молекулярная масса и действие ингибиторов. Металлокарбоксипептидазы из

Saccharomyces spp. и *Pseudomonas* spp. требуют Zn^{2+} или Co^{2+} для их деятельности (Rao et al., 1998).

Эндопептидазы характеризуются преимущественным действием на пептидные связи во внутренних областях полипептидной цепи. Эндопептидазы по их каталитическому типу делятся на: аспартильные, цистеиновые, сериновые, металлопептидазы, треониновые и глутаминовые пептидазы (Rawlings et al., 2011; Rawlings et al., 2013).

Сериновые пептидазы (КФ 3.4.21) составляют наиболее распространенную группу пептидаз, которая характеризуется наличием одного активного остатка серина в активном центре, что имеет решающее значение для их каталитического действия. Сериновые пептидазы с молекулярной массой от 18 до 35 кДа проявляют максимальную активность при pH 6 - 11 (Souza et al., 2015; Silva da, 2017). Щелочные сериновые пептидазы имеют различное применение: для обработки кожи, улучшения вкуса сыра и в производстве моющих средств. Эта пептидазная группа ингибируется фенилметилсульфонилфторидом (PMSF), ингибитором трипсина, антипаином, химостатином и другими (Silva da et al., 2014).

В цистеиновых пептидазах (КФ 3.4.22) присутствует каталитическая диада гистидина и цистеина. В папаиноподобной цистеинпептидазе каталитический аппарат обычно состоит из триады гистидина, цистеина и аспарагиновой кислоты. Цистеиновые пептидазы проявляют максимальную активность при pH 4,5-7 и имеют молекулярную массу около 20-35 кДа. Цистеинпептидазы ингибируются йодоуксусной кислотой, N-этилмалеимидом и E-64. Самой известной цистеиновой протеазой является папаин (Brocklehurst et al., 2013).

Аспаратные эндопептидазы (КФ 3.4.23), известные как кислые пептидазы, имеют каталитический аппарат с двумя остатками аспарагиновой кислоты. Оптимальная активность аспартилпептидазы обнаруживается при pH от 3 до 6, эти пептидазы ингибируются пепстатином, продуцируемым *Streptomyces* в присутствии Cu^{2+} (Yegin et al., 2011).

Металлопротеазы (КФ 3.4.24) – наиболее разнообразная из каталитических типов протеаз. Для них характерна потребность в ионе двухвалентного металла для их активности, чаще всего цинка (Souza et al., 2015). Также для катализа у ферментов использовались ионы кобальта, марганца, никеля, меди и железа. Активный центр содержит последовательность His-Glu-X-X-His. Металлопептидазы, на катализ которых влияет удаление двухвалентных ионов, ингибируются хелатирующими агентами, такими как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА) (Silva da, 2017).

Треониновая пептидаза была открыта в 1995 году, и в настоящее время доступна лишь небольшая информация об этой группе ферментов. Открытие пятого протеазного каталитического типа произошло, когда была определена кристаллографическая структура эукариотической протеасомы из *Saccharomyces cerevisiae*, показывающая N-концевой треонин в активном центре (Ward et al., 2009). Комплексная протеасома важна при деградации белков в клетке. В этом внутриклеточном комплексе гидроксильная группа треонинового остатка действует подобно нуклеофильному агенту, и в исследованиях протеолитического ингибирования отмечалась устойчивость к обычным ингибиторам пептидаз. (Silva da, 2017).

Глутаминовые пептидазы, шестой каталитический тип протеолитических ферментов, был получен из бывших пепстатин-нечувствительных карбоксильных пептидаз. Глутаминовые пептидазы являются действующими в кислых условиях сериновыми протеазами, имеющими каталитический механизм, отличный от аспартильных протеаз. Эти ферменты были обнаружены у *Styloidium lignicola* и *Aspergillus niger var. macrosporus* и продемонстрировали максимальную активность при pH 2 и 1,1, используя казеин и гемоглобин в качестве субстрата соответственно (Ward et al., 2009).

1.3.1. Физиологические функции внеклеточных протеолитических ферментов алкалофильных и галофильных бактерий

Бактерии вырабатывают большое количество пептидаз, которые являются внутриклеточными и внеклеточными. Протеолитические ферменты играют критическую роль во многих физиологических процессах. Внутриклеточные пептидазы необходимы для дифференцировки, обмена белков, созревания ферментов и поддержания клеточного пула белков. Внеклеточные пептидазы разлагают нерастворимые белки и растворимые крупные полипептиды до более мелких пептидов и аминокислот, которые позволяют клетке поглощать и использовать гидролитические продукты (Ward et al., 2009; Souza et al., 2015). Внеклеточные пептидазы часто имеют широкую субстратную специфичность и могут разрушать большинство неструктурных белков, таких как альбумин, казеин, инсулин или гемоглобин (Kalisz, 1988).

В экосистеме внеклеточная протеолитическая активность зависит от факторов окружающей среды (Cunha et al., 2010). Внеклеточным пептидазам необходимо долго избегать разрушения, чтобы найти свой субстрат и быть полезными для своего микроорганизма-продуцента. Дополнительно внеклеточным пептидазам необходимо быть адаптированными к физико-химическим параметрам окружающей среды, чтобы быть пригодными для катализа. В связи с чем поступление сигнала в клетку из окружающей среды необходимо для соответствующей экспрессии гена и последующей продукции фермента. Таким образом, внешняя среда влияет на молекулярный контроль синтеза фермента (Chróst, 1991).

Температура является значимым физическим фактором, влияющим на синтез и секрецию внеклеточных пептидаз микроорганизмов (Cunha et al., 2010). Было показано, что протеолитические ферменты микроорганизмов, обитающие в холодных (Feller et al., 1996; Siddiqui et al., 2006) или в горячих (Leuschner et al., 1995) местах обитания, имеют низкий и высокий температурный оптимум пептидаз, соответственно. Это важный адаптационный механизм влияния

температуры на соответствие ферментных систем внешней среде (Cunha et al., 2010).

Пептидазы из галоалкалофильных микроорганизмов активны в широком диапазоне температур от 30 до 80 °С. Более высокая оптимальная температура ферментативной активности при 90°С зарегистрирована из экстремально галофильной и алкалофильной бактерии *Oceanobacillus iheyensis* (Purohit et al., 2011) Присутствие соли, полиэтиленгликоля и ионов Ca^{2+} повышает термостабильность очищенной пептидазы (Ghorbel et al., 2003; Dodia et al., 2008).

Внеклеточные ферменты напрямую зависят от рН окружающей среды, поскольку изменение концентрации ионов водорода в окружающей среде изменяет состояние ионизации аминокислот и трехмерной структуры активного центра фермента (Cunha et al., 2010). Помимо этого, рН среды влияет на доступность питательных веществ, на метаболические реакции, на генетический регуляторный механизм и на изменение диффузионного барьера клеточных мембран (Mokashe et al., 2018). Отклонения от оптимального значения рН приводят к снижению активности фермента (Chróst, 1991; Cunha et al., 2010). Для синтеза пептидаз галоалкалофильными бактериями оптимальный рН находится в диапазоне от 7 до 11. Joshi et al. (2007) сообщили о штамме *Bacillus cereus* МТСС 6840, который продуцировал максимальное количество фермента при рН 9 через 24 ч при температуре 25 °С. Присутствие Fe^{2+} и Co^{2+} стимулировали активность фермента. Ibrahim et al. (2015) выделили галотолерантную алкалофильную щелочную пептидазу с оптимальным рН 11 из *Bacillus* sp. NPST-AK15.

Каталитическая активность и стабильность пептидаз галоалкалофильных бактерий требуют присутствия специфических солей - NaCl / KCl . Эти соли должны присутствовать для регулирования ионной силы раствора и для поддержания активной конформации пептидазы. Степень стабилизации и активности внеклеточных пептидаз зависит от концентрации этих солей. Пептидазы галоалкалофильных бактерий активны и стабильны при 4 М NaCl с оптимальным диапазоном 1-2 М (Mokashe et al., 2018). Также степень стабилизации фермента галоалкалофильных бактерий определяется

соотношением белок-соль (Dodia et al., 2008). Повышенная концентрация NaCl обеспечивает защиту гидрофобных аминокислот, повышает активность фермента и термическую устойчивость пептидазы, но механизм на сегодняшний день не выяснен до конца (Mokashe et al., 2018). Однако у галоалкалофильного штамма *Bacillus pseudofirmus* защитный эффект воздействия NaCl на клетку не был подтвержден в отношении термостабильности фермента (Raval et al., 2014). Протеолитические ферменты, полученные из штаммов *Halobacterium* sp. HP25, *Bacillus subtilis* BLK-1.5, *Halobacillus* sp. CJ4 и *Salinicoccus* sp. UN-12, показали максимальную ферментативную активность в присутствии 4,3 М, 1,2 М, 2 М и 0,35 М хлорида натрия соответственно (Mokashe et al., 2018). Эти различия в активности вышеперечисленных пептидаз из бактерий могут быть связаны с устойчивостью к хлориду натрия, с составом питательной среды и с изменением ингредиентов среды под воздействием высокой концентрации соли.

Помимо хлорида натрия, ионы металлов также значительно влияют на ферментативную активность и стабильность галоалкалофильных пептидаз. Ионы металлов ведут себя как «электрофильные катализаторы» во время реакций (Thaz et al., 2014). Было зарегистрировано несколько сообщений об усилении термостабильности и улучшении активности внеклеточных галофильных пептидаз в присутствии ионов металлов, таких как Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} и Mn^{2+} (Mokashe et al., 2018). Щелочная пептидаза, выделенная *Salinicoccus* sp. ООН-12, была активной в NaCl (до 4 М) и проявляла повышенную активность в присутствии CaCl_2 , KCl и MnCl_2 (Mokashe et al., 2017). Штамм *Bacillus* sp. APCMST-RS3 показал оптимальную активность при pH 9, температуре 60 °C и в присутствии ионов MnCl_2 , CaCl_2 , HgCl_2 и BaCl_2 (Maruthiah et al., 2015). Внеклеточная пептидаза из *Virgibacillus* sp. SK33 показала увеличение активности в 2,5 раза в присутствии 100 мМ Ca^{2+} , Mg^{2+} и Sr^{2+} (Sinsuwan et al., 2010).

1.3.2. Микробные аминопептидазы. Применение

Аминопептидазы (α -аминоацилпептидгидролазы, КФ 3.4.11) представляют собой экзоферменты, которые гидролизуют пептидные связи на N-конце белков и полипептидов. Аминопептидазы являются одними из самых ранних обнаруженных пептидаз (Gonzales et al., 1996).

Аминопептидазы способствуют утилизации питательных веществ, деградации белков, переработке цитозольных белков и рециклизации аминокислот (Mendez et al., 2014). Микробные аминопептидазы играют важную роль в использовании экзогенных белков в качестве источника незаменимых аминокислот, которые могут быть использованы для синтеза белка, генерации метаболической энергии и рециркуляции восстановленных кофакторов. Аминопептидаза взаимодействует с другими пептидазами, вызывая полную деградацию белков, таких как казеин, глютен, коллаген и желатин. Также, действуя в сочетании с другими пептидазами, завершает различные протеолитические пути (Nandan et al., 2017a).

Классификация аминопептидаз. Существуют несколько систем классификации аминопептидаз:

- по субстратной специфичности: широкая или узкая;
- по клеточному расположению: мембранная, цитозольная и микросомальная;
- по молекулярной структуре;
- по каталитическому механизму: металлоаминопептидазы, цистеиновые аминопептидазы и сериновые аминопептидазы (Nandan et al., 2017a).

Металлоаминопептидазы ингибируются хелатирующими агентами, такими как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), ЭГТА (этиленгликоль тетрауксусной кислоты) и 1,10-фенантролином. Металлоаминопептидазы составляют 85 % известных аминопептидаз и широко распространены во многих микроорганизмах. Каталитический механизм включает нуклеофильную атаку на пептидную связь и опосредуется молекулой воды, которая активируется катионом

двухвалентного металла. Известными металлическими лигандами металлопептидаз являются остатки His, Glu, Asp и Lys. В дополнение к этим металлическим лигандам для катализа необходим, по крайней мере, один дополнительный остаток, которым может быть Glu, Lys или Arg (Rawlings et al., 2013). Металлоаминопептидазы используют механизм реакции, сходный с механизмом металлопротеаз, несмотря на различия в структуре и металлических центрах. На расщепляемую пептидную связь воздействует молекула воды, которая активируется при взаимодействии с ионом металла и остатком фермента (Nandan et al., 2017b). Активность металлоаминопептидаз регулируется наличием катионов двухвалентных металлов и ингибируется хелатирующими агентами.

Цистеиновые и сериновые аминопептидазы, в отличие от металлоаминопептидаз, не имеют ионного кофактора, связанного с их структурой. Катализ требует высокоактивного остатка цистеина или серина и встречается реже у бактерий, чем у металлоаминопептидазы. Представляют менее 20 % бактериальных аминопептидаз, изученных до настоящего времени (Gonzales et al., 1996). Для обоих типов каталитические реакции начинаются с нуклеофильного взаимодействия серы сульфидной группы (цистеиновые аминопептидазы) или кислорода гидроксильной группы (сериновые аминопептидазы), а также углерода карбонильной группы, вовлеченной в поиск пептидной связи субстрата. Активный центр этих ферментов содержит другие остатки, которые завершают каталитическую реакцию, и их функция состоит в основном в достаточной поляризации либо SH-связи (цистеиновые ферменты), либо OH-связи (сериновые ферменты), чтобы совершить нуклеофильное взаимодействие с пептидами (Gonzales et al., 1996). Ингибиторами сериновых аминопептидаз являются фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и диизопропилфторфосфат (ДФФ). Цистеиновые аминопептидазы ингибируются Hg^{2+} , йодоацетамидом, N-этилмалеимидом и 4-хлормеркурибензойной кислотой (Nandan et al., 2017b).

Микробные аминопептидазы имеют большой биотехнологический потенциал благодаря преимуществам, таким как чистота продукта, более строгий контроль

условий роста и способность увеличивать масштабы процесса (Nandan et al., 2017b). Аминопептидазы используются в фармацевтической промышленности для производства антигипертензивных пептидов (для лечения гипертонии) и противовирусных соединений (Sierra et al., 2017). Кроме того, аминопептидазы, выделенные из бактерий, таких как *Bacillus* spp., *Aeromonas* spp., *Streptomyces* spp., используются в пищевой промышленности для изменения органолептических характеристик (текстуры, горечи и вкуса). (Huang et al., 2015). Аминопептидазы широко используются при созревании сыра и развитии вкуса (Nandan et al., 2017b). Также они, в сочетании с другими эндопептидазами, могут применяться для очистки сточных вод от белков (Ding et al., 2014).

1.4. Заключение к литературному обзору

Согласно приведенному литературному обзору можно отметить интенсивные исследования галоалкалофильных микробных сообществ, проводимые на стыке экологии, микробиологии и молекулярной биологии. Представленная выше информация показывает, что содовые и соленые озёра могут содержать удивительно разнообразные микробные сообщества. В связи с развитием молекулярной биологии открывается полная картина многообразия. Вместе с тем трофическое взаимодействие галоалкалофильного микробного сообщества и его разнообразие на сегодняшний день не раскрыты в полном объеме, также не до конца понятна роль в нем отдельных микроорганизмов, обнаруживаются новые непредставленные филогенетические группы, которые будут официально депонированы в недалеком будущем. Кроме того, существуют еще много вопросов, на которые следует ответить, что указывает на необходимость дальнейшего изучения новых содово-соленых озёр. Наиболее очевидные вопросы включают в себя выяснение возможности анаэробного окисления метана и аммония, анаэробного превращения углекислого газа, гидролиз полимеров в содовых озёрах и возможность фиксации азота в аэробных условиях.

Галоалкалофильные бактерии очень разнообразны по своему метаболическому потенциалу и в том, как они справляются с осмотическим стрессом, вызванным высокими концентрациями соли в среде. Некоторые из уникальных свойств галоалкалофилов уже нашли свое биотехнологическое применение. Можно ожидать, что в будущем будет найдено больше возможностей для биотехнологического использования галоалкалофилов, поэтому на сегодняшний день продолжается поиск новых галоалкалофилов с полезными функциями. Их изучение, в свою очередь, позволит углубить понимание функционирования щелочных экосистем. Также следует отметить, что галоалкалофильные бактерии являются источником щелочных и солеустойчивых пептидаз, которые обладают специфическим набором функций. Обширные исследования проводятся, чтобы раскрыть метаболические пути, в которых пептидазы играют важную роль. Известно, что усиленный синтез внеклеточных пептидаз у галоалкалофилов является одним из способов адаптации бактерий к агрессивным условиям окружающей среды. Эти ферменты стабильны и активны в широком диапазоне солей, pH, температуры, поверхностно-активных веществ, ионных жидкостей и отбеливателей. Таким образом, расширяется область применения ферментов и открываются новые потенциальные возможности для щелочных пептидаз. В озёрах пустыни Бадаин Жаран распространены экстремальные экосистемы с резко градиентными физико-химическими характеристиками, они являются уникальным объектом для выделения экстремофильных микроорганизмов и поиска у них новых пептидаз, для изучения их биохимических свойств и оценки роли выделенных пептидаз в функционировании микробного сообщества.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись микробные сообщества содово-соленых озёр пустыни Бадаин Жаран ($39^{\circ}20'$ - $41^{\circ}30'$ с.ш., $99^{\circ}48'$ - $104^{\circ}14'$ в.д.), расположенных в северо-западной части Алашаньского нагорья Внутренней Монголии, Китай (Рис. 5).



Рисунок 5. Географическое расположение пустыни Бадаин Жаран

Пустыня Бадаин Жаран локализована на севере Китая площадью 49 тыс.км². Пустыня окружена горами с трех сторон (Рис. 6): на юго-западе горы Хели, Бейда и Лонгшоу, на северо-востоке гора Зонгнай, на юго-востоке гора Ябулай, которая отделяет Бадаин Жаран от пустыни Тэнгэр. Высота пустыни Бадаин Жаран постепенно уменьшается с 1800 м на юго-востоке до 1000 м над уровнем моря на северо-западе. В настоящее время климат пустыни Бадаин Жаран классифицируется как резко континентальный, с холодными зимами и очень

малым количеством осадков (<90 мм, преимущественно выпадающих с июня по август и уменьшающихся с юго-востока на северо-запад). Годовое потенциальное испарение больше 2500 мм и среднегодовая температура от 9,5 до 10,3 °С (Chen et al., 2019).

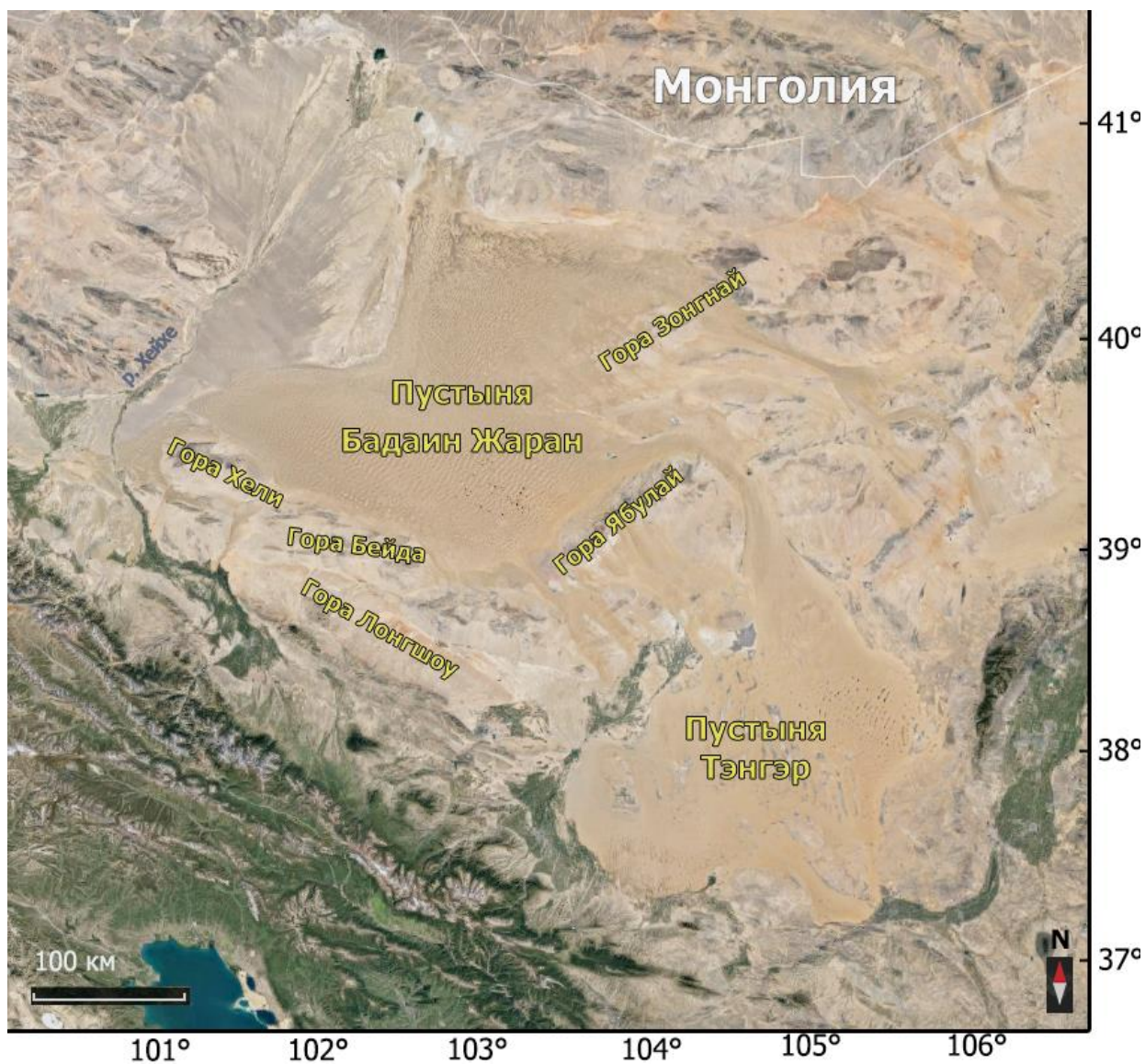


Рисунок 6. Географическое расположение гор, упомянутых в тексте (Chen et al., 2019).

Пустыня Бадаин Жаран известна самыми высокими мегадюнами в мире и уникальным чередующимся мегадюнно-озёрным ландшафтом. На территории пустыни расположено более 100 содово-соленых озёр, не имеющих поверхностных притоков и выходов, с общей поверхностью около 22 км², в том

числе 6 превышающих 1 км² и 46 озёр размером от 0,1 до 1 км² (Yang et al., 2010; Dong et al., 2013). Мегадюны занимают более 60 % площади, из которых 42,1 % имеют высоту больше 300 м, 38,2 % между 200 и 300 м и 19,7 % меньше 200 м. Большая часть озёр, которые различаются по солености и щелочности, расположена на юго-востоке пустыни без поверхностного стока. (Wang et al., 2015a).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Отбор проб

Для исследования микробных сообществ из 7 содово-соленых озёр в августе 2013 года были отобраны пробы из различных биотопов: вода, донные осадки, микробный мат и солевая корка. Озеро Бадаин делится на западный Бадаин и восточный Бадаин (Рис. 7).

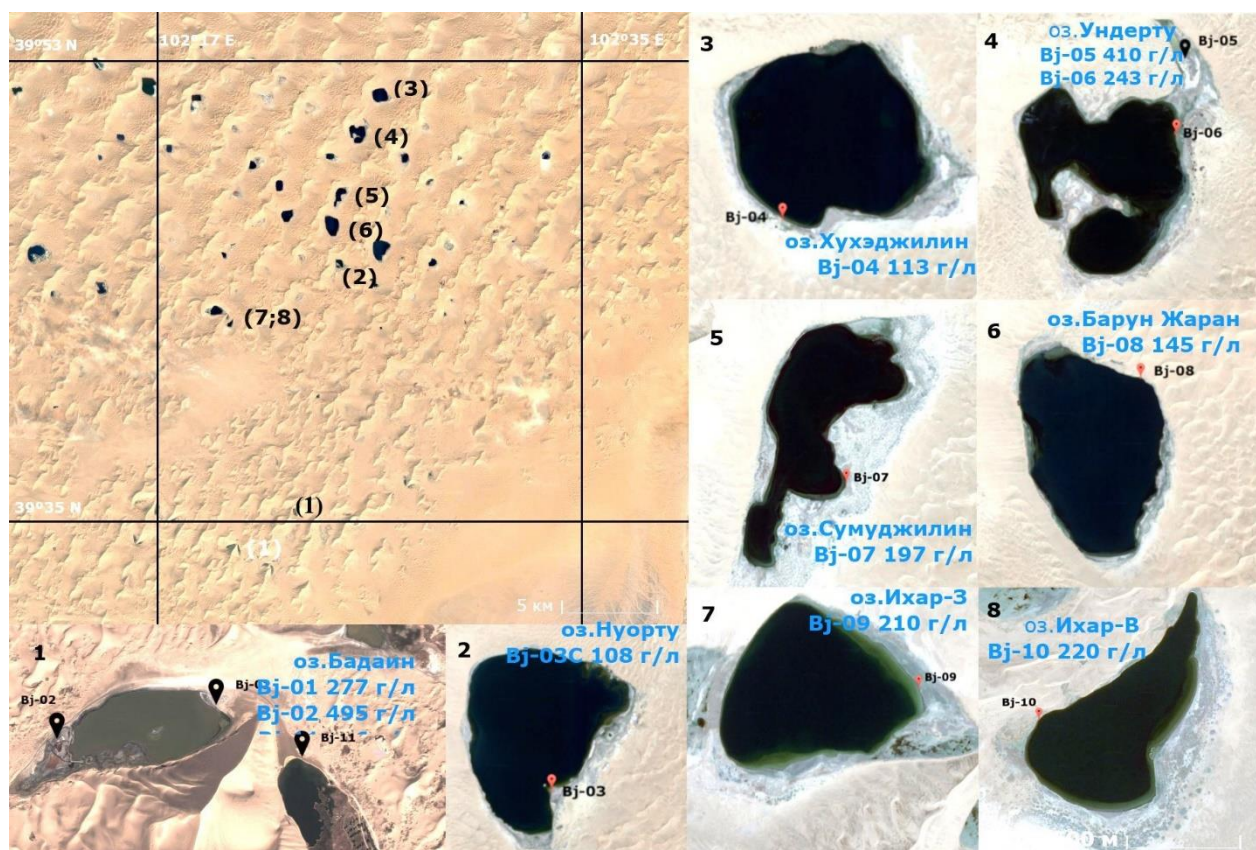


Рисунок 7. Название озёр и место отбора образцов.

Из западного озера Бадаин был отобран донный осадок (Vj-01), из лагуны этого же озера отобрали микробный мат (Vj-02) и воду (Vj-02в), из восточного озера Бадаин собрали песчаный осадок (Vj-11). Озеро Ихер состоит из восточного и западного, где отобрали образцы микробных матов (Vj-09 и Vj-10). Озеро Нуорту, Хухэджилин, Сумуджилин и Барун Жаран включают по одному образцу микробных матов Vj-03с, Vj-04, Vj-07 и Vj-08. Из лагуны озера Ундерту отобрали солевую корку (Vj-05), из самого озера микробный мат (Vj-06) (Табл. 2). Донные осадки расположены под водой на глубине 0,2 - 0,5 м. Высота микробного мата достигала 3 - 4 см.

Таблица 2. Географические координаты станций отбора и виды проб

Название озера	№Станции	GPS, с.ш./в.д	Высота над уровнем моря, м	Исследуемые биотопы
Бадаин	Vj-11	39°33'123"/102°21'878"	1202	Донный осадок
	Vj-02	39°33'152"/102°21'424"	1204	Микробный мат
	Vj-02в	39°33'152"/102°21'424"	1204	Вода
	Vj-01	39°33'195"/102°21'725"	1203	Донный осадок
Ихар	Vj-09	39°43'765"/102°19'258"	1168	Микробный мат
	Vj-10	39°43'215"/102°19'514"	1173	Микробный мат
Нуорту	Vj-03с	39°46'045"/102°27'914"	1070	Микробный мат
Барун Жаран	Vj-08	39°47'602"/102°25'451"	1182	Микробный мат
Сумуджилин	Vj-07	39°48'376"/102°25'734"	1172	Микробный мат
Ундерту	Vj-05	39°51'557"/102°27'090'	1171	Корковая соль
	Vj-06	39°51'321"/102°26'992"	1174	Микробный мат
Хухэджилин	Vj-04	39°52'486"/102°27'625"	1180	Микробный мат

До проведения анализов пробы хранили в стерильной пробирке 50 мл в темноте при температуре +4 °С. Для молекулярно-генетического анализа пробы фиксировали этанолом до конечной концентрации не менее 70 %.

2.2.2. Физико-химические и гидрохимические методы исследования

В местах отбора проб определяли рН воды при помощи полевого рН-метра HANNA HI83141 (Румыния). Значение общей минерализации определяли портативным тестер-кондуктометром TDS-4 HM Digital (Сингапур), солёность воды свыше 250 г/л разводили в 3 раза перед измерением. Температуру воды определяли ртутным или сенсорным электротермометром Prima (Португалия). Концентрацию карбонат- и гидрокарбонат ионов определяли стандартными методами гидрохимии (Резников и др., 1970). Для изучения ионного состава воды применяли следующие методы: атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой, ионную хроматографию и капиллярный электрофорез (работа была выполнена в аналитической лаборатории ИНХ СО РАН, г. Новосибирск).

2.2.3. Методы молекулярно - генетического анализа

ДНК выделяли с помощью набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, США). Глубокое секвенирование ампликонов V3-V4 16S рРНК проведено в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН) на платформе MiSeq (Illumina). Полученные парно-концевые сиквенсы 2x300 нт. проходили биоинформатическую обработку. Первоначально с помощью CLC GW 7.0 парные риды «сливались» в одну последовательность, и проводилась фильтрация по качеству (QV>25) и отсутствию вырожденных позиций. Далее с использованием usearch 7.0 проводился поиск химер, которые удалялись. Классификация на уровне классов, семейств, родов и филумов осуществлялась с помощью программы RDP Classifier (<https://rdp.cme.msu.edu>).

Идентификация штаммов по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего

секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК клеток чистых культур использовали универсальную систему праймеров (Fadrosh et al., 2014). Объем амплификационной смеси составлял 30 мкл, она имела следующий состав: 5x Taq Red buffer, Taq-полимераза (Evrogen, Россия), 5 мкл каждого праймера (концентрация 6 мкМ), 5 мкл ДНК-матрицы и 15 мкл ПЦР-смеси (1 U-полимераза, 0,2 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ Mg^{2+}). Каждый образец амплифицировали в двух повторностях. Затем репликации каждого образца объединяли в один объем и запускали на 2 % стандартном агарозном геле для визуализации и выбора размера. Для экстракции ампликонов из агарозного геля использовали стандартный набор для удаления очищающего геля (Evrogen, Россия). Для измерения концентрации ДНК использовали флюорометр Qubit® 2.0 с набором для анализа dsDNA HS (High Sensitivity) (Life Technologies, США).

Секвенирование осуществляли в ООО «Биоспарк», г. Москва. Полученные последовательности сравнивали с хранящимися в мировой базе NCBI данными с использованием сервера BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Выравнивание полученных последовательностей гена 16S рРНК проводили с помощью программы BioEdit Version 7.0.4. Построение филогенетического дерева выполнено с использованием метода максимального правдоподобия «Maximum Likelihood» в программе MEGA6 (Tamura et al., 2007).

2.2.4. Методы учета численности и выделения чистых культур из содово-соленых озёр

Для учета численности аэробных галоалкалофильных протеолитических микроорганизмов проводили посев на модифицированную среду Пфеннига следующего состава (г/л): NH_4Cl – 0,5; KH_2PO_4 – 0,5; $MgCl_2$ – 0,5; $CaCl_2$ – 0,05; $NaCl$ – 100; дрожжевой экстракт – 0,5. В качестве субстрата использовали пептон 5 г/л. Значение pH среды доводили 10 % бикарбонатно-карбонатным буфером до 8,5–9,5. Посевы осуществляли методом предельных разведений 1:10 аэробно в термостате при температуре 30 °С, время культивирования 3 суток.

Для выделения чистой культуры из отдельной колонии накопительную культуру высевали поверхностным способом в стерильные чашки Петри на расплавленную агаризованную питательную среду Пфеннинга. Изолированные колонии бактерий пересеивали вновь на агаризованную среду. Чистоту культур контролировали микроскопированием по однородности клеток.

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

2.2.5. Метод элементного анализа CHN

Определение общего содержания С, Н и N осуществляли анализатором Perkin Elmer 2400 Series II, США. Перед анализом исследуемые образцы растирали в ступке и высушивали при 60 °С. Режимы CHN основаны на классическом методе Прегла Дюма, при котором образцы сжигаются в среде чистого кислорода, а полученные газы сгорания измеряются в автоматическом режиме. Система 2400 Series II состоит из четырех основных зон: 1) зоны сгорания, 2) зоны контроля газа, 3) зоны разделения, 4) зоны обнаружения. Точность определения анализа составила меньше 0,3%, воспроизводимость менее 0,2% (Tursunov et. al., 2015).

Содержание валового белка в биотопах (CGp, %) рассчитывали по следующему уравнению: $CGp = 6,25 \times N$, где N – общий азот в биомассе (%) (Couillard and Zhu, 1993).

2.2.6. Изучение эколого-физиологических свойств чистых культур

Температурные диапазоны развития бактерий устанавливали в градиентном термостате при температуре от 20 до 60 °С и в холодильнике при температуре от 5 до 10 °С. Диапазон pH (от 6,0 до 11,0) устанавливали 0,5 М NaOH и 25 % раствором HCl. Способность к использованию различных источников питания проверяли на минеральной среде, в которую вносили испытуемые источники

углеводов и белка в концентрации 2 % от объема среды. Биомассу бактерий определяли по изменению оптической плотности культуры при длине волны 560 нм. Биохимические свойства бактерий, удельную скорость роста определяли общепринятыми методами (Нетрусов, 2005).

2.2.7. Методы определения внеклеточной протеолитической активности

Белковый экстракт из нативных проб получали путем перетирания 1 см² образца с добавлением 1 мл 1 М фосфатного буфера pH 7 в ступке. Биомассу отделяли центрифугированием (12000 об./мин. в течение 15 мин) и отбирали супернатант. Чистые культуры инкубировали при 30 °С на минеральной среде Пфеннига в течение 10 сут и отбирали по 5 мл супернатанта каждые 24 часа. В пробы добавляли 0,0025 % азид натрия, препятствующего развитию микроорганизмов. Хранение осуществляли при 4°С. Внеклеточную протеолитическую активность из полученных супернатантов определяли согласно методу Эрлангера (Erlanger, 1961). В работе использованы следующие 5 мМ *para*-нитроанилидные субстраты, специфичные для эндопептидаз:

- GlpAALpNA – субтилизин-подобных пептидаз;
- GlpFpNA – химотрипсин-подобных пептидаз;
- GlpFApNA – цистеиновых пептидаз
- VzRpNA (ВАРА) – трипсин-подобных пептидаз.

Субстраты для аминопептидаз:

- LpNA (L-лейцил-*para*-нитроанилид);
- FpNA (L-фенилаланил-*para*-нитроанилид).

Эти субстраты содержат аналог пептидной связи, которая расщепляется под действием протеолитических ферментов. В результате расщепления выделяется *para*-нитроанилин, окрашивающий раствор в желтый цвет.

При измерении активности пептидаз в ячейку микропланшета вносили 160 мкл 0,1 М фосфатного буфера (pH 8), добавляли 10 мкл культуральной жидкости (КЖ), 5 мкл соответствующего субстрата и измеряли оптическое поглощение раствора в нулевой момент. Затем смесь инкубировали при 37 °С,

определяя изменение поглощения через 12 ч. Количество образовавшегося продукта (*para*-нитроанилина) определяли спектрофотометрически при 405 нм на микропланшетном фотометре StatFax 2100 (Awareness Technology Inc., США) в 96-луночных планшетах, используя дифференциальный фильтр 405 нм.

За 1 единицу активности (ЕА) принимали изменение оптической плотности опытных растворов относительно контрольных на 0,01 за 12 ч при 405 нм и 37 °С. Общую концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм.

При определении активности по GlpFApNA к реакционной смеси дополнительно добавляли 5 мкл свежеприготовленного раствора дитиотреитола (ДТТ, 10 мг/мл).

Очистка фермента. Процедура частичной очистки внеклеточных пептидаз включала две последовательные стадии: диализ культуральной жидкости и ионообменную хроматографию.

1. Диализ проводили для отделения исследуемого фермента от низкомолекулярных веществ. Для этого 2 мл культуральной жидкости помещали в диализный мешочек, пропускающий молекулы, масса которых в среднем не превышает 10 кДа. Диализовали против 1 л 0,1 М фосфатного буфера (рН 7) при 4 °С на магнитной мешалке в течение 1 сут.

2. Ионообменную хроматографию осуществляли на колонке Mono Q (FPLC), уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером (рН 7). Белок, сорбированный на колонке, элюировали градиентом NaCl при скорости 1 мл/мин. В полученных таким образом образцах измеряли общую концентрацию белка. Активность измеряли по выбранным субстратам при 405 нм. Далее фракции, составляющие отдельные пики пептидазной активности, объединяли, обессоливали (используя 0,03 М фосфатный буфер, рН 7,0).

В полученных образцах измеряли содержание белка и ферментативную активность для вычисления следующих параметров:

(1) Общая активность (ЕА×мл) – определяли активность фермента в оптических единицах во всем объеме препарата.

(2) Удельную активность (ЕА/мг белка) – определяли, как отношение активности к содержанию белка в ферментном препарате.

(3) Степень очистки – определяли, как отношение удельной активности на данной стадии очистки к исходной удельной активности в культуральной жидкости.

(4) Выход (%) – определяли, как долю ферментативной активности на данной стадии очистки от исходной ферментативной активности в культуральной жидкости.

Выход фермента с колонки характеризовали коэффициентом доступности (K):

$$K = \frac{V_e - V_c}{V_o - V_c}$$

где V_e – объем, в котором выходит белок; V_o – общий объем колонки (24 мл); V_c – свободный объем колонки (8 мл).

Далее строили график, где по оси Ox откладывали десятичный логарифм молекулярных масс маркерных белков, по оси Oy – значения K . По графику находили молекулярные массы исследуемых ферментов.

Определение оптимума рН-активности и стабильности фермента. При определении оптимума рН действия секретируемой пептидазы по отношению к синтетическим субстратам был использован универсальный буфер в диапазоне рН 2–11 с шагом 1. В состав буфера входили 0,02 М H_3PO_4 , 0,02 М CH_3COOH , 0,02 М H_3BO_3 ; необходимое значение рН получали, добавляя к смеси кислот 1 М $NaOH$.

Для определения рН стабильности ферментный препарат инкубировали при 37 °С 4 ч в универсальном буферном растворе (рН 2 - 11), затем образцы доводили до рН 8 с помощью буфера с рН 2 (состав: 0,02 М H_3PO_4 , 0,02 М CH_3COOH , 0,02 М H_3BO_3) в щелочном диапазоне, либо 1 М $NaOH$ в кислом диапазоне до рН 8. Пептидазную активность ферментов определяли по методу, описанному выше.

Определение температурного оптимума и стабильности фермента. Температурный оптимум фермента определяли, измеряя активность фермента при температурах от 30 до 60 °С. Для изучения температурной стабильности раствор

фермента инкубировали при тех же температурах в течение 4 ч, затем доводили до комнатной температуры и определяли активность при 37 °С, как указано выше.

Определение стабильности исследуемого фермента по отношению к NaCl. При определении оптимума хлорида натрия для секретируемой пептидазы, активной по отношению к синтетическим субстратам, были подготовлены солевые растворы с концентрацией NaCl от 0 до 300 г/л (0, 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300 г/л). Растворы инкубировали с ферментом и определяли активность при 37 °С, как указано выше. Для определения стабильности фермента при различных концентрациях NaCl пептидазы выдерживали в растворе в течение 4 ч при 37 °С, после добавляли специфичные *para*-нитроанилидные субстраты и определяли активность, как указано выше.

Определение функциональных групп активного центра. Для выяснения природы функциональных групп активного центра пептидаз бактерий, исследовали влияние различных ингибиторов на их активность. Ингибиторный анализ проводили с очищенными ферментными препаратами и культуральной жидкостью. В работе использовали специфические ингибиторы:

-*ингибитор сериновых пептидаз*: PMSF (фенилметилсульфонилфторид);

-*ингибиторы металлопептидаз*: EDTA (этилендиаминтетраацетат натрия) и *o*-фенантролин.

К 50 мкл раствора фермента добавляли 5 мкл раствора ингибитора определенной концентрации (0,01 и 0,1 М) и выдерживали смесь 50 - 60 мин при комнатной температуре. Затем прибавляли 700 мкл фосфатного буфера (0,1 М, pH 8) и 10 мкл раствора соответствующего субстрата. Реакцию проводили при 37 °С. Когда оптическая плотность в контроле (смесь без добавления ингибитора) увеличивалась на 0,5 - 0,7 единиц, во всех образцах определяли изменение оптической плотности и вычисляли остаточную активность по отношению к контролю.

Приготовление растворов ингибиторов: EDTA растворяли в фосфатном буфере (0,1 М, pH 8); PMSF растворяли в этаноле; в тех случаях, когда

используемый ингибитор был растворен в спирте (этиловом), в качестве контроля к раствору фермента добавляли 5 мкл спирта.

Определение стабильности ферментов в присутствии поверхностно-активных веществ и окислителя. Влияние некоторых поверхностно-активных веществ (Triton X-100 и SDS - натриевая соль лаурилсерной кислоты) и окислителя (перекись водорода) на стабильность фермента изучали путем предварительной инкубации ферментов в течение 4 ч при 37 °С с детергентами. Активность фермента без какой-либо добавки была принята за 100 %. Концентрации Triton X-100 и SDS составляли 0,5, 1, 2, 4, 6 % и 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 % соответственно. Перекись водорода добавляли в концентрациях 0,5, 1 и 3 %. Измеряли протеолитическую активность по *para*-нитроанилидным субстратам определяли стандартным методом. Контролем была смесь из 195 мкл реагента и 5 мкл субстрата. Остаточную активность измеряли спектрофотометрически при 405 нм.

2.2.8. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам (Гланц, 1998) с использованием программного пакета Microsoft Excel 2010 для Windows 7. Для полученных данных рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

Анализ основных компонентов (РСА) на основании данных ионного состава и канонический анализ соответствия (ССА) были выполнены с использованием программного обеспечения Xlstat 2019 (<https://www.xlstat.com/en/>).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Характеристика экологических условий среды обитания микробных сообществ

Таксономический состав и разнообразие микробного сообщества зависят от экологических факторов экосистемы. Основными параметрами для деятельности микроорганизмов в содово-солёных озёрах являются физико-химические (рН, минерализация, температура) и гидрохимические параметры среды обитания.

Минерализация воды колебалась от 6 до 410 - 495 г/л (Табл. 3). На момент отбора образцов значение рН в воде составило 8,9 - 9,9, наименьшее значение было обнаружено в образце Vj-11, а наибольшее в Vj-04. рН в образцах Vj-02, Vj-03с и Vj-07 составил 9,8, а в пробах Vj-06, Vj-08 и Vj-10 - 9,7. рН 9,6 был зафиксирован в двух образцах Vj-01 и Vj-09, а рН 9,2 был в лагуне озёра Ундерту (Vj-05).

Температура воды при отборе проб в августе 2013 года варьировала от 21 до 36,3 °С, где наибольшее значение было в лагуне озёра Ундерту. Некоторые озёра в пустыне не замерзают зимой при температуре ниже нуля. Вероятная причина - постоянное пополнение подземными водами и высокая солёность озёрной воды (Wu et al., 2014a).

По ионному составу в воде исследуемых станций преобладали катионы Na^+ , наибольшее количество было представлено в Vj - 05 и Vj - 02, наименьшее содержание было в воде Vj - 11 (1,48 г/л). Относительное содержание Na^+ в высокоминерализованных озёрах выше, чем в слабосолёных. Содержание K^+ составило от 0,09 до 29,15 г/л. Катионы Ca^{2+} в исследуемых объектах не превышали 0,01 г/л, что обусловлено высокой щёлочностью (Jones et al., 1998).

Щёлочность и солёность создаются за счёт высоких концентраций анионов Cl^- , $\text{HCO}_3^{2-} + \text{CO}_3^{2-}$, содержание которых варьировало от 1,32 до 154 г/л и от 2,05 до 174,6 г/л соответственно. Также в исследуемых озёрах отмечено высокое содержание SO_4^{2-} (до 78,5 г/л).

Распределение проб по общему содержанию доминирующих катионов и анионов показаны на трёхкомпонентной диаграмме (Рис. 8 а, б). На основании

ионного состава можно разделить исследуемые озёра на «содовые» и «содово-солёные» (Boros and Kolpakova, 2018). К «содовым» относятся озёра, где сумма $\text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^-$ преобладает среди всех анионов, а к «содово-солёному» типу относятся озёра, где количество Cl^- больше $\text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^-$. Ко второму типу относятся станции Vj-01 и Vj-05.

По классификации М.Г. Валяшко при преобладании вышеупомянутых компонентов исследуемые озёра можно отнести к карбонатному и хлоридному типу (Валяшко, 1962).

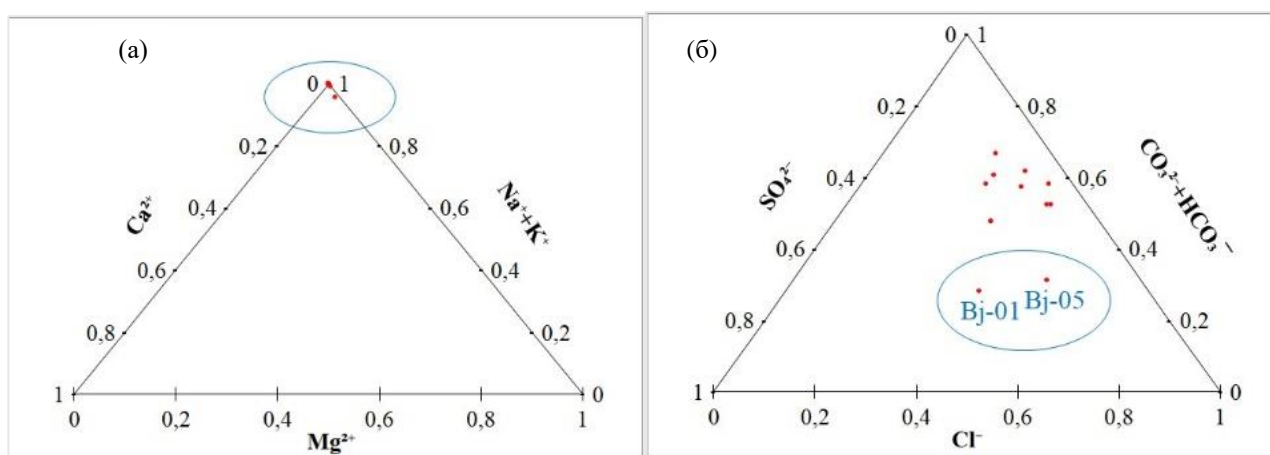


Рисунок 8. Трехкомпонентная диаграмма процентного вклада катионов (а) и анионов (б) в исследуемых образцах.

Таблица 3. Гидрохимический состав воды в содово-солёных озёрах пустыни Бадаин Жаран

Название озёра	Станция	Т, °С	рН	г/л							
				Солёность	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	CO ₃ ²⁻ + HCO ₃ ⁻
Бадаин	Вj-11	22	8,9	6	1,48	0,1	0,01	0,06	1,32	0,17	2,05
	Вj-02	29	9,7	495	150	14	0,01	0,006	114	78,5	174,6
	Вj-01	25	9,5	277	85	6,4	0,07	0,4	59,1	51,3	42,91
Ихер	Вj-09	22	9,5	210	54	8,3	0,01	0,2	62,3	11	80,66
	Вj-10	21,2	9,6	220	59	10	0,01	0,14	64,7	13	85,53
Нуорту	Вj-03с	31,4	9,7	108	65	9	0,04	0,68	35,2	24,4	82,14
Барун Жаран	Вj-08	22,2	9,7	145	46	4,4	0,01	0,2	36,5	9	72,8
Сумуджилин	Вj-07	21,3	9,8	197	50	7,5	0,01	0,012	40,3	22,8	97,07
Ундерту	Вj-05	36,3	9,2	410	120	29,2	0,01	0,002	154	57,2	95,25
	Вj-06	25	9,7	243	46	13,7	0,01	0,104	68,5	22,5	121,46
Хухэджилин	Вj-04	30	9,8	113	29	6	0,01	0,17	22,7	10,9	67,02

Согласно анализу основных компонент (РСА) количество Mg^{2+} и Ca^{2+} отрицательно коррелирует с остальными ионами, температурой и рН вдоль первой оси (PC1), что объясняет 57,97 % от общего отклонения (Рис. 9). Сумма CO_3^{2-} и HCO_3^- , K^+ и Cl^- также отрицательно коррелирует с другими ионами вдоль второй оси (PC2), что объясняет 19,57 % изменения. Проба Vj-11 по всем параметрам характеризуется низким содержанием всех ионов. В образцах Vj-01 и Vj-03с выше содержание ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} по сравнению с другими станциями. Пробы Vj-04, Vj-06, Vj-07, Vj-08, Vj-09 и Vj-10 наименее взаимосвязаны с температурой, рН и со всеми ионами оси PC2, где содержание катионов Na^+ и K^+ и анионов Cl^- , SO_4^{2-} и $CO_3^{2-} + HCO_3^-$ в два раза ниже, по сравнению с лагунами высокоминерализованных озёр Бадаин - Vj-02 и Ундерту – Vj-05.

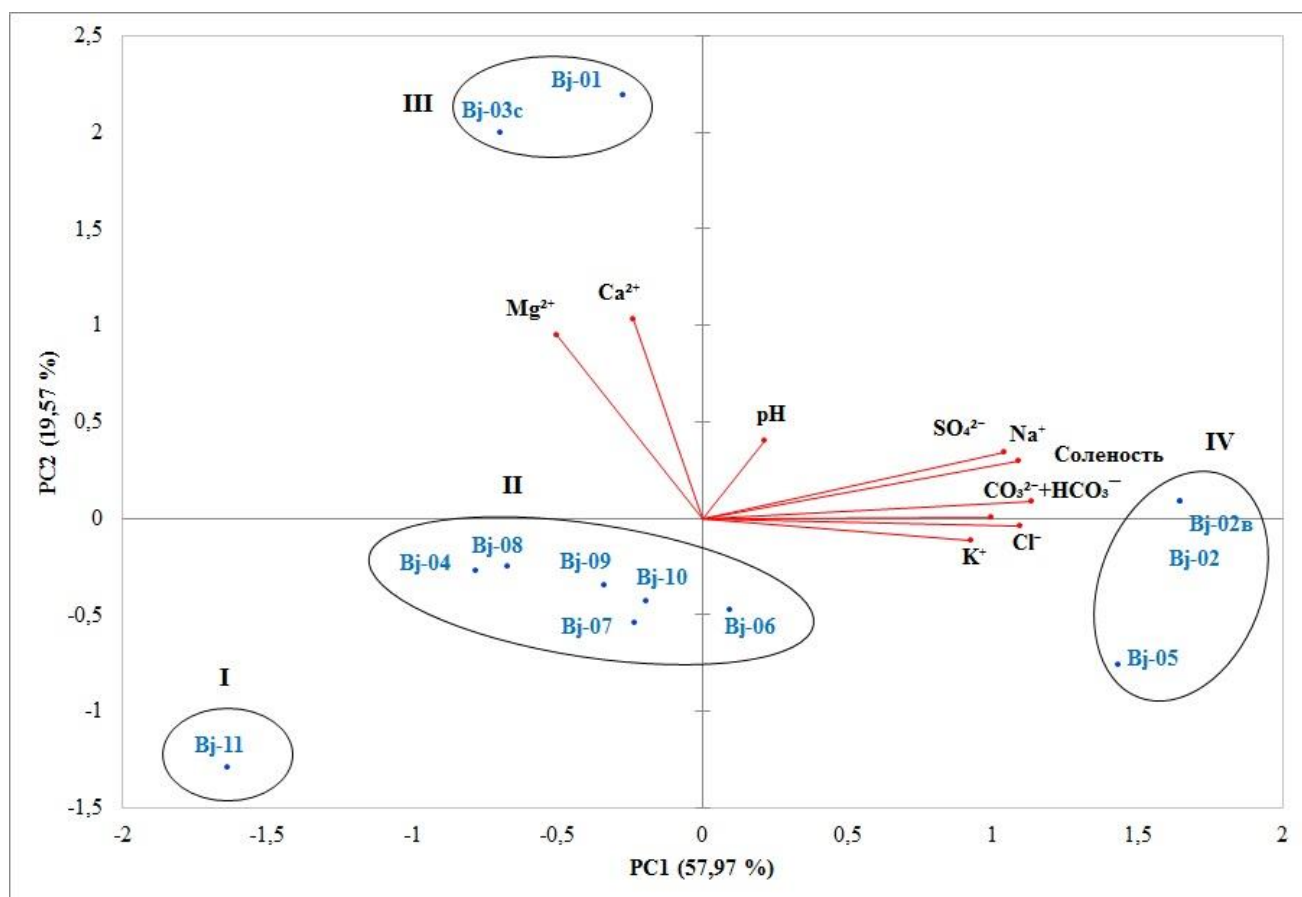


Рисунок 9. Анализ основных компонент (РСА) по ионному составу и физико-химическим параметрам в исследуемых станциях.

Таким образом, на основании статистической обработки изученные озёра пустыни Бадаин Жаран были выделены в 4 группы:

- I. Vj-11;
- II. Vj-04, Vj-06, Vj-07, Vj-08, Vj-09 и Vj-10;
- III. Vj-01 и Vj-03с;
- IV. Vj-02, Vj-02в и Vj-05.

Химические характеристики озёр в пустыне Бадаин Жаран были хорошо проанализированы в литературе на основании большого количества образцов. В озёрах с повышенной Солёностью сумма концентраций анионов $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}$, как правило, меньше концентрации иона Cl^- , но может быть больше концентрации SO_4^{2-} . Катион Na^+ чаще всего является доминирующим над ионами, это подразумевает влияние сильного испарения в замкнутом ландшафте (Yang et al., 2003; Ma et al., 2006; Rioual et al., 2013; Gong et al., 2016).

Исследуемые озёра пустыни Бадаин Жаран характеризуются высокой минерализацией и щёлочность, в связи с этим развитие высших форм растений и животных ограничено. В содово-соленых озёрах создаются благоприятные условия для распространения и функционирования галоалкалофильного микробного сообщества (Заварзин и др., 2000; Li et al., 2015).

3.2. Таксономическое разнообразие микробных сообществ в различных биотопах

Для изучения таксономического состава в образцах воды, корковой соли, донных осадков и микробных матов из озёр пустыни Бадаин Жаран проведено секвенирование фрагментов гена 16S рНК на платформе MiSeq (Illumina). В результате обработки данных 12 образцов было получено 205575 последовательностей, относящихся к доменам *Bacteria* и *Archaea*. Количество последовательностей варьировало от 4990 до 35139 на образец (Табл. 4). Было выявлено 412 филотипов при кластерном расстоянии 0,05, число ОТЕ в каждой станции изменялось от 77 до 146.

Анализ индексов таксономического разнообразия и богатства прокариотных ОТЕ показал (Табл. 4), что наибольшее количество ОТЕ, максимальное видовое богатство и видовое разнообразие, оценённое с помощью индексов Chaol и Шеннона приходится на сообщества образцов Вj-11, Вj-02в и Вj-05.

Таблица 4. Разнообразие микробных сообществ и индексы видового богатства

Станция	Количество последовательностей	Количество ОТЕ	Дистанция	Индексы разнообразия	
				Chaol	Шеннона
Вj-01	25879	121	0,05	108,2	3,8
Вj-02	12163	120	0,05	141,9	3,9
Вj-02в	4990	90	0,05	156,3	5,1
Вj-03с	18358	104	0,05	140,1	4,9
Вj-04	23631	111	0,05	123,6	2,7
Вj-05	6036	77	0,05	167,2	5,2
Вj-06	16773	139	0,05	127,4	3,9
Вj-07	35139	79	0,05	84,3	3,5
Вj-08	21976	149	0,05	127,3	3,9
Вj-09	19629	94	0,05	111,9	3,8
Вj-10	20095	128	0,05	138,5	4,7
Вj-11	11932	146	0,05	183,4	5,5

Полученные кривые накопления видов практически достигли плато, что показывает высокий объем секвенирования и полный охват разнообразия микробного сообщества в озёрах пустыни Бадаин Жаран (Рис. 10).

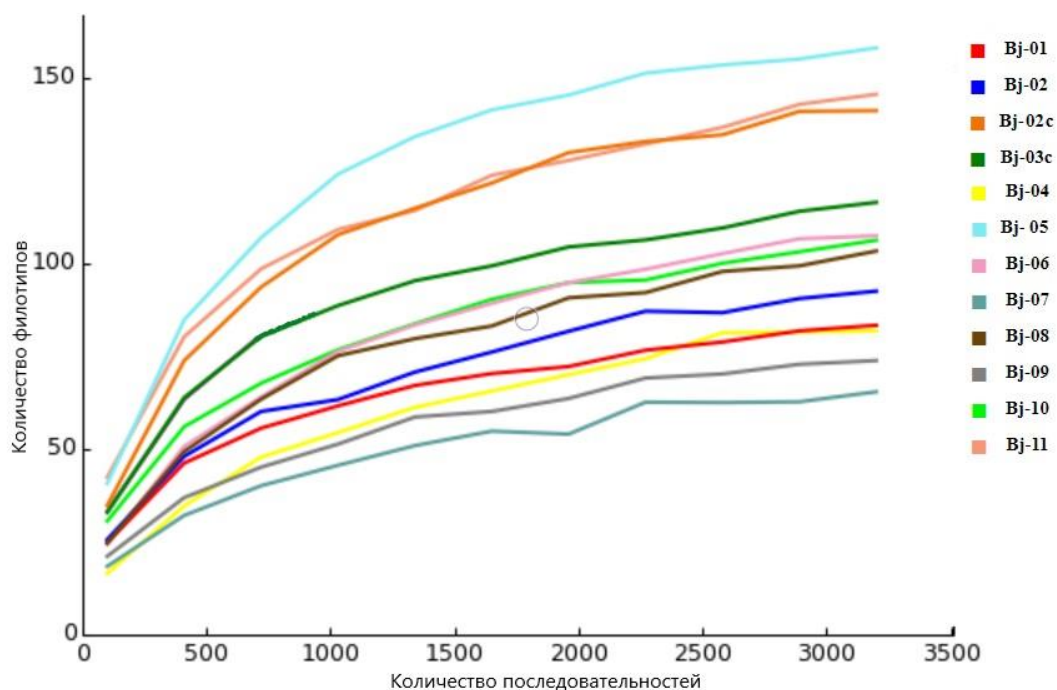


Рисунок 10. Кривые накопления родов (дистанция 0,05) для отобранных станций исследуемых озёр.

Связь между физико-химическими параметрами и составом микробного сообщества Анализ ССА показал влияние абиотической среды на состав микробного сообщества на уровне доминирующих филумов и классов филума *Proteobacteria* (Рис. 11). Филумы *Firmicutes* и *Rhodothermaeota*, а также классы *Gamma**proteobacteria* и *Delta**proteobacteria* положительно коррелируют с ионами SO_4^{2-} и Na^+ , наибольшее содержание отмечено в озере Бадаин станции Vj-01 и в лагуне этого же озёра (Vj-02 и Vj-02в). Содержание ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и $\text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^-$ влияли на распространение *Alphaproteobacteria*. Температура и рН оказывает наибольшее влияние на преобладание филумов *Bacteroidetes* и *Cyanobacteria* в образцах станций Vj-03с, Vj-06, Vj-08, Vj-09 и Vj-10. Распространение филума *Euryarchaeota* обусловлено концентрацией ионов Cl^- и K^+ и наибольшее содержание его в корковой соли станции Vj-05.

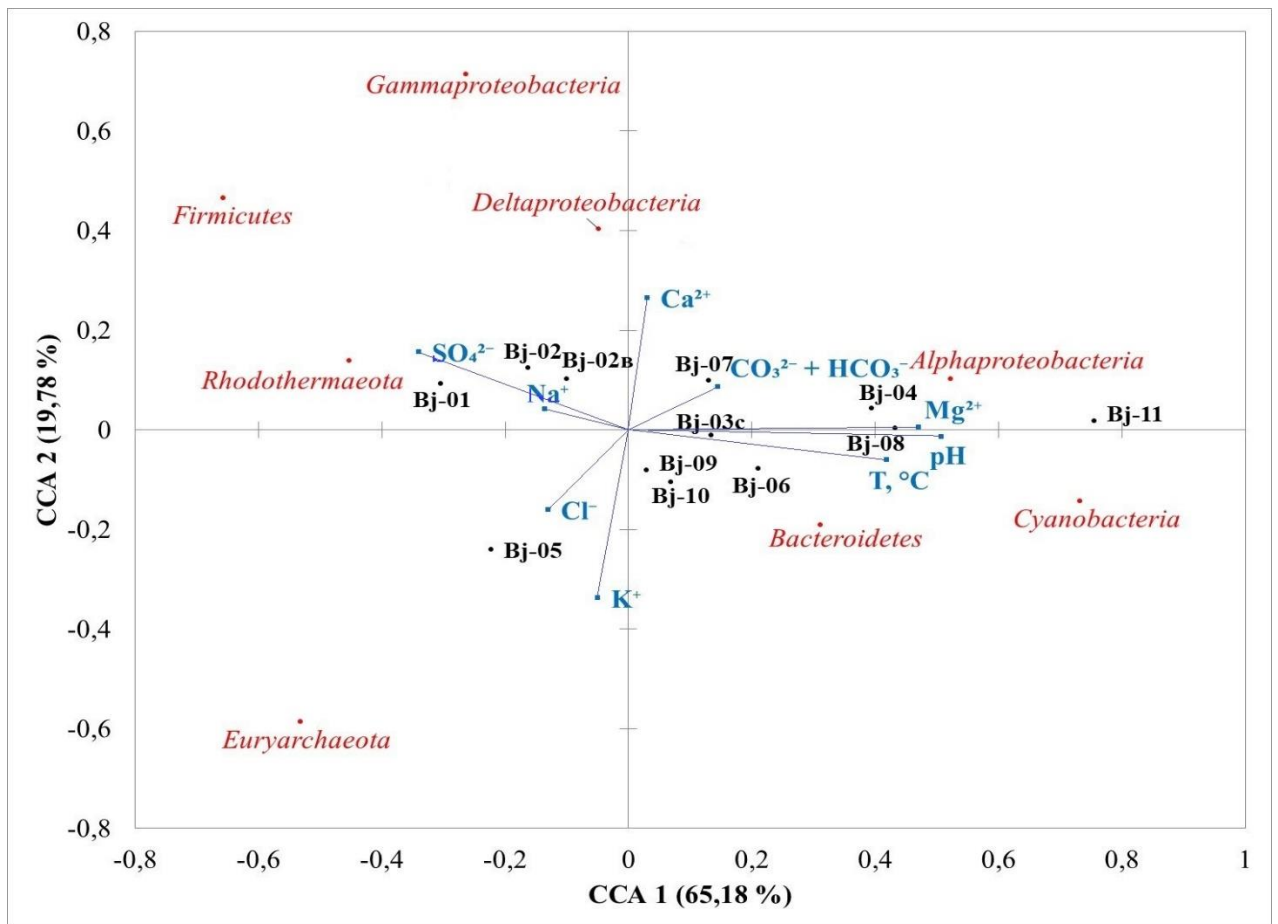


Рисунок 11. Совмещённая ординационная диаграмма распределения доминирующих филумов (красный цвет) и биотопов (чёрный цвет) в зависимости от гидрохимических и физико-химических параметров (синий цвет) с использованием канонического анализа соответствий (ССА).

3.2.1. Влияние экологических факторов на формирование микробных сообществ

Галоалкалофильное микробное сообщество – это полноценная функциональная система, которая представляет совокупность взаимодействующих между собой микроорганизмов с кооперативными трофическими связями (Заварзин, 2007). Была изучена таксономическая структура микробных сообществ в зависимости от внешних факторов окружающей среды исследуемых биотопов озёр пустыни Бадаин Жаран.

Таксономическое разнообразие микробных сообществ в исследуемых образцах представлено доменами *Bacteria* и *Archaea* (Рис. 12). В микробном сообществе преобладали представители пяти филумов *Cyanobacteria* (0,8 –

60,3 %), *Proteobacteria* (9,1-93,8 %), *Firmicutes* (0,2-23,5 %), *Bacteroidetes* (0,3-16,8 %) и *Rhodothermaeota* (0,4-34,5 %). Домен *Archaea* представлен филумом *Euryarchaeota* от 11,8 до 68,6 %.

В филуме *Proteobacteria* доминировали классы *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* (Рис. 13). Наибольшая доля бактерий класса *Alphaproteobacteria* была в микробном мате оз. Сумуджилин (73,3 %), класс *Gammaproteobacteria* доминировал во всех биотопах оз. Бадаин (27,9 до 35,7 %).

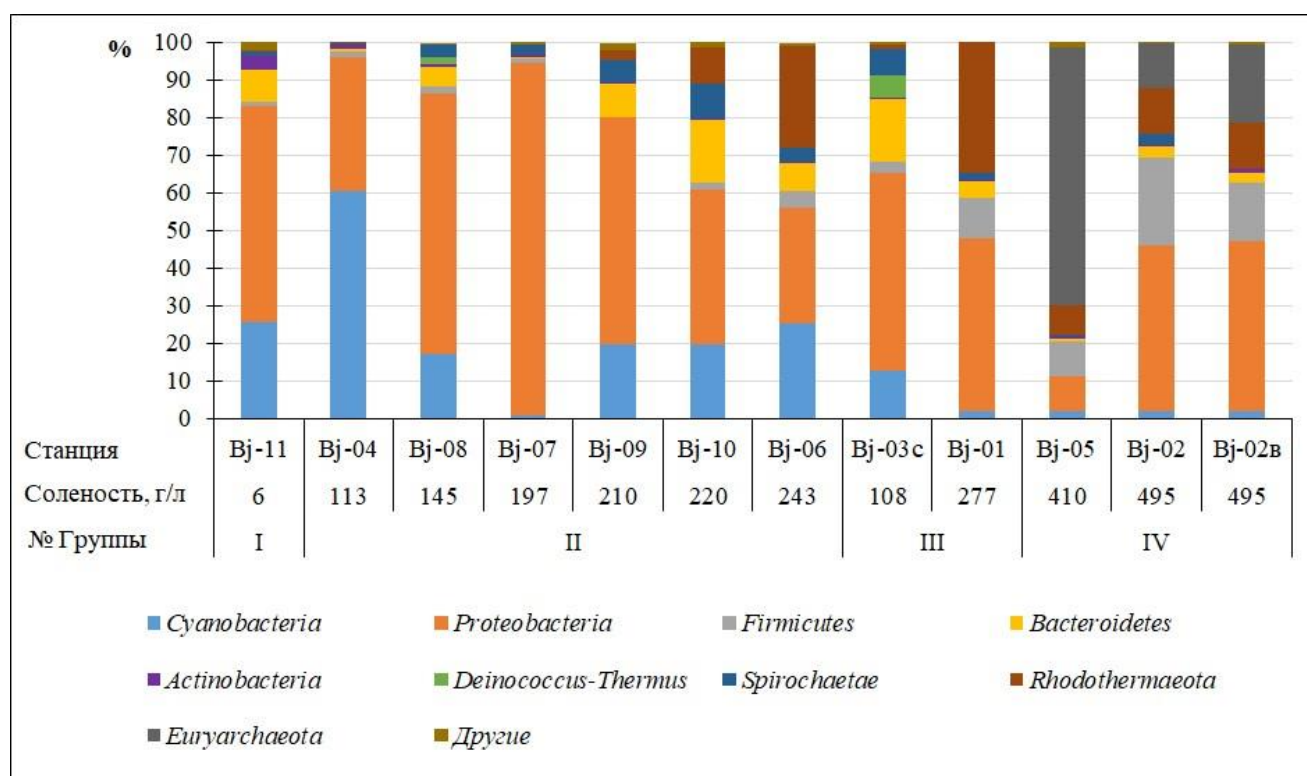


Рисунок 12. Таксономический состав микробных сообществ в исследуемых станциях на уровне филумов.

В биотопе донного осадка (Vj-11) группы I было получено 11932 бактериальных последовательностей, которые отнесены к 10 филумам. На рисунке 13 показано, что преобладающими филумами были *Proteobacteria* (57,6 %), *Cyanobacteria* (25,5 %), *Bacteroidetes* (8,2 %), *Actinobacteria* (3,8 %). Отмечено незначительное содержание *Firmicutes* (1,2 %) и *Spirochaetae* (1 %).

В образце доминируют галотолерантные нитчатые цианобактерии рода *Halomicronema* (8,3 %) и одноклеточные цианобактерии *Cyanobium* (8 %),

которые встречаются в умеренно морских экосистемах (Табл. 5). Также среди автотрофных микроорганизмов распространены галофильные цианобактерии *Spirulina* (2,8 %) и пресноводные цианобактерии рода *Phormidium* (2,7 %).

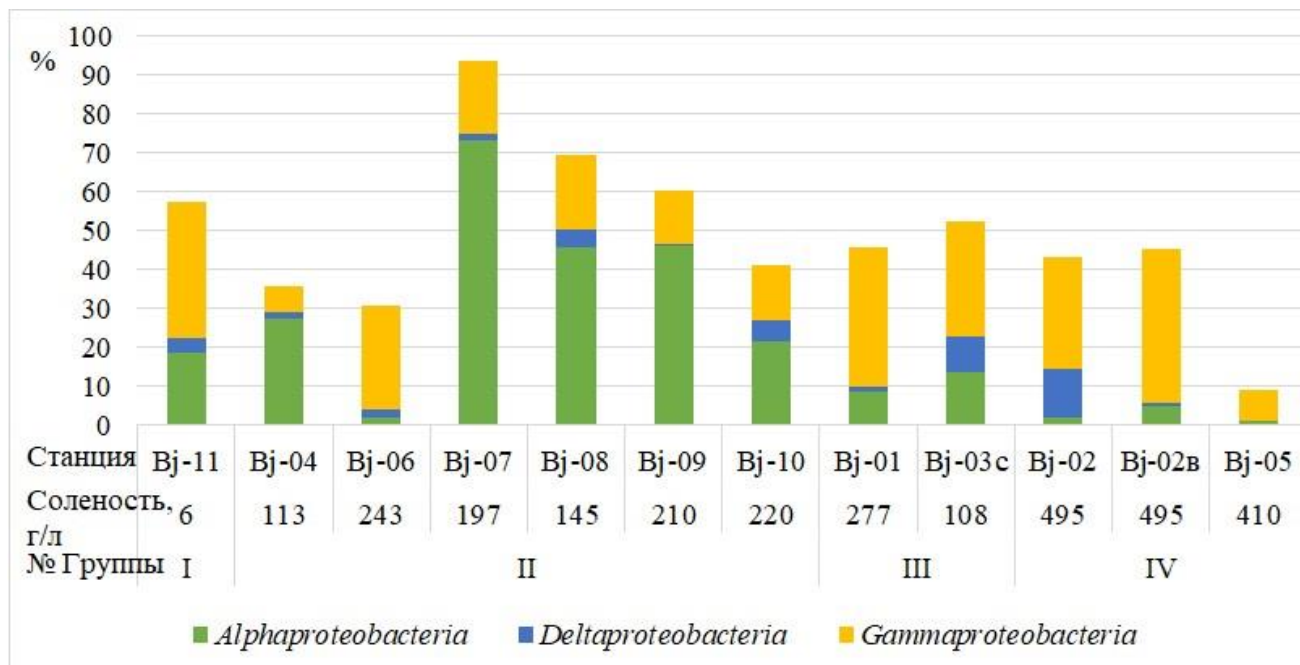


Рисунок 13. Таксономический состав классов микробных сообществ филума *Proteobacteria*.

Филум *Proteobacteria* представлен классами *Gammaproteobacteria* (27,9 %) и *Alphaproteobacteria* (18,7 %). Класс *Gammaproteobacteria* на 9,9 % состоит из некультивируемых бактерий, среди культивируемых микроорганизмов распространены бактерии рода *Serratia* (15,5 %), устойчивые к высоким щелочным условиям и способные усваивать нитрат, ацетат, лактат, формиат и различные сахара (Thorpe et al., 2012). Менее 1 % в микробном сообществе представлены алкалофильными и термофильными бактериями рода *Silanimonas* (0,6 %) и облигатными галофильными гидролитическими бактериями рода *Halomonas* (0,5 %). Класс *Alphaproteobacteria* включает 3,8 % некультивируемых бактерий, а также 2,2 % некультивируемых бактерий семейства *Rhodobacteraceae*. Культивируемые рода класса *Alphaproteobacteria* включают галофильные несерные пурпурные бактерии *Rhodobacter* (2,2 %) и облигатно

аэробные галофильные и гетеротрофные прокариоты рода *Tropicimonas* (1,6 %). В филуме *Bacteroidetes* преобладает пресноводный хемоорганотрофный род *Haliscomenobacter* (3,2 %), который в качестве источника энергии и роста использует сахара, крахмал, нитраты и другие органические вещества (Mulder et al., 2006). В филуме *Actinobacteria* широко распространены алкалофильные и хемоорганотрофы рода *Plumatobacter* (2,3 %).

II группа образцов с солёностью 113 - 220 г/л включает микробные маты: Vj-04, Vj-06, Vj-07, Vj-08, Vj-09 и Vj-10. В микробных сообществах микробных матов доминировали филумы *Proteobacteria* (30,5 – 93,8 %) и *Cyanobacteria* (17 – 60,3 %), за исключением Vj-07, в котором содержание цианобактерий составило лишь 0,8 %. В пробах озёра Ихар (Vj-09 и Vj-10) отмечено высокое содержание *Bacteroidetes*, а в пробе Vj-06 из оз. Ундерту филума *Rhodothermaeota*.

Во всех образцах наибольшее количество последовательностей филума *Proteobacteria* было представлено классами *Alphaproteobacteria* (21,4 – 73,3 %) и *Gammaproteobacteria* (6,6 – 18,5 %). Класс *Alphaproteobacteria* во всех сообществах представлен некультивируемыми бактериями семейства *Rhodobacteraceae* (0,8 – 58,1 %), наибольшее количество которых отмечено в образце Vj-07. В основном *Rhodobacteraceae* - это водные бактерии, которые часто обитают в морских и соленых средах. Они включают аэробные фото- и хемогетеротрофы, а также пурпурные несерные бактерии, которые осуществляют фотосинтез в анаэробных средах. Они активно вовлечены в биогеохимический цикл серы и углерода (Pujalte et al., 2014). Среди культивируемых бактерий распространены галофилы *Salinarimonas* (1,6 -14,1 %), которые являются гетеротрофными и факультативными анаэробами. В классе *Gammaproteobacteria* во всех образцах обнаружено содержание облигатных галоалкалофилов с хемолитотрофным типом питания рода *Thioalkalivibrio* (3,5–6,7 %). Количество последовательностей рода *Halochromatium* (0,2–4,3 %) в несколько раз ниже и составляло от 0,2 до 4,3 % с наибольшим содержанием в образце Vj-10 с солёностью 220 г/л. Бактерии рода *Halochromatium* являются

морскими пурпурно-серными фототрофами, содержащими газовой пузырьки в клетке (Kumar et al., 2007).

В микробном сообществе пробы Vj-04 доминирующий род *Lyngbya* (52,9 %), которые являются умеренными галофилами, одноклеточными автотрофными представителями филума *Cyanobacteria*. Также высокое содержание *Lyngbya* в микробных матах Vj-08, Vj-09 и Vj-10, где общее количество составляло 16,2, 14,3 и 6,9 %. В образцах с солёностью 243 и 220 г/л преобладали экстремально галофильные цианобактерии рода *Eubhalothese* (25,2 % - Vj-06; 12,5 % - Vj-10).

Филум *Bacteroidetes* в исследуемой группе II от 0,1 до 14,5 % состоит из некультивируемых бактерий, максимальное количество обнаружено в образцах станции Vj-10, а наименьшее в Vj-07, где общее содержание филума не превышало 0,1 %. Алкало- и галотолерантные микроорганизмы рода *Sediminibacterium* являются единственными культивируемыми представителями в филе *Bacteroidetes*, количество последовательностей этого рода не превышало 0,2 %.

Бактерии филума *Rhodothermaeota* в исследуемых образцах представлены вновь некультивируемыми микроорганизмами с наибольшим содержанием в образце Vj-06 – 24,9 % и на 1,9 % состоят из культивируемого, галофильного и гетеротрофного рода *Longimonas*. Члены филума *Rhodothermaeota* являются грамтрицательными палочками, которые часто оказываются экстремальными в отношении концентрации NaCl, pH и температуры (Munoz et al., 2016). Munoz в 2016 году пересмотрел филогению *Bacteroidetes* и предложил выделить в отдельный таксон филум *Rhodothermaeota* с использованием различных генеалогических маркеров (Munoz et al., 2016).

III группа включает биотопы донного осадка Vj-01 и микробного мата Vj-03с, где солёность составила 108 и 277 г/л соответственно. В результате анализа выявлено, что микробные сообщества содержали 7 (Vj-01) и 10 (Vj-03с) бактериальных филумов. В обоих образцах распространены филумы

Proteobacteria (45,9 – 52,4 %), *Rhodothermaeota* (34,4 – 1,2 %), *Firmicutes* (10,8 – 3,2 %), *Bacteroidetes* (4,4 – 16,6 %) и *Cyanobacteria* (1,9 – 12,7 %).

Филум *Proteobacteria* представлен облигатно галофильными бактериями класса *Gamma proteobacteria* (35,7 – 29,2 %), а именно анаэробными денитрифицирующими и протеолитическими бактериями рода *Halomonas* (14,2%), аноксигенными фототрофными бактериями рода *Ectothiorhodospira* (9,7%) в станциях Вj-01 и Вj-03с, фотолитоавтотрофными либо фотогетеротрофными бактериями рода *Halochromatium* (18,5 %). Также в III группе относительно невысокое содержание галофильных сульфат-окисляющих бактерий рода *Thioalkalivibrio* (Вj-01 - 2,9 %; Вj-03с - 1,4 %).

Класс *Alphaproteobacteria* представлен некультивируемыми бактериями семейства *Rhodobacteraceae* (3,6 % - Вj-01; 8,2 % - Вj-03с). Среди культивируемых бактерий класса *Alphaproteobacteria* присутствует галофильный хемоорганотрофный род *Salinarimonas* (4,3 % - Вj-01; 1 % - Вj-03с).

Филум *Rhodothermaeota* в сообществе представлен только некультивируемыми бактериями, количество которых в пробе Вj-01 - 34,5 %, а в образце Вj-03с - 1,2 %. В филуме *Firmicutes* донного осадка Вj-01 доминировал факультативно анаэробный галоалкалофильный и гетеротрофный род *Pelagirhabdus* (6,2 %), который способен гидролизовать различные сахара, нитриты и мочевины (Sultanpuram et al., 2016a). В образце Вj-03с филум *Firmicutes* представлен ацетат-окисляющими алкалофильными бактериями *Candidatus Contubernalis* (1,1 %) и некультивируемыми бактериями семейства *Syntrophomonadaceae* (1 %), которые используют карбоновые кислоты в качестве источника энергии (Schink et al., 2014).

В группе III филум *Bacteroidetes* представлен некультивируемыми бактериями на 4,2 % в Вj-01 и 11 % в Вj-03с. Среди культивируемых бактерий в обоих образцах присутствовал род *Sediminibacterium*.

Филум *Cyanobacteria* в исследуемых образцах представлен одноклеточными галофилами рода *Lyngbya* (3,6 % – Вj-03с; 0,3 % - Вj-01). Экстремально галофильная цианобактерия *Euhalothece* присутствует только в образце Вj-01

(1,6 %). В микробном мате образца Vj-03с – высокое содержание некультивируемых цианобактерий Family I (Subsection III) - 8,2 %.

IV группа с солёностью свыше 400 г/л включает образцы Vj – 02, Vj – 02в и Vj – 05, которые представлены филумами доменов *Bacteria* и *Archaea* в количестве от 9 до 13. В образцах Vj-02в и Vj-02 филум *Euryarchaeota* составил 20,8 и 11,8 %, а в Vj-05 его доля в несколько раз выше - 68,6 %. В бактериальном сообществе исследуемых станций преобладали филумы *Proteobacteria* (9,1 – 43,9 %), *Firmicutes* (9,4 – 23,5 %) и *Rhodothermaeota* (7,9 - 12,4 %).

Во всех образцах IV группы преобладал род *Halorubrum* (филум *Euryarchaeota*). Бактерии этого рода являются экстремально галофильными и в качестве энергии используют нитраты, аминокислоты, карбоновые кислоты и сахара. Концентрация NaCl для роста необходима от 290 г/л и выше, а оптимум pH от 9 до 10 (Gibtan et al., 2018). В станции Vj-05 распространение гетеротрофных экстремально галофильных архей семейства *Halobacteriaceae* шире и включает рода: *Halovenus* (6,5 %), *Halonotius* (3,1 %), *Natronomonas* (3,1%) и *Halorhabdus* (1,9 %). Также во всех станциях высокое содержание некультивируемых родов семейства *Halobacteriaceae* (Vj-02 – 9,2 %; Vj-02в – 5,3%; Vj-05 – 23,8 %).

Филум *Proteobacteria* в пробах представлен тремя классами: *Gamma**proteobacteria* (7,3 - 35,5 %), *Alpha**proteobacteria* (0,9 - 4,73 %), и *Delta**proteobacteria* (0,2 – 12,7 %). В *Gamma**proteobacteria* широко распространены некультивируемые микроорганизмы (4,9 – 8,9 %) и экстремально галофильные, фототрофные и литоавтотрофные бактерии рода *Halorhodospira* (2,2 – 9,2 %). Также в образце Vj-02в высокое содержание гидролитических, денитрифицирующих и галофильных бактерий рода *Halomonas* – 8,6 %. Класс *Alpha**proteobacteria* состоит из некультивируемых бактерий семейства *Rhodobacteraceae* и культивируемых несерных алкалофилов рода *Rhodobaca* (0,3 – 2,1 %). В образце станции Vj-02 доминировал класс *Delta**proteobacteria*, где 10,6 % последовательностей принадлежало к

экстремально галоалкалофильному роду *Desulfonatronospira*, который способен восстанавливать сульфаты и сульфиты (Sorokin et al., 2017).

Филум *Firmicutes* был представлен классами *Clostridia* и *Bacilli*, в зависимости от станции, различными родами. Образец Vj-02 содержал галоалкалофильных анаэробов рода *Halobacteroides* (6,8 %), который сбраживает углеводы и органические кислоты, а также некультивируемые бактерии семейства *Halobacteroidaceae* (4 %) и *Clostridia* (3,1 %) (Oren et al., 1984). Филум *Firmicutes* в образце Vj-02в представлен молочнокислыми бактериями рода *Lactobacillus* (5,2 %) и *Lactococcus* (2,6 %), а в пробе Vj-05 на 1 % состоит из *Bacillus* и некультивируемых микроорганизмов рода *Clostridiales*. Филум *Rhodothermaeota* представлен некультивируемыми бактериями, только в пробе Vj-05 отмечено высокое содержание экстремальных галофилов рода *Salinibacter* (25,5 %).

Таким образом, автотрофные продуценты в исследуемых образцах представлены одноклеточными и нитевидными галофильными цианобактериями, которые при умеренной минерализации являются доминирующими. В низкоминерализованном образце с солёностью 6 г/л (Vj-11) за фиксацию углекислого газа отвечают галотолерантные цианобактерии рода *Halomicronema* и *Cyanobium gracile*. В станциях с солёностью от 113 до 210 г/л доминируют цианобактерии рода *Lyngbya*, а в образцах с солёностью 220 и 243 г/л - экстремально галоалкалофильные цианобактерии *Euhalothece*. При увеличении минерализации количество последовательностей цианобактерий было незначительным и не превышало 2 %.

В пробах исследуемых станций активными участниками цикла серы представлены бактериями классов *Gammaproteobacteria* и *Alphaproteobacteria* такие рода, как *Halochromatium*, *Thioalkalivibrio*, *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira* и *Desulfonatronum*. Прокариоты рода *Halochromatium* являются морскими бактериями, выделенные и описанные представители этого рода способны выдержать концентрацию NaCl до 30 г/л. В изученных станциях бактерии рода *Halochromatium* обнаружены при солёности от 113 до 277 г/л,

также как и в гиперсоленых содовых озёрах Кулундинской степи (Алтай, Россия) с концентрацией NaCl от 150 до 300 г/л и Вади-Натрун (Ливийская пустыня, Египет) (Tourova et al., 2013). Род *Ectothiorhodospira* присутствует во всех станциях от 0,4 до 9,7 % (от числа всех определённых последовательностей ОТЕ в образце) и превалирует на станциях с солёностью 243 и 277 г/л. Представители *Ectothiorhodospira* широко распространены в солоноватых, соленых, гиперсоленых средах и в содовых озёрах с сильно различающимся содержанием общих солей (Gorlenko et al., 2009). Сероокисляющие бактерии рода *Thioalkalivibrio* являются метаболически гибкими и распространены в широком диапазоне солёности, их количество варьировало от 1 до 7 %. Экстремально галофильные пурпурные серные бактерии рода *Halorhodospira* обнаружены в высокоминерализованных образцах свыше 250 г/л в диапазоне от 0,3 до 9,2 %: озёра Ундерту (Vj-05 и Vj-06) и в западном озере Бадаин (Vj-01 и Vj-02). Сульфатредуцирующие бактерии *Desulfonatronum* присутствуют в озёрах с минерализацией от 108 до 197 г/л, это обусловлено их умеренной солеустойчивостью в окружающей среде (Bernal et al., 2017).

Гетеротрофные бактерии широко распространены в исследуемых микробных сообществах, они участвуют в циклах углерода, азота и серы, разлагая органические биополимеры (Mata et al., 2002; Arahall et al., 2006). Основные таксоны представлены галоалкалофильными гидролитическими бактериями родов: *Halomonas*, *Wenzhouxiangella*, *Aquisalimonas*, *Spiribacter* и *Pseudomonas* класса *Gamma*proteobacteria. Представители рода *Halomonas* обнаружены во всех образцах от 0,2 до 14,2 %, и являются эврибионтами, т.к. способны функционировать при высоких значениях солёности до 250 г/л, в щелочной среде с pH до 12 и широком диапазоне температур от 10 до 50 °C (Jiang et al., 2014; Koh et al., 2017). Характерно, что в изученных станциях с Солёностью более 250 г/л содержание рода *Halomonas* возрастало до 15 %. Ранее *Halomonas* был отмечен, как доминирующий род в воде содовых озёр Шаохазаохаизи и Сангеджилиан в пустыне Бадаин Жаран (Lu Li et al., 2015). Умеренно галофильный род *Wenzhouxiangella* обнаружен в образцах с

солёностью до 200 г/л, где количество их последовательностей не превышает 1,6%. Этот род принадлежит к морским бактериям с диапазоном роста при NaCl 50-130 г/л (Wang et al., 2015). Галофильный род *Aquisalimonas* присутствует в озёрах с солёностью от 210 до 277 г/л (Vj-06, Vj-01, Vj-09 и Vj-10). Ранее этот род был выделен из содовых озёр Внутренней Монголии с оптимальным диапазоном культивирования при концентрации NaCl от 10 до 200 г/л (Márquez et al., 2007). Род *Spiribacter* относится к умеренно галофильным бактериям с оптимальным ростом при солёности 150 г/л. Однако были обнаружены последовательности этого рода в исследуемых образцах с солёностью от 277 до 495 г/л и их количество варьировало от 0,58 до 13,7 %. Ранее авторами Lu Li в 2015 году умеренно галофильный род *Spiribacter* был отмечен, как доминирующий род с солёностью от 100 до 300 г/л пустыни Бадаин Жаран (Li et al., 2015).

К первичным деструкторам органического вещества отнесены представители филума *Rhodothermaeota*. Обнаружено высокое содержание некультивируемых бактерий от 0,1 до 37,6 %, наибольшее содержание которых в станциях Vj-01 и Vj-02, и лишь в корковой соли станции Vj-05 присутствует культивируемый экстремально галофильный род *Salinibacter*, в котором обнаружены гены, способные продуцировать протеолитические ферменты (Ogen, 2013). Домен *Archaea* наблюдался только в станциях с солёностью свыше 400 г/л. Наибольшее содержание и доминирование было определено в микробном сообществе корковой соли Vj-05. Наибольшее количество последовательностей во всех станциях было представлено экстремально галоалкалофильным родом *Halorubrum*, который в микробном сообществе является первичным деструктором и представители этого рода способны продуцировать гидролитические ферменты (Karray et al., 2018). Этот род был обнаружен в гиперминерализованных озёрах Китая, например, в оз. Забуйе, Синьцзяне, Чаганнор, ранее в озёрах пустыни Бадаин Жаран, а также в Чили озёрах пустыни Атакама (Neilson et al., 2012; Li et al., 2015; Sun et.al., 2018; Banda et.al., 2019).

Таблица 5. Процентная доля наиболее распространенных родов в микробных сообществах содово-соленых озёр пустыни

Бадаин Жаран.

Филум	Класс	Род	I	II						III		IV			
1	2	3	Vj-11	Vj-04	Vj-06	Vj-07	Vj-08	Vj-09	Vj-10	Vj-01	Vj-03c	Vj-02	Vj-02B	Vj-05	
Автотрофы															
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Subsection III</i>	<i>Lyngbya</i>	0,5	52,9	0,1	0,5	16,2	14,3	6,9	0,3	3,6	0	0	0,1	
		<i>Euhalothece</i>	0,6	0,1	25,2	0,3	0,3	5,2	12,5	1,6	0	0	0	0	0,1
		<i>Halomicronema</i>	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Spirulina</i>	2,8	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Subsection I</i>	<i>Cyanobium gracile</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Phormidium</i>	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Synechococcus</i>	0	2,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>uncultured_Cyanobacteria</i>			0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0,7	1,3	
	<i>uncultured_Subsection III</i>		0	0,2	0	0	0	0	0	0	8,2	0	0	0	
Фотолитоавтотрофы и хемолитоавтотрофы															
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gamma proteobacteria</i>	<i>Thioalkalivibrio</i>	0,2	3,5	5,2	6,7	2,8	4,1	4	2,9	1,4	1,1	0	0	
		<i>uncultured_Ectothiorhodospiraceae</i>	0	0	1,7	0,4	0	0,3	0,4	0,3	0	0,7	0	0	0
		<i>Halochromatium</i>	0,2	0,4	0,3	0,2	0,5	0,2	4,3	0,1	18,5	0	0	0	0
		<i>Ectothiorhodospira</i>	0	0,1	2,4	0	1,3	0	0,4	9,7	0	0,4	0	0	0
		<i>Halorhodospira</i>	0	0	0,3	0	0	0	0	0,4	0	9,2	0	2,2	0
	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfonatronospira</i>	0,3	0	1,3	0,9	0,1	0	4,8	0,2	0,4	10,6	0	0	0
		<i>Desulfonatronum</i>	0	0,9	0	0,7	3,3	0	0	0	8	0	0	0	0
	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacter</i>	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Rhodobaca</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	2,1	0,1	0
		<i>uncultured_Rhodobacteraceae</i>		2,2	25	0,8	58,1	39,7	39,9	18,8	3,6	8,2	0,8	1,2	0,2

1	2	3	Bj-11	Bj-04	Bj-06	Bj-07	Bj-08	Bj-09	Bj-10	Bj-01	Bj-03c	Bj-02	Bj-02B	Bj-05
Гетеротрофы														
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Wenzhouxiangella</i>	0	0,2	0	1,6	0,1	0	0	0	0,1	0	0	0
		<i>Serratia</i>	15,5	1	10	0,4	5,6	0,7	1,1	0,9	1,2	5,2	0,8	0,2
		<i>Aquisalimonas</i>	0	0	0,5	0	0	0,3	0,6	0,6	0	0,1	0	0
		<i>Salinispirillum</i>	0	0	0	0	1,2	0,1	0,2	0,4	0	0	0	0
		<i>Halomonas</i>	0,3	0,1	0,2	0	0,2	0,2	0,1	14,2	0	0,3	8,6	0
		<i>Silanimonas</i>	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Spiribacter</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0	0	0	0
	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Salinarimonas</i>	0,1	1,6	0	14,1	5,6	6,2	1,9	4,3	1	0	0	0
	uncultured_ <i>Alphaproteobacteria</i>		3,8	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1
	uncultured_ <i>Deltaproteobacteria</i>		0,5	0	0,5	0	0	0	0,4	0,9	0,1	0,2	0	0
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,2	0,9
		<i>Lactococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,6
	<i>Clostridia</i>	uncultured_ <i>Syntrophomonadaceae</i>	0	0,3	0,2	0,7	0,2	0,1	0,3	0	1,1	0	0	0
		<i>Candidatus Contubernalis</i>	0	0,1	0,2	0	0	0	0,3	0	1,1	0	0	0
		<i>Halanaerobium</i>	0,1	0	0,8	0	0	0	0,2	2,1	0,1	0,8	0,3	0
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	uncultured_ <i>Halobacteroidaceae</i>	0	0	0,5	0	0	0	0,2	0,4	0	4	0,3	0,2
		<i>Halobacteroides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,8	0	0,1
	uncultured_ <i>Clostridia</i>		0	0,1	0,3	0	0	0	0,3	0	0,2	3,1	0,4	0,2
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sediminibacterium</i>	1,5	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0	0
		<i>Haliscomenobacter</i>	3,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1	2	3	Bj-11	Bj-04	Bj-06	Bj-07	Bj-08	Bj-09	Bj-10	Bj-01	Bj-03c	Bj-02	Bj-02B	Bj-05	
<i>Rhodothermaeota</i>	<i>Rhodothermia</i>	<i>Longimonas</i>	0	0	1,9	0	0,1	0	0,6	0,1	0	0	0	0	
		<i>Salinibacter</i>	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	25,5
uncultured_ <i>Rhodothermaeota</i>			0,4	0,1	24,9	0,1	0,2	2,4	9,4	34,4	1,2	12,1	11,8	7,6	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Ilumatobacter</i>	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Spirochaetae</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaeta</i>	1	0,3	3,6	2,5	3,1	6	7,9	2,2	3	2,3	0	0	
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Halobacteria</i>	<i>Halorubrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	16,5	29,4	
		<i>Halonotius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	3,1
		<i>Halovenus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,5
		<i>Natronomonas</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,1
		<i>Halorhabdus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9
		<i>Natronorubrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,7
		uncultured_ <i>Halobacteriaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,2	5,3	23,8

В целом результаты исследования показали, что гетеротрофные представители в исследуемых образцах содово-соленых озёр представляют собой потенциальный ресурс галоалкалофильных бактерий, способных продуцировать протеолитические ферменты, поскольку содержали значительную долю таких бактерий.

Экологические факторы, такие как, высокая солёность и щёлочность окружающей среды обуславливают развитие галоалкалофильного микробного сообщества. В исследуемых станциях установлена связь между таксономическим составом микробных сообществ и минерализацией. Умеренные галофильные бактерии выдерживали солёность только до 200 г/л, например, *Desulfonatronum*. Галофильные бактерии *Halochromatium*, *Lyngbya*, *Halomonas* и *Spiribacter* превалируют в станциях с солёностью до 277 г/л, что демонстрирует их высокий адаптационный механизм к различной минерализации. Однако в экстремально галофильных средах, где солёность составляла 410 – 495 г/л, доминируют экстремально галофильные бактерии рода *Halorhodospira* и *Desulfonatronospira*, а также археи рода *Halorubrum*. В микробных сообществах отмечено высокое содержание аноксигенных фототрофных бактерий, возможно, из-за низкого содержания растворенного кислорода в образцах. В предыдущих исследованиях, в содово-соленых озёрах пустыни Бадаин Жаран и пустыни Атакама, схожих по физико-химическим и географическим параметрам, также показали существенный вклад аноксигенных бактерий в состав микробного сообщества (Neilson et al., 2012; Li et al., 2015; Sun et.al., 2018; Banda et.al., 2019).

3.3. Элементный состав СНН в нативных пробах и внеклеточная протеолитическая активность

Трансформация природных соединений и бактериальных метаболитов в естественных экосистемах является одним из важнейших природных процессов. Нами определено содержание СНН в природных образцах. Показано, что общее содержание углерода в образцах составило от 0,36 до 9,86 %, водорода от 0,01 до 1 % и общее содержание азота от 0,01 до 0,75 % (Табл. 6). Количество валового

белка в образцах варьировало от 0,38 до 4,69 %. Содержание валового белка в микробных матах выше по сравнению с корковой солью и донными осадками.

Таблица 6. Содержание общего элементного состава CHN и валового белка в нативных пробах

№ Станции	Навеска, мг	Содержание элементов, %			C _{Гр} , %
		C	H	N	
Vj-01	1,13	3,91	0,38	0,09	0,90
Vj-02	1,17	5,85	0,56	0,09	0,56
Vj-03с	1,69	9,86	1,00	0,63	3,94
Vj-04	1,65	3,72	0,31	0,19	1,19
Vj-05	1,51	1,03	0,01	0,01	0,06
Vj-06	1,01	5,13	0,47	0,10	0,63
Vj-07	1,19	7,67	0,70	0,47	2,94
Vj-08	1,11	6,20	0,59	0,75	4,69
Vj-09	1,57	2,88	0,27	0,18	1,13
Vj-10	1,11	3,19	0,27	0,28	1,75
Vj-11	1,12	0,36	0,01	0,06	0,38

Анализ таксономического разнообразия галоалкалофильного микробного сообщества озёр пустыни Бадаин Жаран показал высокий процент (более 50 %) бактерий, участвующих в процессах деструкции.

Численность протеолитических бактерий в изучаемых озёрах колебалась от 10^1 до 10^6 млн кл/мл. Максимальные значения обнаружены в микробных матах точек Vj-03с, Vj-04, Vj-07, Vj-08, Vj-09, а минимальное значение – в песчаном мате образца Vj-11 (Табл. 7).

Протеолитические бактерии являются инициаторами процесса разложения белоксодержащих веществ в микробных сообществах. В зависимости от экологических факторов исследуемой экосистемы активность протеолитических ферментов может проявляться в разной степени – активироваться, либо инактивироваться. Чтобы понять направление действия тех или иных факторов, в

пробах микробных матов, донного осадка и корковой соли была изучена внеклеточная пептидазная активность.

Таблица 7. Численность протеолитических бактерий в нативных образцах

Станция	Пробы	Численность, млн. кл/ мл
Vj-01	Донный осадок	10^3
Vj-02	Микробный мат	10^4
Vj-02в	Вода	10^2
Vj-03В	Микробный мат	10^5
Vj-04	Микробный мат	10^6
Vj-05	Корковая соль	10^2
Vj-06	Микробный мат	10^5
Vj-07	Микробный мат	10^6
Vj-08	Микробный мат	10^6
Vj-09	Микробный мат	10^6
Vj-10	Микробный мат	10^5
Vj-11	Песчаный мат	10^1

В исследуемых образцах станций обнаружена субтилизин-подобная (GlpAALpNa) и аминопептидазная активности (LpNa и FpNa) (Табл. 8). Максимальная активность была зафиксирована в образце Vj-07 по субстрату FpNa (292,8 ЕА/мл), в пробах Vj-08 и Vj-09 значения ниже 82 и 92,5 ЕА/мл соответственно. В этих же станциях микробных матов отмечена аминопептидазная активность, которая составляла 241,3 ЕА/мл в образце Vj-07, 41 ЕА/мл в Vj-08 и 39 ЕА/мл в Vj-09. По субстрату GlpAALpNa протеолитическая активность была значительно ниже и достигала 33,9 ЕА/мл. В образце Vj-11 в песчаном осадке низкая пептидазная активность, также, как и в корковой соли пробы Vj-05. Достаточно высокая активность отмечена в микробных матах с солёностью от 145 до 495 г/л. Можно предположить, что протеолитическая активность в нативных образцах не зависит от минерализации места обитания, а

обусловлена типом биотопа, поскольку ферментативная активность в микробных матах выше, чем в остальных образцах.

Таблица 8. Внеклеточная протеолитическая активность в нативных образцах

№ Станция	Солёность, г/л	Активность, ЕА/мл		
		1	2	3
		GlpAALpNa	LpNa	FpNa
Vj-11	6	4±0,2	4,2±2	2,6±1
Vj-03C	108	22,9±10	14,6±4	29±8
Vj-04	113	17,8±8	3,6±3	2±0,8
Vj-08	145	30,7±12	41±15	82±19
Vj-07	197	33,9±11	241,3±15	292,8±21
Vj-09	210	7,6±2	39±11	92,5±13
Vj-10	220	16,5±5	16,9±5	27,8±6
Vj-06	243	1,9±1	19,6±8	20,7±4
Vj-01	277	4,1±2	18,4±9	8,1±2
Vj-05	410	2,9±1,5	0,9±0,3	0,9±0,3
Vj-02	495	15,7±7	17,8±7	13,9±4

3.4. Эколого-физиологическая характеристика протеолитических бактерий

Из микробных матов, песчаного мата и корковой соли было выделено 10 протеолитических галоалкалофильных штаммов, доминировавших при выделении из накопительных культур и при посеве на агаризованную среду, включающую единственное органическое соединение в качестве источника углерода и энергии.

Генотипическая характеристика чистых протеолитических бактерий
Таксономическую принадлежность выделенных чистых культур микроорганизмов определяли путём сравнения данных секвенирования продуктов амплификации генов 16S рРНК с данными NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и LPSN (<http://www.bacterio.net>), где перечислены

достоверно опубликованные имена прокариот. Этот анализ выявил сходство на уровне 98–99 % выделенных бактерий с гомологами (Табл. 9).

Таблица 9. Таксономическая идентификация штаммов, выделенных из содово-соленых озёр пустыни Бадаин Жаран

Таксон	Штамм	Уровень гомологии, %	Станция отбора, проба	Впервые был выделен
Класс <i>Bacilli</i>, семейство <i>Bacillaceae</i>				
<i>Salisediminibacterium halotolerans</i> halo-2	5P	99,9	Ундерту (лагуна), Соль	Содовое оз. Ксиариноэр (Внутренняя Монголия) осадок (Jiang et al., 2012)
<i>Salisediminibacterium haloalkalitolerans</i> 10ngl	10P	99,9	Ихер, Микробный мат	Содовое оз. Лонар (Индия) осадок (Sultanpuram et al., 2015)
<i>Amphibacillus diazotrophicus</i> 22KS-2	6G	98	Ундерту, Микробный мат	Содовая почва Монголии (Sorokin et al., 2008b)
<i>Pelagirhabdus alkalitolerans</i> S5T	A11	98,68	Бадаин Песчаный мат	Пляжный песок Пингалешвар (Индия) (Sultanpuram et al., 2016a)
<i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10	7G	99,9	Сумуджилин, Микробный мат	Содовое оз. Моно (Калифорния) (Switzer Blum et al., 1998)
<i>Salsuginibacillus halophilus</i> halo-1	7-300	99,9	Сумуджилин, Микробный мат	Содовое оз. Хиагинаоер (Внутренняя Монголия) осадок (Cao et al., 2010)
1. <i>Uncultured Virgibacillus sp. clone</i> T13M-B29	7A	99,25	Сумуджилин, Микробный мат	1.н.д.
2. <i>Salipaludibacillus agaradhaerens</i> T13M-B29		98,3		2.оз. Нараян Саровар (Индия) (Sultanpuram et al., 2016b)
Класс <i>Gamma</i>proteobacteria, семейство <i>Halomonadaceae</i>				
<i>Halomonas mongoliensis</i> Z-7009	3B	99	Нуорту, Микробный мат	Содовое оз. Дзун-Тухэм-Нур (северо-восточная Монголия) (Boltyanskaya et al., 2007)
<i>Halomonas spp.</i> GU228482	7B и 7P	98,4	Сумуджилин, Микробный мат	Оксалатные отходы (McSweeney et al., 2011)

Все выделенные бактерии принадлежали домену *Bacteria*, из них 7 штаммов, выделенные из исследованных озёр, близкородственны семейству *Bacillaceae* филума *Firmicutes*, 3 изолята отнесены к семейству *Halomonadaceae*.

Для штаммов 5P и 10P было построено филогенетическое древо со всеми валидно зарегистрированными бактериями рода *Salisediminibacterium*, которые формируют самостоятельную ветвь, это иллюстрирует таксономическое положение штаммов в пределах рода (Рис. 14). Ближайшие гомологи штаммов 5P и 10P *Salisediminibacterium halotolerans* и *Salisediminibacterium haloalkalitolerans* были выделены из осадков содовых озёр Ксиариноэр (Внутренняя Монголия) (Jiang et al., 2012) и озёра Лонар (Индия) (Sultanpuram et al., 2015).

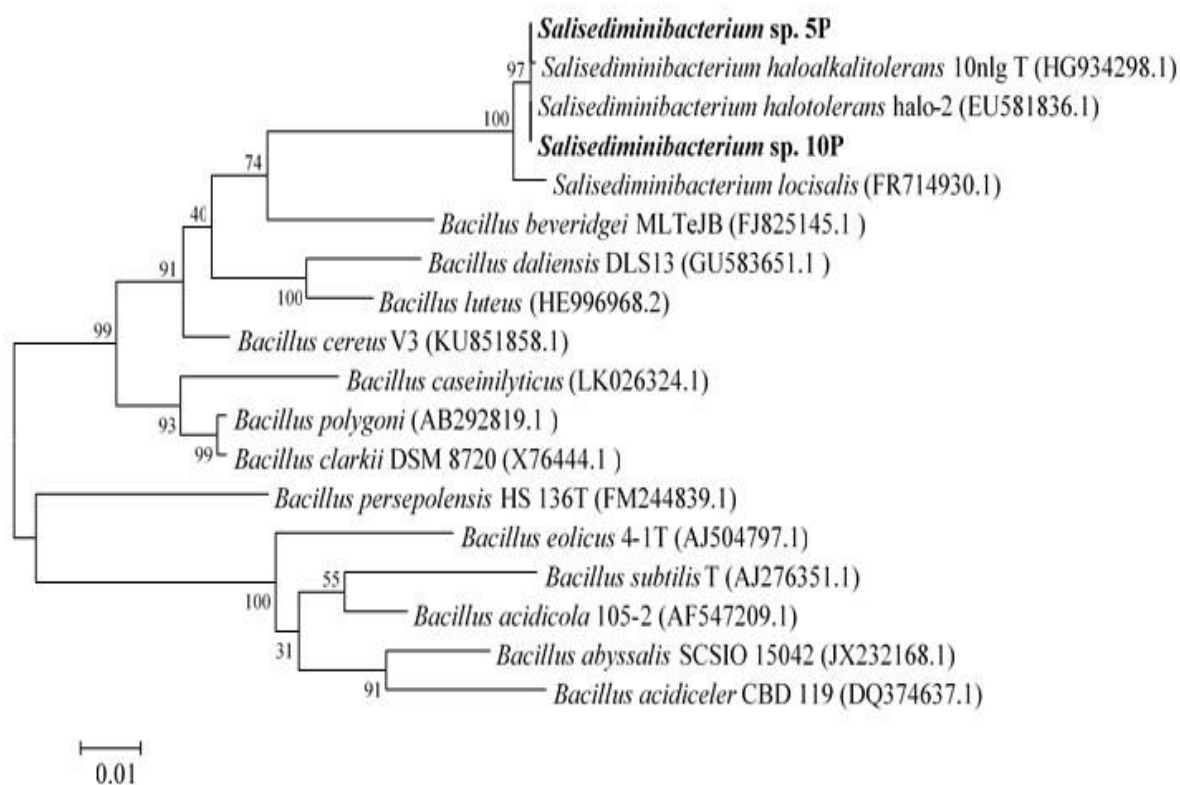


Рисунок 14. Филогенетическое положение основано на анализе последовательности 16S рДНК штаммов 5P и 10P в семействе *Bacillaceae*. Деревья были построены с использованием метода «Maximum Likelihood». Значения «Bootstrap» на основе 1000 повторений перечислены в процентах в точках разветвления. Var 0.01 нуклеотидных замен на нуклеотидную позицию.

Изоляты 6G и A11 являются ближайшими гомологами галоалкалофильных бактерий *Amphibacillus diazotrophicus* и *Pelagirhabdus alkalitolerans*, выделенных из содово-солончаковых почв (Sorokin et al., 2008b) и из пляжного песка Пингалешвар (Индия) (Sultanpuram et al., 2016a) соответственно. Результаты филогенетического анализа последовательностей генов 16S рРНК свидетельствуют о том, что штамм 6G кластеризован с *Pelagirhabdus alkalitolerans* и *Pelagirhabdus fermentum* (Рис. 15), а штамм A11 создаёт ветвь с *Amphibacillus diazotrophicus*.

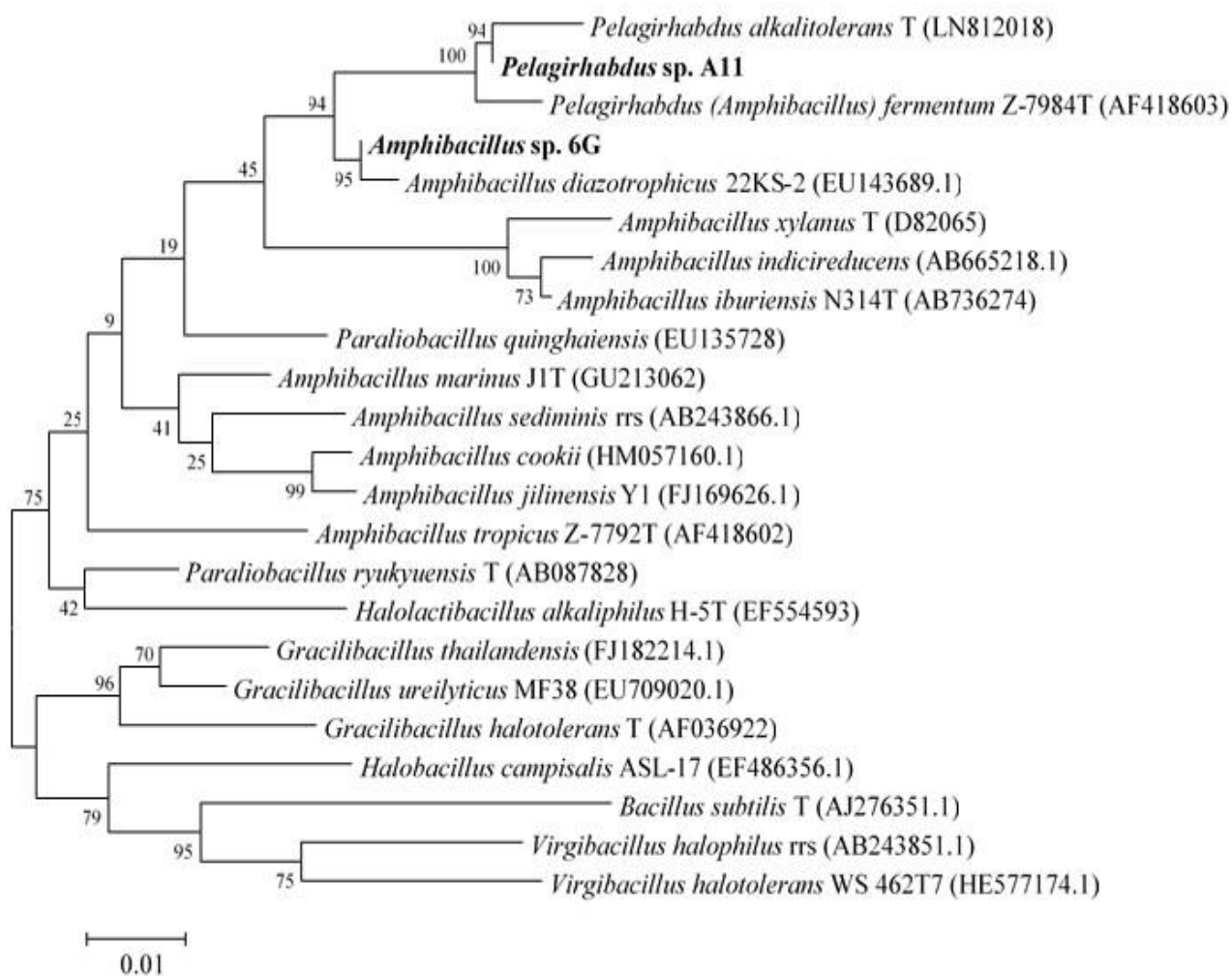


Рисунок 15. Филогенетическое положение основано на анализе последовательности 16S рДНК штаммов 6G и A11 в семействе *Bacillaceae*. Деревья были построены с использованием метода «Maximum Likelihood». Значения «Bootstrap» на основе 1000 повторений перечислены в процентах в точках разветвления. Bar 0.01 нуклеотидных замен на нуклеотидную позицию.

Бактерии штаммов 7G и 7-300 были выделены из микробного мата оз. Сумуджилин, процент сходства с гомологами составил 99,9 и 99,25 % с *Bacillus selenitireducens* и *Salsuginibacillus halophilus* (Blum et al., 1998; Cao et al., 2010). На рисунке 16 показано филогенетическое древо, где выделенные штаммы с гомологами создают отдельный кластер, доказывающий их таксономическую принадлежность к известным видам.

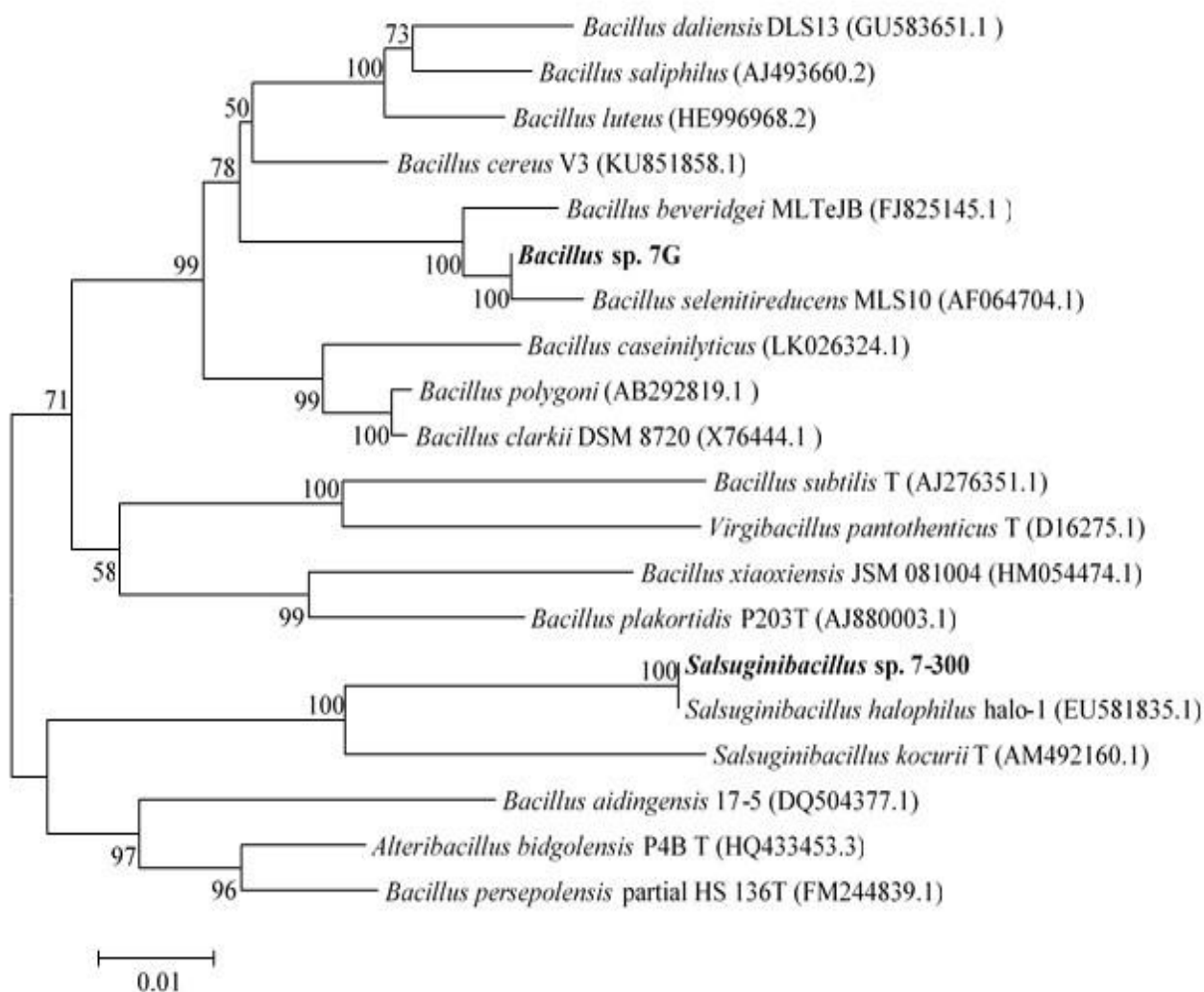


Рисунок 16. Филогенетическое положение основано на анализе последовательности 16S рДНК штаммов 7G и 7-300 в семействе *Bacillaceae*. Деревья были построены с использованием метода «Maximum Likelihood». Значения «Bootstrap» на основе 1000 повторений перечислены в процентах в точках разветвления. Var 0.01 нуклеотидных замен на нуклеотидную позицию.

Наибольшее сходство штамма 7А выявлено с алкалофильной бактерией *Salipaludibacillus agaradhaerens*, выделенной из озера Нараян Саровар (Индия), которое составило 98,29 % (Sultanpuram et al., 2016). С невалидированным некультивированным клоном *Virgibacillus* sp. T13M-B29 база NCBI Blast показала максимальное сходство, которое составило 99,25 %. При филогенетическом анализе последовательностей генов 16S рРНК показано, что штамм 7А кластеризован с Uncultured *Virgibacillus* sp. clone T13M-B29 (Рис. 17). Клон был получен из низкотемпературного гидротермального месторождения, богатого Fe-Si-Mn на юго-западе Индийского хребта (Li et al., 2013).

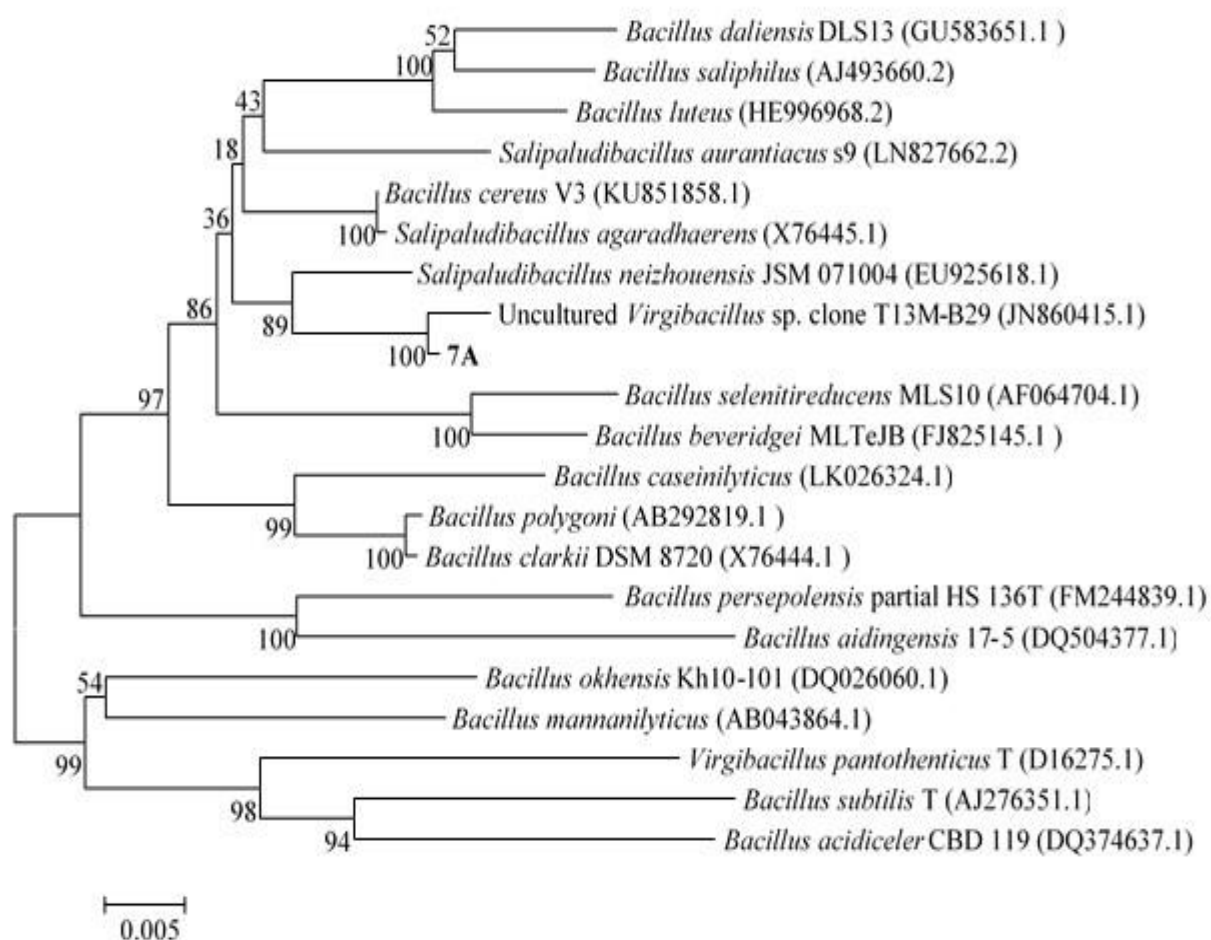


Рисунок 17. Филогенетическое положение основано на анализе последовательности 16S рДНК штамма 7А в семействе *Bacillaceae*. Деревья были построены с использованием метода «Maximum Likelihood». Значения «Bootstrap» на основе 1000 повторений перечислены в процентах в точках разветвления. Вар 0.01 нуклеотидных замен на нуклеотидную позицию.

Филогенетический анализ родства штамма 3В показывает кластеризацию с ближайшим гомологом на 99 %, что подтверждает принадлежность к одному виду *Halomonas mongoliensis* (Рис. 18), который был впервые выделен из озёра Дзун-Тухом-Нур (Северо-Восточная Монголия) (Voltyanskaya et al., 2007). Последовательности штаммов 7В и 7Р показали более низкий процент гомологии с типовыми штаммами рода *Halomonas*, максимальный процент отмечен для вида *Halomonas alkalicola* CICC11012s^T (KU530128) и составил 98,4 %. Наибольший процент гомологии (99 %) штаммы 7В и 7Р имеют с невалидированными бактериями *Halomonas* sp.HI.br и *Halomonas* sp.HI соответственно.

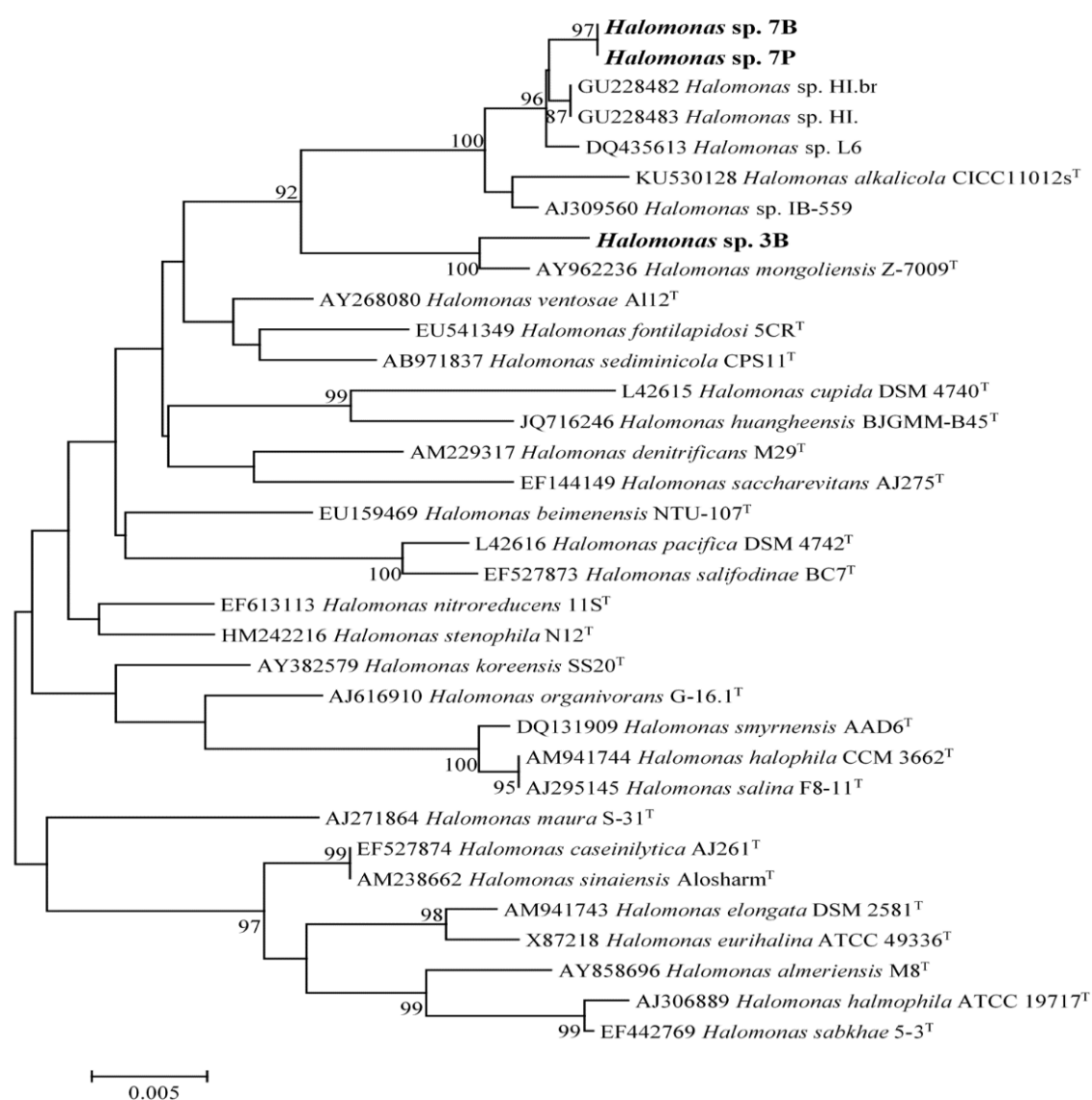


Рисунок 18. Филогенетическое положение основано на анализе последовательности 16S рДНК штаммов 3В, 7В и 7П рода *Halomonas*. Деревья были построены с использованием метода «Maximum Likelihood». Значения

«Bootstrap» на основе 1000 повторений перечислены в процентах в точках разветвления. Var 0.005 нуклеотидных замен на нуклеотидную позицию.

Филогенетический анализ показал достаточно высокую поддержку бутстреп-анализа для отдельного кластера, в который вошли, кроме последовательностей анализируемых штаммов *Halomonas* spp. 7В и 7Р, последовательности не идентифицированных до вида представителей DQ435613, GU228482 и GU228482, что позволяет определить только родовую принадлежность этих штаммов.

Морфологическая характеристика выделенных бактерий. Выделенные чистые культуры бактерий образуют круглые колонии белого (штамм 6G и A11), бежевого (штамм 7-300) или жёлтого цветов (штаммы 5P, 10P, 7G, 7A, 3B, 7B и 7P). Диаметр колоний составлял от 1 до 5 мм, профиль колоний выпуклый или каплевидный, край колоний у всех штаммов гладкий. Из всех выделенных бактерий только штаммы 6G и 7-300 способны образовывать споры. Структура клеточной стенки у бактерий 5P, 10P и 7-300 грамположительного типа, у остальных штаммов – грамтрицательного типа (Табл. 10).

Клетки бактерий семейства *Bacillaceae* представлены тонкими либо толстыми палочками, длина на стадии экспоненциального роста варьировала от 1 до 5 мкм, а толщина от 0,2 до 0,5 мкм. Клетки бактерий семейства *Halomonadaceae* являются прямыми, короткими, толстыми палочками, длина клеток штамма 3B составляла 0,7 - 2 мкм, а толщина 0,5 - 1 мкм, двигаются они с помощью одного полярного жгутика. Клетки штаммов 7P и 7B являются прямыми, длинными, толстыми палочками длиной 3-5 мкм и толщиной 0,8-1 мкм.

Таблица 10. Морфологическая характеристика выделенных бактерий

Показатель	Штаммы										
	5P	10P	6G	7G	7-300	A11	7A	3B	7P	7B	
Форма колоний	круглая	круглая	круглая	круглая	круглая	круглая	круглая	круглая	круглая	круглая	круглая
Профиль колоний	выпукл ый	выпукл ый	каплеви дный	каплеви дный	выпукл ый	каплеви дный	выпукл ый	выпукл ый	выпукл ый	выпукл ый	выпукл ый
Край колоний	гладкий	гладкий	гладкий	гладкий	гладкий	гладкий	гладкий	гладкий	гладкий	гладкий	гладкий
Цвет колоний	желтый	желтый	белый	желтый	бежевы й	белый	желтый	желтый	желтый	желтый	желтый
Формирование спор	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Размер колоний, мм	2-5	2-5	2-3	1-2	1-2	2-3	1-2	1-2	2-3	2-3	2-3
Размер клеток, мкм (длина×толщина)	1–2×0,3/	1 × 0,2	1–2×0,1	2–3×0,2	4–5×0,5	1- 1,5×0,2- 0,3	1- 1,5×0,2- 0,3	0,7- 0,2×0,5- 1	3-5×0,8- 1/	3-5×0,8- 1/	3-5×0,8- 1/
Подвижность	нет	нет	есть	нет	нет	есть	нет	есть	есть	есть	есть
Окраска по Граму	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Эколого-физиологические характеристики выделенных чистых культур.

Для 10 изолятов были определены границы и оптимумы роста в диапазонах pH, NaCl и температуры. Штаммы семейства *Bacillaceae* 5P, 10P, 7G и 7A растут в диапазоне pH от 8 до 10,5, проявляя свойства облигатных алкалофилов с оптимумом pH 9, кроме штамма 10P, для которого оптимум pH составил 10 (Табл. 11). Штаммы 6G, 7-300 и A11 являются умеренными алкалофилами с диапазоном pH 7–10,5 и оптимумом 9. Бактерии семейства *Halomonadaceae* также являются облигатными алкалофилами с диапазоном роста pH 8 - 10 и оптимумом 9.

По отношению к концентрации NaCl выделенные бактерии семейства *Bacillaceae* 7G и 6G являются галотолерантными бактериями с диапазоном роста 5–200 г/л и оптимумом 20 г/л. Штамм 7A проявляет свойства умеренного галофила с оптимумом NaCl 60 г/л и диапазоном от 10 до 200 г/л. Близкородственные штаммы 10P и 5P, а также штамм A11 являются галофилами с оптимумами роста 100 - 150 г/л. Штамм 7-300 можно отнести к экстремальным галофилам с диапазоном роста 60–300 г/л и оптимумом 200 г/л. Чистые культуры рода *Halomonas* способны расти в диапазоне концентрации NaCl от 30 до 200 г/л с оптимумом при 50-80 г/л.

Все выделенные чистые культуры по отношению к температуре являются мезофилами с оптимальным ростом в пределах 30 - 40 °С и температурным диапазоном роста от 10 - 55 °С.

Таким образом, проведённые исследования в соленых озёрах пустыни Бадаин Жаран позволили выделить и идентифицировать чистые культуры галоалкалофильных протеолитических бактерий. Выделенные бактерии проявляют свойства умеренных и облигатных алкалофилов, оптимум pH которых находится в пределах 9 - 10, диапазон роста от 7 до 10,5. При определении диапазона и оптимума концентрации NaCl штаммы проявили свойства умеренных, галотолерантных и экстремальных галофилов.

Выделенные нами штаммы семейства *Bacillaceae* 5P и A11 показали отличия от ближайших гомологов по экофизиологическим параметрам роста. У штамма 5P оптимум роста обнаружен при концентрации NaCl 150 г/л, тогда как у

Salisediminibacterium halotolerans – при 90 г/л. Оптимум pH для штамма 5P был выше и составил 9, а оптимум температуры ниже (30 °C), для гомолога *Salisediminibacterium halotolerans* оптимум развития выявлен при pH 8 и температуре 37 °C. Штамм A11, по сравнению с *Pelagirhabdus alkalitolerans*, показал шире диапазон роста на NaCl и оптимум выше на 50 г/л. Штамм 6G, в отличие от гомолога, показал развитие при более низком оптимуме NaCl и уже диапазон роста. У штаммов 7G, 10P и 7-300 полученные результаты по экофизиологии сопоставимы с литературными данными.

Характерно, что штамм 3B, в отличие от типового штамма *Halomonas mongoliensis* Z-7009, показал более широкий диапазон роста по NaCl, который варьировал от 30 до 200 г/л, тогда как у *Halomonas mongoliensis* Z-7009 – от 0 до 120 г/л. Следует отметить близкий температурный оптимум, определённый для штаммов *Halomonas* spp. 7B и 7P (40 °C), а у ближайшего гомолога *Halomonas* sp. IB-559 составил 44°C (McSweeney et al., 2011). К сожалению, в работе нет данных по оптимуму и диапазону роста этого штамма при различных значениях pH и солёности.

Широкие диапазоны роста по NaCl и pH выделенных бактерий, по-видимому, позволяют приспосабливаться к изменяющимся условиям природных систем в период дождей или засухи. Изученные изоляты отличались широкой метаболической активностью в отношении различных классов органических веществ, а в микробном сообществе исследуемых озёр являются активными участниками деструкции органического вещества (Болтянская, 2007). Отмечено также, что выделенные чистые культуры не являются строго приуроченными к обитанию в солёных озёрах пустыни Бадаин Жаран, а имеют широкий ареал распространения, включающий солёные и содовые озёра Индии, США и Кении.

Таблица 11. Основные характеристики выделенных чистых культур

Штаммы	NaCl, г/л		рН		Температура, °С		Формирование спор	Подвижность	Окраска по Граму
	Диапазон	Оптимум	Диапазон	Оптимум	Диапазон	Оптимум			
5P ¹	40–200 / 30–300*	150 / 90*	8–10,5 / 5–10,0*	9 / 8*	10–50 / 18–50*	30 / 37*	-	нет	Полож.
10P ²	40–250 / 20–300*	100 / 80–100*	8–11 / 6–12*	10 / 8,5–9*	10–50 / 20–50*	30 / 30–35*	-	нет	Полож.
6G ³	50–200/12–235*	20/60–90*	8–10/7,5–10,6*	9/9,5–10*	10–50/н. д.*	37/н. д.*	+	есть	Отриц.
7G ⁴	50–200 / 20–220*	20 / 24–60*	8–10 / 8,5–10*	9 / 9*	10–50 / н. д.*	37 / н. д.*	н. д.	нет	Отриц.
7-300 ⁵	60–300 / 90–300*	200 / 190*	7–10,5 / 5–10*	9 / 9*	10–50 / 18–50*	37 / 37*	+	нет	Полож.
A11 ⁵	10–250/0–160*	150/100*	7–10,5/6,5–11*	9/8,5–9,0*	20–40/20–55*	37/37*	-	нет	Полож.
7A ⁷	10–200/н.д.	60/н.д.	8 - 10,5/н.д.	9 / н.д.	20–50 / н.д.	37 /н.д.	н.д.	нет	Отриц.
3B ⁸	15–250	50	8 - 10,5/8–10,5*	9 / 8,5–9,6*	20–50	37	+	есть	Отриц.
7P ⁹ и 7B ¹⁰	30–200	80	8 - 10 / 8–10,5*	9 / 9*	20–50	37	+	есть	Отриц.

Примечание: Здесь и далее: 5P¹ - *Salisediminibacterium halotolerans* halo-2, 10P² - *Salisediminibacterium haloalkalitolerans*, 6G³ - *Amphibacillus diazotrophicus*, 7G⁴ - *Bacillus selenitireducens* MLS10, 7-300⁵ - *Salsuginibacillus halophilus* halo-1, A11⁶ - *Pelagirhabdus fermentum*, 7A⁷ - *Salipaludibacillus agaradhaerens*, 3B⁸ - *Halomonas mongoliensis*, 7P⁹ и 7B¹⁰ - *Halomonas* spp. GU228482

* Значения представлены по литературным данным: 1 (Jiang et al., 2012); 2 (Sultanpuram et al., 2015); 3 (Sorokin et al., 2008b); 4 (Blum et al., 1998); 5 (Cao et al., 2010); 6 (Sultanpuram et al., 2016a); 7 (Sultanpuram et al., 2016b); 8 (Boltyanskaya et al., 2007); 9 и 10 (McSweeney et al., 2011).

В ходе исследований был определён спектр соединений, утилизируемых штаммами в аэробных условиях, он представлен в таблице 12.

У всех штаммов семейства *Bacillaceae* единственным источником энергии и углерода могут быть лактоза, Д-ксилоза, трегалоза, сахароза, Д-манноза, Д-сорбит, L-арабиноза, рамноза, Д-целлобиоза, рибоза, крахмал, фруктоза, глюкоза, мальтоза или галактоза. Но штамм 10P не растёт на Д-ксилозе и рибозе, штамм 6G, A11 и 7A на рамнозе, штамм 7-300 и 7A не гидролизует крахмал. Также штамм A11 не использует рибозу, а штамм 7A Д-сорбит.

Рост на ацетате, лактате, цитрате и пирувате слабый или отсутствует, кроме штаммов 10P и 5P, которые проявляют активный рост на пирувате и этаноле. Штаммы 10P и 7-300 активно используют глицерин, а штамм A11 лактат.

На пептидных субстратах, таких как триптон и пептон, отмечен активный рост у всех чистых культур. Полипептидные субстраты казеин и желатин активно утилизируют бактерии 5P и 7-300. Штаммы 7G, 6G, A11 и 7A не растут на казеине, на желатине обнаружен слабый рост у штаммов 7G и 10P.

Изученные галоалкалофильные бактерии семейства *Halomonadaceae* из органических кислот используют ацетат, лактат, цитрат и этанол, штаммы 7B и 7P дополнительно используют пируват, но ни один из них не использует глицерин.

Для всех штаммов показана способность утилизировать различные сахара, а именно галактозу, глюкозу, фруктозу, рибозу, Д-целлобиозу, L-арабинозу, сахарозу и крахмал. Штамм 3B также использует Д-ксилозу и мальтозу, а штаммы 7B и 7P – Д-маннозу. Из белковых субстратов все бактерии рода *Halomonas* активно утилизируют казеин, желатин, триптон и пептон.

Таким образом, по результатам проведённых исследований показано, что в естественных условиях обитания, выделенные галоалкалофильные представители могут быть вовлечены в микробиологические процессы деструкции органического вещества.

Таблица 12. Использование субстратов выделенными бактериями

Субстраты	5P	10P	6G	7G	7-300	A11	7A	3B	7B	7P
Ацетат	±	±	-	±	-	-	-	+	+	+
Лактат	-	±	-	±	-	+	+	+	+	+
Цитрат	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Пируват	+	+	-	±	-	-	+	-	±	±
Этанол	+	+	-	±	-	-	-	+	+	+
Глицерин	+	±	-	-	+	-	±	-	-	-
Лактоза	+	+	+	±	+	+	±	-	-	-
Д-ксилоза	±	-	+	±	+	+	+	+	-	-
Трегалоза	±	±	+	±	+	+	+	-	+	+
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Д-манноза	±	±	+	±	+	+	+	-	+	+
Д-сорбит	+	±	+	±	+	+	-	-	-	-
Л-арабиноза	±	±	+	±	+	+	+	+	±	±
Рамноза	+	±	-	±	+	-	-	-	-	-
Д-целлобиоза	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
Рибоза	+	-	±	±	+	-	±	+	+	+
Крахмал	±	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Фруктоза	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	±	+	+	+	+	-	-
Галактоза	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+
Пептон	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Триптон	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Казеин	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Желатин	+	±	-	±	+	+	-	+	+	+

Примечание: «±» – отмечен слабый рост; «+» – отмечен активный рост; «-» – нет роста

3.5. Внеклеточная протеолитическая активность чистых культур и их функциональная роль

Субстратная специфичность внеклеточных пептидаз бактерий, выращенных на различных источниках белка. Исследование секреции внеклеточных пептидаз у разных видов галоалкалофильных бактерий даёт возможность выявить природные изоляты с высокой ферментативной активностью и различным спектром секретируемых внеклеточных пептидаз.

Культуральную жидкость 10 чистых культур тестировали на способность секретировать внеклеточные пептидазы, активные на различных *пара*-нитроанилидных субстратах (GlpAALpNA, GlpFpNA, GlpFApNA, BAPA и LpNA). Галоалкалофильные бактерии предварительно выращивали на различных источниках белка (казеин, пептон и триптон), поскольку активность внеклеточных пептидаз может зависеть от потребляемого субстрата.

Было выявлено, что все чистые культуры, выращенные на комплексной минеральной среде с различными белковыми добавками, проявили наибольшую активность в отношении субстрата, специфичного для аминопептидаз (LpNa). На рисунке 19 показано, что наибольшая активность достигалась при добавлении в среду в качестве белкового субстрата триптона с наибольшим значением у штаммов 7P, 7B и 3B. У остальных бактерий активность была в несколько раз ниже. Полученные данные свидетельствуют о том, что существенный вклад в протеолитическую активность галоалкалофильных бактерий, вносят аминопептидазы.

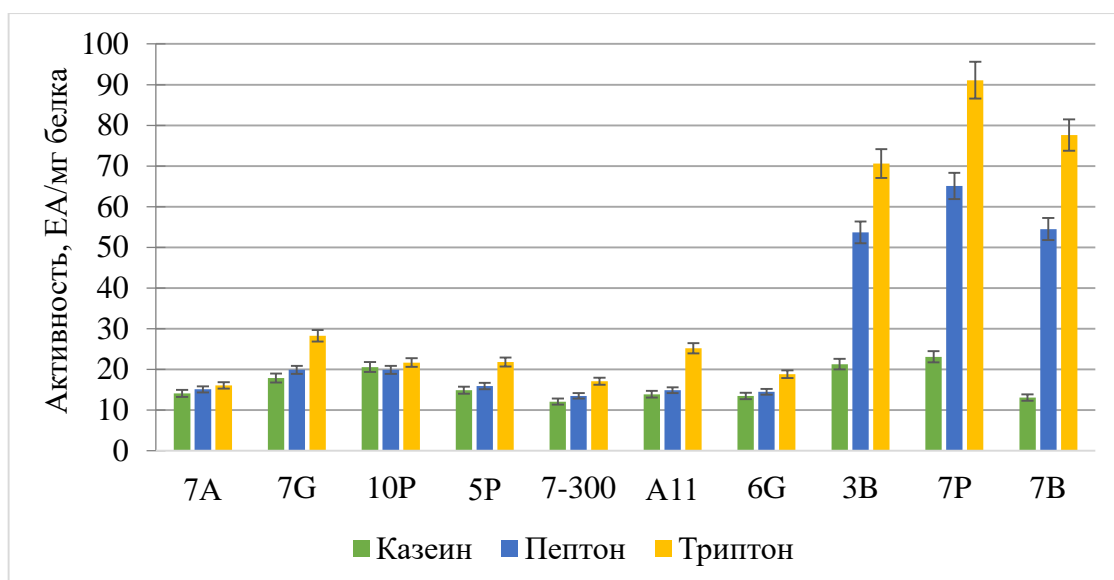


Рисунок 19. Внеклеточная протеолитическая активность чистых культур на различных источниках белка.

Частичная очистка фермента штамма *Halomonas mongoliensis* 3B. Из культуральной жидкости штамма *Halomonas mongoliensis* 3B с помощью использованных методов удалось получить частично очищенный фермент с выходом 10,72 %. Общая активность пептидаз после очистки ионообменной хроматографии составила 10,65 ЕА/мл, молекулярная масса фермента равнялась 208,9 кДа (Табл. 13).

Таблица 13. Стадии очистки пептидазы, выделенной из культуральной жидкости штамма *Halomonas mongoliensis* 3B

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, ед./мл	Удельная активность, ЕА/мг белка	Степень очистки	Выход %
Культуральная жидкость	4,98	99,60	20,00	1,00	100,00
Диализ	0,46	45,00	97,40	4,91	45,18
Ионообменная хроматография	0,09	10,65	118,30	5,92	10,72

Изучение физико-химических свойств ферментов. Было изучено влияние рН, солености и температуры на активность и стабильность внеклеточных протеолитических ферментов, гидролизующие LpNa, что имеет принципиальную важность для прикладного использования исследуемых пептидаз. Внеклеточные пептидазы были исследованы на оптимум и стабильность при различных значениях рН. Полученные данные показали, что пептидазы из всех штаммов 3В, 7Р и 7В имели оптимум активности при рН 8,5 - 9,0 и стабильность в широком диапазоне рН от 6 до 10 (Рис. 20 а, б). Высокая стабильность исследуемых аминопептидаз в щелочной области, в целом, типична для протеолитических ферментов галоалкалофильных бактерий.

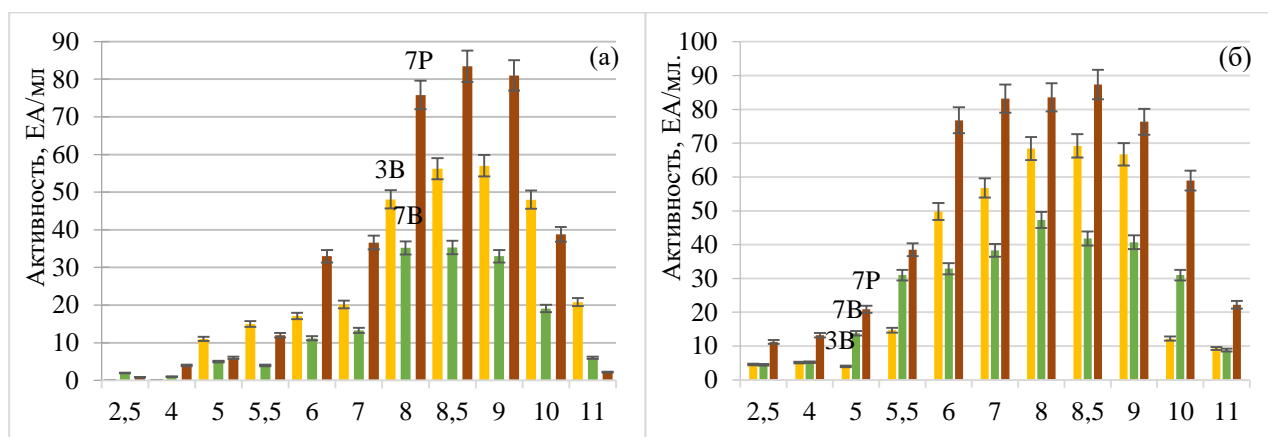


Рисунок 20 – Активность (а) и стабильность (б) внеклеточных пептидаз при различных рН штаммов 3В, 7В и 7Р.

Оптимум активности пептидаз штамма 7Р находится при минерализации 80 г/л, штаммов 7В и 3В – от 80 до 100 г/л (Рис. 21 а). Была изучена стабильность секретируемых пептидаз при различных концентрациях хлорида натрия, которая составляла от 0 до 200 г/л (Рис. 21 б).

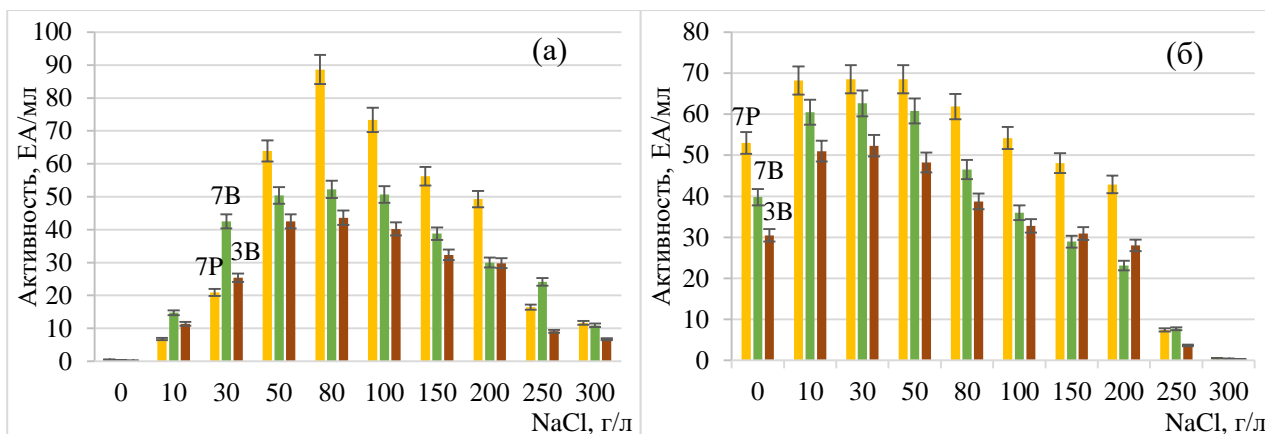


Рисунок 21. Активность (а) и стабильность (б) внеклеточных пептидаз штаммов 3В, 7В и 7Р при различных концентрациях NaCl.

Определение температурного оптимума и стабильности ферментов проведены в диапазоне 5 – 60 °С. Оптимум активности внеклеточных пептидаз штамма 7Р составил 40 °С, у штаммов 7В и 3В от 30 до 40 °С. Практически все пептидазы исследуемых культур стабильны до 50 °С (Рис. 22 а, б). Инкубирование при температуре 60 °С в течение 4 часов приводит к практически полной потере ферментативной активности.

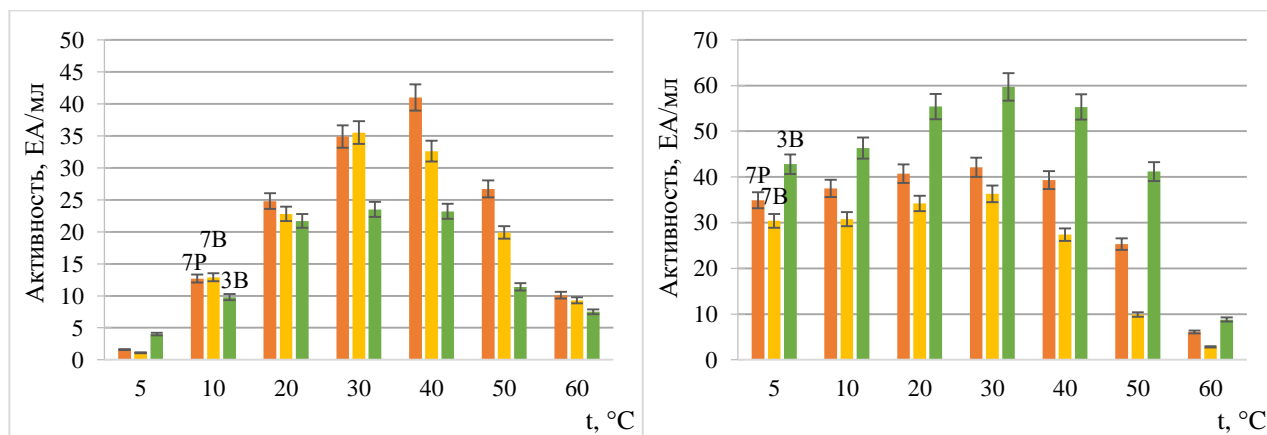


Рисунок 22. Активность (а) и стабильность (б) внеклеточных пептидаз штаммов 3В, 7В и 7Р в зависимости от температуры.

Определение природы функциональных групп активного центра.
 Определение природы функциональных групп активного центра показало, что активность внеклеточных пептидаз по субстрату LpNa у всех изученных штаммов подавлялась специфическим ингибитором металлопептидаз – EDTA (Табл. 14).

Ингибитор сериновых пептидаз – PMSF либо совсем не оказывал влияния на активность, либо подавлял активность в незначительной степени. На этом основании можно предположить, что секретируемые ферменты исследованных штаммов бактерий преимущественно содержат пептидазы, относящиеся к классу металлопептидаз.

Таблица 14. Влияние ингибиторов на активность пептидаз

Реагент	Концентрация, М	Остаточная активность пептидаз штаммов, %		
		3В	7В	7Р
контроль		100	100	100
PMSF	0,1	76,0	100	100
	0,01	87,5	100	100
EDTA	0,1	36,2	16,0	34,2
	0,01	35,7	21,6	36,3

Полученные результаты показали границы приспособляемости и функционирования выделенных бактерий в экстремальных условиях содово-соленых озёр. Способность ферментов к расщеплению белков в условиях повышенной минерализации и в щелочных условиях играет важную роль для их жизнедеятельности в содово-соленых местах обитания.

Таким образом, секретируемые пептидазы штаммов рода *Halomonas* обладают узкой субстратной специфичностью, гидролизуют белки и *para*-нитроанилиды, проявляя максимальную активность по гидролизу LpNA. Установлено, что пептидазы наиболее активны в щелочном диапазоне pH (8 - 10,0), солености (50 - 100 г/л) и термостабильны (до 50 °C). Данные ингибиторного анализа и субстратной специфичности изученных внеклеточных протеаз указывают на их принадлежность к классу металлопептидаз аминокпептидазного типа.

В настоящее время в литературе представлен ряд публикаций, где с использованием ферментативных тестов показано присутствие аминокпептидазной активности у бактерий рода *Halomonas* (In et al., 2005; Rohban et al., 2009; Kumar et al., 2012; Lourdes Moreno De et al., 2013; Anithajothi et al.,

2014). Однако исследований, посвящённых анализу активности и физико-химическим свойствам фермента, у *Halomonas* не обнаружено. Ранее сообщалось, что аминопептидазы изучены у бактерий *Streptomyces* (Uraji et al., 2007; Wu et al., 2010), *Pseudomonas* (Wu et al., 2014b), *Bacillus* (Rodríguez-Absi et al., 1978; Pavlova et al., 1989; Lei et al., 2017a) и у молочнокислых бактерий (Tchorbanov et al., 2011).

Особенность изученных нами аминопептидаз у бактерий рода *Halomonas* - это щелочистабильность и солеустойчивость. В работе (Uraji et al., 2007) показано, что пролиламинопептидаза из *Streptomyces aureofaciens* ТН-3 (ТН-ЗРАР) обладает высокой солеустойчивостью. В результате модификации, клонирования и секвенирования гена, кодирующего синтез фермента, предположили, что N-концевая конформация ответственна за солеустойчивость исследованной пептидазы.

Влияние поверхностно-активных веществ и окислителя на стабильность внеклеточных пептидаз. В дополнение к активности и стабильности при высоком рН и солености, ферменты были исследованы на устойчивость по отношению к поверхностно-активным веществам и к окислителю (перекись водорода), активность измеряли по *пара*-нитроанилидному субстрату LpNa.

Таблица 15. Стабильность щелочных пептидаз в присутствии различных детергентов

Детергент	Концентрация, %	Остаточная активность, %		
		ЗВ	7В	7Р
Triton X-100	0,5	85,4	78,4	84,4
	1	43,8	48,8	53,6
	2	31,6	30,8	56,2
	4	32,4	44,2	52,2
	6	11	11,8	12,4
SDS	0,1	68,0	74,7	77,3
	0,2	68,7	74,3	78,7
	0,4	60,0	66,7	69,3
	0,6	35,3	42,0	42,7
	0,8	29,3	26,0	24,7
H ₂ O ₂	0,5	74,6	72,4	78,2
	1	58	68,2	75
	2	37,4	35	45,2

Как показано в таблице 15, ферменты штаммов 3В, 7В и 7Р были стабильны в присутствии неионного поверхностно-активного вещества Triton X-100 при концентрации 0,5 %, при концентрации 1 % и выше активность снижалась на 50 % и больше. Сильный анионный сурфактант (SDS- лаурил сульфат натрия) в количестве от 0,1 до 0,4 % вызывал умеренное ингибирование активности от 20 до 30 % у всех штаммов, при концентрации 0,6 и 0,8 % активность падала на 60 и 70 %.

Дополнительно изучена устойчивость ферментов к отбеливанию при концентрациях перекиси водорода от 0,5 до 2 %. Пептидазы штаммов рода *Halomonas* сохранили 72 и 78 % активности после инкубации в течение 4 часов при 37°C в присутствии 0,5 % H₂O₂. При концентрации перекиси водорода в 1 % устойчивость сохранялась от 58 до 75 %. Стабильность ферментов по отношению к детергентам и окислителю является важной характеристикой их возможного использования в составе моющих средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Галоалкалофильное микробное сообщество в содово-соленых озёрах обладает рядом физиологических особенностей, обусловленных средой обитания. В результате исследования нами проведена оценка современного состояния микробных сообществ в различных озёрах пустыни Бадаин Жаран. Впервые для оценки микробного разнообразия в содово-соленых озёрах пустыни Бадаин Жаран были использованы молекулярно-генетические методы, что позволило показать разнообразие прокариот в различных экстремальных условиях окружающей среды. Результаты исследования показали, что галоалкалофильное микробное сообщество подчиняется общим принципам трофической организации микробных сообществ, имея автотрофных представителей филума *Cyanobacteria*, фототрофов класса *Alphaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria*, а также деструкторов филумов *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Rhodothermaeota*. В лагунах озёр Бадаин и Ундерту преимущественно преобладают экстремально галофильные хемоорганотрофы домена *Archaea*, для которых солёность и щёлочность были определяющими экологическими факторами для их распространения.

Следует отметить большой вклад некультивируемых представителей в составе микробных сообществ озёр пустыни Бадаин Жаран, что возможно, указывает на новые виды, которые не были описаны ранее и эндемичности изученных экосистем.

Были изучены эколого-физиологические свойства выделенных протеолитических бактерий семейства *Bacillaceae* и *Halomonadaceae*. Было показано, что они проявляют свойства умеренных и облигатных алкалофилов, оптимум рН которых находится в пределах 9 - 10, а диапазон роста от 7 до 10,5. При определении диапазона и оптимума концентрации NaCl штаммы проявили свойства умеренных, галотолерантных и экстремальных галофилов.

Полученные результаты по изучению внеклеточных пептидаз свидетельствуют о том, что исследованные штаммы обладают аминопептидазной активностью, что свидетельствует об относительно узкой субстратной специфичности пептидаз у изученных штаммов бактерий. Изученные пептидазы

штаммов рода *Halomonas* показали высокую стабильность по отношению к рН и к концентрации NaCl, что возможно позволяет им активно функционировать в условиях содово-соленых озёр пустыни Бадаин Жаран. Полученные результаты выявили границы приспособляемости и функционирования выделенных бактерий в экстремальных условиях содово-соленых озёр.

Анализ полученных данных позволил заключить, что выделенные штаммы могут быть перспективными объектами для использования при изготовлении и обработке кожи (обезволашивание шкур, смягчение кожи), в качестве детергента (удаление белковых загрязнений); в биоремедиации; в пищевой промышленности (получение белкового гидролизата, смягчение мяса и рыбы) и в сельском хозяйстве в качестве кормовой добавки.

ВЫВОДЫ

1. Высокая щелочность и соленость изученных озёр пустыни Бадаин Жаран определяет формирование галоалкалофильного микробного сообщества и способствует активной деятельности экстремальных протеолитических бактерий.

2. Таксономическое разнообразие микробных сообществ в исследуемых биотопах представлено 13 филумами доменов *Bacteria* и *Archaea*. С увеличением солености происходит смена доминирующих таксонов: в составе микробных сообществ при солености до 200 г/л доминируют филумы *Proteobacteria* и *Cyanobacteria*, до 277 г/л высокая доля филума *Bacteroidetes* и при 410 - 495 г/л преобладает филум *Euryarchaeota*.

3. Из выделенных 10 чистых культур факультативно анаэробные протеолитические бактерии относятся к умеренным, облигатным и экстремальным галоалкалофилам семейства *Bacillaceae* и *Halomonadaceae*. В отношении используемых субстратов выделенные бактерии характеризуются широкой метаболической активностью и, предположительно, в естественных условиях являются активными деструкторами органического вещества.

4. Секретируемые внеклеточные протеолитические ферменты относятся к аминопептидазам, класса металлопептидаз. Диапазон функционирования аминопептидаз при pH 6 - 10, солености 0 - 200 г/л и температуре 5 - 50 °C, что показывает границы приспособляемости выделенных бактерий в экстремальных условиях содово-соленых озёр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ai L., Huang Y., Wang C. Purification and characterization of halophilic lipase of *Chromohalobacter* sp. from ancient salt well // J. Basic Microbiol. 2018. Т. 58. № 8. С. 1–11.
2. Akbari E., Beheshti-maal K., Nayeri H. Production and Optimization of Alkaline Lipase by a Novel Psychrotolerant and Halotolerant Strain *Planomicrobium okeanokoites* ABN-IAUF-2 Isolated from Persian Gulf // Int. J. Med. Res. Heal. Sci. 2016. Т. 5. № 4. С. 139–148.
3. Amoozegar M.A., Siroosi M. Hydrolytic enzymes in halophilic bacteria, properties and biotechnological potential // Halophiles, Biodiversity and Sustainable Exploitation / под ред. D. Maheshwari, M. Saraf. New York: Springer International Publishing, 2015. С. 355–378.
4. Anil Kumar P., Srinivas T.N., Sasikala C., Ramana C.V. *Halochromatium roseum* sp. nov., a non-motile phototrophic Gammaproteobacterium with gas vesicles, and emended description of the genus *Halochromatium* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. Т. 57. № 9. С. 2110–2113.
5. Anithajothi R., Nagarania N., Umagowsalyaa G., Duraikannua K., Ramakritinan C.M. Screening, isolation and characterization of protease producing moderately halophilic microorganism *Halomonas meridiana* associated with coral mucus // Toxicol. Environ. Chem. 2014. Т. 96. № 2. С. 296–306.
6. Arahal D.R., Ventosa A. The Family *Halomonadaceae* // Prokaryotes, 2006. С. 811 – 835.
7. Baatar B. Chiang P.W., Rogozin D.Y., Wu Y.T., Tseng C.H., Yang C.Y., Chiu H.H., Oyuntsetseg B., Degermendzhy A.G., Tang S.L. Bacterial communities of three saline meromictic lakes in Central Asia // PLoS One. 2016. Т. 11. № 3. С. 1 – 22.
8. Bandaa J.F., Lua Y., Haoa C., Peia L., Dua Z., Zhanga Y., Weia P. and Dong H. The Effects of Salinity and pH on Microbial Community Diversity and Distribution Pattern in the Brines of Soda Lakes in Badain Jaran Desert, China // Geomicrobiology Journal. 2019. Т. 1 № 8. С 1 – 13.

9. Banciu H.L., Sorokin D.Y. Adaptation in Haloalkaliphiles and Natronophilic Bacteria // Polyextremophiles. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology / под ред. J. Seckbach, A. Oren, H. Stan-Lotter.: Springer, Dordrecht, 2013. С. 123–178.
10. Bardavid R.E., Mana L., Oren A. *Haloplanus natans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic, gas-vacuolate archaeon isolated from Dead Sea-Red Sea water mixtures in experimental outdoor ponds // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. T. 57. № 4. С. 780–783.
11. Bejar V., Llamas I., Calvo C., Quesada E. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina* // J. Biotechnol. 1998. T. 61. С. 135–141.
12. Boltyanskaya Y. V. Kevbrin V.V., Lysenko A. M., Kolganova T. V., Tourova T. P., Osipov G. A., Zhilina T. N. *Halomonas mongoliensis* sp. nov. and *Halomonas kenyensis* sp. nov., new haloalkaliphilic denitrifiers capable of N₂O reduction, isolated from soda lakes // Microbiology. 2007. T. 76. № 6. С. 739–747.
13. Boros E., Kolpakova M. 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 // PLoS One. 2018. T. 13. № 8. С. 1–20.
14. Brocklehurst K., Philpott M.P. Cysteine proteases: Mode of action and role in epidermal differentiation // Cell Tissue Res. 2013. T. 351. № 2. С. 237–244.
15. Burns D.G. Janssen P. H., Itoh T., Kamekura M., Li Z., Jensen G., Rodríguez-Valera F., Bolhuis H., Dyall-Smith M. L. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. T. 57. № 2. С. 387–392.
16. Cao S.-J., Qu J.-H., Yuan H.-L., Li, B.-Z. *Salsuginibacillus halophilus* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a soda lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. T. 60. № 6. С. 1339–1343.
17. Casamayor E.O., Triadó-Margarit X., Castañeda C. Microbial biodiversity in saline shallow lakes of the Monegros Desert, Spain // FEMS Microbiol. Ecol. 2013. T. 85. № 3. С. 503–518.

18. Castillo A.M. Gutiérrez M. C., Kamekura M., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D., Ventosa, A. *Halovivax ruber* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Lake Xilinhot, Inner Mongolia, China // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. T. 57. № 5. C. 1024–1027.
19. Couillard D. and Zhu S. Thermophilic aerobic process for the treatment of slaughterhouse effluents with protein recovery // *Environmental Pollution*. 1993. T. 79. №1. C. 121 – 126.
20. Charlesworth J., P. Burns B. Extremophilic adaptations and biotechnological applications in diverse environments // *AIMS Microbiol.* 2016. T. 2. № 3. C. 251–261.
21. Chen J., Zhao X., Sheng X., Dong H., Rao W., Su Z. Formation mechanisms of megadunes and lakes in the Badain Jaran Desert, Inner Mongolia // *Chinese Sci. Bull.* 2006. T. 51. № 24. C. 3026–3034.
22. Chen J.S., Li L., Wang J.Y., Barry D.A., Sheng X.F., Gu W.Z., Zhao X., Chen L. Groundwater maintains dune landscape // *Nature*. 2004. T. 432. № 25. C. 459–460.
23. Chen T., Lai Z., Liu S., Wang Y., Wang Z., Miao X., Fuyuan Y., Lupeng H. F. Luminescence chronology and palaeoenvironmental significance of limnic relics from the Badain Jaran Desert, northern China // *J. Asian Earth Sci.* 2019. T. 177. № 4. C. 240–249.
24. Chen Y.H., Lu C. W., Shyu Y. T., Lin S. S. Revealing the Saline Adaptation Strategies of the Halophilic Bacterium *Halomonas beimenensis* through High-throughput Omics and Transposon Mutagenesis Approaches // *Sci. Rep.* 2017. T. 7. № 1. C. 1–15.
25. Chróst R.J. Environmental Control of the Synthesis and Activity of Aquatic Microbial Ectoenzymes // *Microbial Enzymes in Aquatic Environments. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience* / под ред. R.J. Chróst. New York, NY: Springer, New York, NY, 1991. C. 29–59.
26. Cunha A. Almeida A., Coelho, F. J., Gomes, N. C., Oliveira V., Santos A. L. Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems // *Current Research, Technology and Education Topics in Applied*

- Microbiology and Microbial Biotechnology / под ред. A. Mendez-Vilas.:
Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 2010. C. 124–135.
27. Dawson K.S., Freeman K.H., Macalady J.L. Molecular characterization of core lipids from halophilic archaea grown under different salinity conditions // *Org. Geochem.* 2012. T. 48. № July. C. 1–8.
 28. Delgado-García M., Nicolaus B., Poli A., Aguilar C.N., Rodríguez-Herrera R. Isolation and Screening of Halophilic Bacteria for Production of Hydrolytic Enzymes // *Halophiles, Biodiversity and Sustainable Exploitation* / под ред. D. Maheshwari, M. Saraf. New York: Springer International Publishing, 2015. C. 379–401.
 29. Delgado-García M., Valdivia-Urdiales B., Aguilar-Gonzalez C.N., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez-Herrera, R. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries // *Sci. food Agric.* 2012. T. 92. № 13. C. 2575–2580.
 30. Desai J.D., Banat I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997. T. 61. № 1. C. 47–64.
 31. Ding G.W., Zhou N. Di, Tian Y.P. Over-expression of a proline specific aminopeptidase from *Aspergillus oryzae* JN-412 and its application in collagen degradation // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014. T. 173. № 7. C. 1765–1777.
 32. Dodia M.S., Rawal C.M., Bhimani H.G., Joshi R.H., Khare S.K., Singh S.P. Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated *Haloalkaliphilic bacterium* sp. AH-6 // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. T. 35. № 2. C. 121–131.
 33. Dong H., Zhang G., Jiang H., Yu B., Chapman L.R., Lucas C.R., Fields M.W. Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: Linking geochemical controls to microbial ecology // *Microb. Ecol.* 2006. T. 51. № 1. C. 65–82.
 34. Dong Z., Qian G., Lv P., Hu G. Investigation of the sand sea with the tallest dunes on Earth: China's Badain Jaran Sand Sea // *Earth-Science Rev.* 2013. T. 120. № 322. C. 20–39.
 35. Dubovskiy I.M. Grizanova E. V., Whitten M.A., Mukherjee K., Greig C., Alikina

- T., Kabilov M., Vilcinskas A., Glupov V. V., Butt T. M.. Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis* // *Virulence*. 2016. T. 7. № 8. C. 860–870.
36. Edbeib M.F., Wahab R.A., Huyop F. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016. T. 32. № 135. C. 1–23.
37. Enache M., Cojoc R., Kamekura M. Halophilic Microorganisms and Their Biomolecules: Approaching into Frame of Bio (Nano) Technologies // *Halophiles, Biodiversity and Sustainable Exploitation* / под ред. D. Maheshwari, M. Saraf. New York: Springer International Publishing, 2015. C. 161–172.
38. Erlanger B.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // *Arch. Biochem. Biophys.* / под ред. B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen. , 1961. C. 271–278.
39. Esakkiraj P., Prabakaran G., Maruthiah T., Immanuel G., Palavesam A. Purification and characterization of halophilic alkaline lipase from *Halobacillus* sp. // *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 2016. T. 86. № June. C. 309–314.
40. Eugster H., Hardie L. Eugster H., Hardie L. // *Lakes. Chemistry, Geology, Physics* / под ред. A. Lerman. , 1978. C. 237–293.
41. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. T. 2. № 6. C. 2–7.
42. Feller G., Narinx E., Arpigny J.L., Aittaleb M., Baise E., Genicot S., Gerday C. Enzymes from psychrophilic organisms // *FEMS Microbiol. Rev.* 1996. T. 18. № 1. C. 189–202.
43. Ferrer M., Guazzaroni M.E., Richter M., García-Salamanca A., Yarza P., Suárez-Suárez A., Solano J., Alcaide M., Dillewijn P., Molina-Henares M.A., López-Cortés N., Al-Ramahi Y., Guerrero C., Acosta A., Eugenio L.I., Martínez V., Marques S., Rojo F., Santero E., Genilloud O., Pérez-Pérez J., Rosselló-Móra R., Ramos J.L. Taxonomic and Functional Metagenomic Profiling of the Microbial Community in the Anoxic Sediment of a Sub-saline Shallow Lake (Laguna de

- Carrizo, Central Spain) // *Microb. Ecol.* 2011. T. 62. № 4. C. 824–837.
44. Foti M.J., Sorokin D.Y., Zacharova E.E., Pimenov N. V., Kuenen J.G., Muyzer G. Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia) // *Extremophiles*. 2008. T. 12. № 1. C. 133–145.
45. Franzetti B., Schoehn G., Hernandez J.F., Jaquinod M., Ruigrok R.W.H., Zaccai G. Tetrahedral aminopeptidase: A novel large protease complex from archaea // *EMBO J.* 2002. T. 21. № 9. C. 2132–2138.
46. Finstad K.M., Probst A.J., Thomas B.C., Gary L. Andersen G.L., Demergasso C., Echeverría A., Amundson R.G., Banfield J.F. Microbial community structure and the persistence of cyanobacterial populations in salt crusts of the hyperarid Atacama desert from genome-resolved Metagenomics // *Front. Microbiol.* 2017. T. 8. № 1. C. 1–10.
47. Gan L., Long X., Zhang H., Hou Y., Tian J., Zhang Y., Tian Y. *Halomonas saliphila* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. T. 68. № 4. C. 1153–1159.
48. Gates J.B., Edmunds W.M., Darling W.G., Ma J., Pang Z., Young A.A. Conceptual model of recharge to southeastern Badain Jaran Desert groundwater and lakes from environmental tracers // *Appl. Geochemistry*. 2008. T. 23. № 12. C. 3519–3534.
49. Gaur A., Prasad A. *Nesterenkonia* sp. an alkali-tolerant, moderate halophilic *Actinobacterium* isolated from Sambhar Salt lake // *Indian J. Appl. Microbiol.* 2016. T. 19. № 2. C. 11–19.
50. Gerasimenko L.M., Mityushina L.L., Namsaraev B.B. Microcoleus mats from alkaliphilic and halophilic communities // *Microbiology*. 2003. T. 72. № 1. C. 71–79.
51. Geyh M.A., Gu W.Z. Preliminary isotope hydrological study in the arid Gurinai grassland area // *Isotope techniques in water resources development*, International Atomic Energy Agency. Austria, 1992. C. 11–15.
52. Ghorbel B., Sellami-Kamoun A., Nasri M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1 // *Enzyme Microb. Technol.* 2003. T. 32. № 5. C. 513–518.

53. Gibtan A., Song H.S., Kim J.Y., Kim Y.B., Park N., Park K., Lee S.J., Kwon J., Roh S.W., Lee H.S. *Halorubrum aethiopicum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from commercial rock salt // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. T. 68. № 1. C. 416–422.
54. Gilbert J. Aquatic metagenome library (Archive; Expression) generation and analysis // *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* / под ред. K.N. Timmis: Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. C. 4347–4352.
55. Gong Y., Wang X., Hu B.X., Zhou Y., Hao C., Wan L. Groundwater contributions in water-salt balances of the lakes in the Badain Jaran Desert, China // *J. Arid Land.* 2016. T. 8. № 5. C. 694–706.
56. Gonzales T., Robert-baudouy J. Bacterial aminopeptidases: Properties and functions // *FEMS Microbiol. Rev.* 1996. T. 18. № 1. C. 319–344.
57. Gorlenko V.M., Bryantseva I.A., Rabold S., Tourova T.P., Rubtsova D., Smirnova E., Thiel V., Imhoff J.F. *Ectothiorhodospira variabilis* sp. nov., an alkaliphilic and halophilic purple sulfur bacterium from soda lakes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. T. 59. № 4. C. 658–664.
58. Gorlenko V.M., Buryukhaev S.P., Matyugina E.B., Borzenko S. V., Namsaraev Z.B., Bryantseva I.A., Boldareva E.N., Sorokin D.Y., Namsaraev B.B. Microbial communities of the stratified soda Lake Doroninskoe (Transbaikal region) // *Microbiology.* 2010. T. 79. № 3. C. 390–401.
59. Grant W.D. Alkaline environments and biodiversity // *Extremophiles. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO* / под ред. C. Gerday, N. Glansdorff. Oxford, UK: UNESCO, Eolss, 2009. C. 1–20.
60. Grant W.D. Introductory Chapter: Half a Lifetime in Soda Lakes // *Halophilic Microorganisms.* Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. C. 17–31.
61. Grant W.D., Jones B.E. Bacteria, Archaea and Viruses of Soda Lakes // *Soda Lakes of East Africa* / под ред. M. Schagerl. : Springer, Cham, 2016. C. 97–147.
62. Grant W.D., Mills A.A., Schofield A.K. An Alkaliphilic Species of *Ectothiorhodospira* from a Kenyan Soda Lake // *J. Gen. Microbiol.* 1979. № 110.

- C. 137–142.
63. Grant W.D., Sorokin D.Y. Distribution and Diversity of Soda Lake Alkaliphiles // *Extremophiles Handbook* / под ред. К. Horikoshi и др. New York: Springer, 2011. С. 27–54.
 64. Gutiérrez M.C., Castillo A.M., Kamekura M., Xue Y., Ma Y., Cowan D.A., Jones B.E., Grant W.D., Ventosa A. *Halopiger xanaduensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from saline Lake Shangmatale in Inner Mongolia, China // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. Т. 57. № 7. С. 1402–1407.
 65. He S.T., Zhi X.Y., Jiang H., Yang L.L., Wu J.Y., Zhang Y.G., Hozzein W.N., Li W.J. Biogeography of *Nocardiopsis* strains from hypersaline environments of Yunnan and Xinjiang Provinces, western China // *Sci. Rep.* 2015. Т. 5. № August. С. 1–10.
 66. Hofmann J. The lakes in the SE part of the Badain Jaran Shamo, their limnology and geochemistry // *Geowissenschaften.* 1996. Т. 7. № 14. С. 275–278.
 67. Huang W. Q., Zhong L. F., Meng Z. Z., You Z. J., Li J. Z., Luo X. C. The Structure and Enzyme Characteristics of a Recombinant Leucine Aminopeptidase rLap1 from *Aspergillus sojae* and Its Application in Debittering // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015. Т. 177. № 1. С. 190–206.
 68. Ibrahim A.S.S., Al-Salamah A. A., Elbadawi Y. B., El-Tayeb M. A., Shebl Ibrahim S. S. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes // *Electron. J. Biotechnol.* 2015. Т. 18. № 3. С. 236–243.
 69. Imhoff J.F., Tindall B.J., Grant W.D., Trifiper H.G. *Ectothiorhodospira vacuolata* sp. nov., a New Phototrophic Bacterium from Soda Lakes // *Arch Microbiol.* 1981. Т. 130. № 130. С. 238–242.
 70. In M., Oh N., Kim D.C. Article Partial Purification and Characterization of Halotolerant Alkaline Protease from *Halomonas marisflava* KCCM 10457 Isolated from Salt-fermented Food // *Agric. Chem. Biotechnol.* 2005. Т. 48. № 2. С. 75–78.
 71. Itoh T., Yamaguchi T., Zhou P., Takashina T. *Natronolimnobius baerhuensis* gen. nov., sp. nov. and *Natronolimnobius innermongolicus* sp. nov., novel

- haloalkaliphilic archaea isolated from soda lakes in Inner Mongolia, China // *Extremophiles*. 2005. T. 9. № 2. C. 111–116.
72. Jiang F., Cao S. J., Li Z. H., Fan H., Li H. F., Liu W. J., Yuan H. L. *Salisediminibacterium halotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic bacterium from soda lake sediment // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. T. 62. № 9. C. 2127–2132.
73. Jiang J. и др. *Halomonas songnenensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline and alkaline soils // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. T. 64. № 5. C. 1662–1669.
74. Jones B.E., Pan Y., Hu S., Zhang X., Hu B., Huang H., Hong S., Meng J., Li C., Wang K. Microbial diversity of soda lakes // *Extremophiles*. 1998. T. 2. № 3. C. 191–200.
75. Jones B.E., Grant W.D. Microbial diversity and ecology of the Soda Lakes of East Africa // *Ecol. Divers. Extrem.* 1999. C. 1–7.
76. Jones B.E., Grant W.D. Microbial Diversity and Ecology of Alkaline Environments // *Journey to Divers. Microb. Worlds*. 2000. T. 2. C. 177–190.
77. Joshi G.K., Kumar S., Sharma V. Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 isolated from lake Nainital, Uttaranchal State, India // *Brazilian J. Microbiol.* 2007. T. 38. № 4. C. 773–779.
78. Kalisz H.M. *Microbial proteinases*: Springer, Berlin, Heidelberg, 1988. 1–65 c.
79. Kamekura M., Dyall-Smith M.L. Diversity of Alkaliphilic Halobacteria: Proposals for Transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., Respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 2009. T. 47. № 3. C. 853–857.
80. Kamekura M., Dyall-Smith M.L. Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba* // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1995. T. 41. № 4. C. 333–350.
81. Kanekar P., Deshmukh S., Kanekar S., Dhakephalkar P., Ranjekar P.

- Exopolysaccharides of halophilic microorganisms: an overview // Industrial biotechnology: sustainable production and bioresource utilization/edited by / под ред. D. Thangadurai, J. Sangeetha. Oakville, Canada: , 2017. C. 1–26.
82. Karray F., Abdallah B.M., Kallel N., Hamza M., Fakhfakh M., Sayadi S. Extracellular hydrolytic enzymes produced by halophilic Bacteria and Archaea isolated from hypersaline lake // Mol. Biol. Rep. 2018. T. 45. № 5. C. 1297–1309.
83. Keybrin V.V. Isolation and Cultivation of Alkaliphiles // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2019. T. 84. № 4. C. 127–141.
84. Khobragade K., Pawar V.B. Physico - chemical studies of Lonar lake, Maharashtra, India // Bioinfolet. 2016. T. 13. № 2B. C. 406–408.
85. Kixmüller D., Greie J.C. An ATP-driven potassium pump promotes long-term survival of *Halobacterium salinarum* within salt crystals // Environ. Microbiol. Rep. 2012. T. 4. № 2. C. 234–241.
86. Kocur M., Hodgkiss W. Taxonomic Status of the Genus Halococcus Schoop // Int. J. Syst. Bacteriol. 1973. T. 23. № 2. C. 151–156.
87. Koh H.W., Rani S., Kim S. J., Moon E., Nam S. W., Rhee S. K., Park S. J. *Halomonas aestuarii* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a tidal flat // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. T. 67. № 11. C. 4298–4303.
88. Kopejtká K., Tomasch J., Bunk B., Spröer C., Wagner-Döbler I., Koblížek M. The complete genome sequence of *Rhodobaca barguzinensis* alga05 (DSM 19920) documents its adaptation for life in soda lakes // Extremophiles. 2018. T. 22. № 6. C. 839–849.
89. Kulkarni S., Dhakar K., Joshi A. Alkaliphiles: Diversity and Bioprospection // Microbial Diversity in the Genomic Era. : Elsevier Inc., 2019. C. 239–263.
90. Kumar R.M., Kaur G., Kumar A., Bala M., Singh N.K., Kaur N., Kumar N., Mayilraj S. Taxonomic description and genome sequence of *Bacillus campisalis* sp. nov., a member of the genus *Bacillus* isolated from a solar saltern // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. T. 65. № 10. C. 3235–3240.
91. Kumar S., Karan R., Kapoor S., Singh S. P., Khare S. K. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes // Brazilian J.

- Microbiol. 2012. T. 43. № 4. C. 1595–1603.
92. Lei F., Zhao Q., Sun-Waterhouse D., Zhao M. Characterization of a salt-tolerant aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 that improves hydrolysis and debittering efficiency for soy protein isolate // Food Chem. 2017a. T. 214. № 1. C. 347–353.
 93. Lei F., Zhao Q., Lin L., Sun B., Zhao M. Evaluation of the Hydrolysis Specificity of an Aminopeptidase from *Bacillus licheniformis* SWJS33 using synthetic peptides and Soybean protein isolate // J. Agric. Food Chem. 2017b. T. 65. № 1. C. 167–173.
 94. Leuschner C., Antranikian G. Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms // World J. Microbiol. Biotechnol. 1995. T. 11. № 1. C. 95–114.
 95. Li J., Peng X., Zhou H., Li J., Sun Z. Molecular evidence for microorganisms participating in Fe, Mn, and S biogeochemical cycling in two low-temperature hydrothermal fields at the Southwest Indian Ridge // J. Geophys. Res. Biogeosciences. 2013. T. 118. № 2. C. 665–679.
 96. Li Q., Sun B., Li X., Xiong K., Xu Y., Yang R., Hou J., Teng C. Improvement of the catalytic characteristics of a salt-tolerant GH10 xylanase from *Streptomyces rochei* L10904 // Int. J. Biol. Macromol. 2018. T. 107. № B. C. 1447–1455.
 97. Li X., Wang H. L., Li T., Yu H. Y. Characterization of an organic solvent-tolerant α -amylase from a halophilic isolate, *Thalassobacillus* sp. LY18 // Biotechnol Lett. 2012. № 34. C. 1531–1536.
 98. Li X., Yu H., Lin Y. Purification and characterization of an extracellular esterase from a moderately halophilic bacterium, *Halobacillus* sp. strain LY5 // African J. Biotechnol. 2012. T. 11. № 23. C. 6327–6334.
 99. Liu J., Xue Y., Wang Q., Wei Y., Swartz T. H., Hicks D. B., Ito M., Ma Y., Krulwich T. A. The activity profile of the NhaD-type $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ antiporter from the soda lake haloalkaliphile *Alkalimonas amylolytica* is adaptive for the extreme environment // J. Bacteriol. 2005. T. 187. № 22. C. 7589–7595.
 100. Lourdes Moreno M. De, Pérez D., García M., Mellado E. Halophilic bacteria as a

- source of novel hydrolytic enzymes // *Life*. 2013. T. 3. № 1. C. 38–51.
101. Li L., Chunbo H., Wang L., Pei L. Microbial diversity of salt lakes in Badain Jaran desert // *Acta Microbiol. Sin.* 2015. T. 55. № April. C. 412–424.
102. Ma J., Edmunds W.M. Groundwater and lake evolution in the Badain Jaran Desert ecosystem, Inner Mongolia // *Hydrogeol. J.* 2006. T. 14. № 7. C. 1231–1243.
103. Ma Y., Zhang W., Xue Y., Zhou P., Ventosa A., Grant W. D. Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lake as revealed by 16S rRNA gene sequence analyses // *Extremophiles*. 2004. T. 8. № 1. C. 45–51.
104. Malekabadi S., Badoei-dalfard A., Karami Z. Biochemical characterization of a novel cold active, halophilic and organic solvent-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. T. 109. № 1. C. 389–398.
105. Margesin R., Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology // *Extremophiles*. 2001. № 5. C. 73–83.
106. Márquez M.C., Carrasco I.J., Xue Y., Ma Y., Cowan D.A., Jones B.E., Grant W.D., Ventosa A. *Aquisalimonas asiatica* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from an alkaline, saline lake in Inner Mongolia, China // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. T. 57. № 5. C. 1137–1142.
107. Marteinson V.T., Bjornsdottir S.H., Bienvenu N., Kristjansson J.K., Birrien J.L. *Rhodothermus profundus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Pacific Ocean // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. T. 60. № 12. C. 2729–2734.
108. Maruthiah T., Somanath B., Immanuel G., Palavesam A. Deproteinization potential and antioxidant property of haloalkalophilic organic solvent tolerant protease from marine *Bacillus* sp. APCMST-RS3 using marine shell wastes // *Biotechnol. Reports*. 2015. T. 8. C. 124–132.
109. Mata J.A., Martínez-Cánovas J., Quesada E., Béjar V. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. // *Syst. Appl. Microbiol.* 2002. T. 25. № 3. C. 360–375.
110. Mathews A.S., Abraham S., Kumaran S.K., Fan J., Montemagno C. Bio nano ink

- for 4D printing membrane proteins // RSC Adv. 2017. T. 7. № 66. C. 41429–41434.
111. McInerney M.J., Javaheri M., Nagle D.P. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2 // J. Ind. Microbiol. 1990. T. 5. № 2. C. 95–102.
112. McSweeney N.J., Plumb J.J., Tilbury A.L., Nyeboer H.J., Sumich M.E., McKinnon A.J., Franzmann P.D., Sutton D.C., Kaksonen A.H. Comparison of microbial communities in pilot-scale bioreactors treating Bayer liquor organic wastes // Biodegradation. 2011. T. 22. № 2. C. 397–407.
113. Mendez Y., Perez-Labrada K., Gonzelez-Bacerio J., Valdes G., Chavez M.A. de los, Osuna J., Charli J.-L., Pascual I., Rivera D.G. Combinatorial Multicomponent Access to Natural-Products-Inspired Peptidomimetics: Discovery of Selective Inhibitors of Microbial Metallo-aminopeptidases // ChemMedChem. 2014. T. 9. № 10. C. 2351–2359.
114. Meng L., Hong S., Liu H., Huang H., Sun H., Xu T., Jiang J. Cloning and identification of Group 1 mrp operon encoding a novel monovalent cation/proton antiporter system from the moderate halophile *Halomonas zhaodongensis* // Extremophiles. 2014. T. 18. № 6. C. 963–972.
115. Menon G., Mody K., Keshri J., Jha B. Isolation, Purification, and Characterization of Haloalkaline Xylanase from a Marine *Bacillus pumilus* strain, GESF-1 // Biotechnol. Bioprocess Eng. 15. 2010. T. 15. № 6. C. 998–1005.
116. Mering C. V., Hugenholtz P., Raes J., Tringe S.G., Doerks T., Jensen L.J., Ward N., Bork P. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments // Science (80), 2007. T. 315. № 5815. C. 1126–1130.
117. Mevarecha M., Frolowa F., Gloss L.M. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt // Biophys. Chem. 2000. T. 86. № 1. C. 155–164.
118. Mianping Z., Tang J., Liu J., Fasheng Z. Chinese saline lakes // Hydrobiologia. 1993. T. 267. № 23. C. 23–36.
119. Minegishi H., Echigo A., Shimane Y., Kamekura M., Tanasupawat S., Visessanguan W., Usami R. *Halobacterium piscisalsi* is a later heterotypic

- synonym of *Halobacterium salinarum* Elazari-Volcani 1957 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. T. 62. № 9. C. 2160–2162.
120. Mokashe N., Chaudhari B., Patil U. Detergent-Compatible robust alkaline protease from newly isolated halotolerant *Salinicoccus* sp. UN-12 // J. Surfactants Deterg. 2017. T. 20. № 6. C. 1377–1393.
121. Mokashe N., Chaudhari B., Patil U. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector // Int. J. Biol. Macromol. 2018. T. 117. № 1. C. 493–522.
122. Motitschke L., Driller H., Galinski E. Ectoin and ectoin derivatives as moisturizers in cosmetics // 2000. T. 1. № 19.
123. Mulder E.G., Deinema M.H. The Genus *Haliscomenobacter* // Prokaryotes / под ред. М. Dworkin и др. New York: Springer, 2006. C. 602–604.
124. Munoz R., Rosselló-Móra R., Amann R. Revised phylogeny of *Bacteroidetes* and proposal of sixteen new taxa and two new combinations including *Rhodothermaeota* phyl. nov. // Syst. Appl. Microbiol. 2016. T. 39. № 5. C. 281–296.
125. Naghoni A. и др. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran // Sci. Rep. 2017. T. 7. № 1. C. 1–13.
126. Nandan A., Nampoothiri K.M. Molecular advances in microbial aminopeptidases // Bioresour. Technol. 2017a. T. 245. № B. C. 1757–1765.
127. Nandan A., Nampoothiri K.M. Microbial Aminopeptidases. : Elsevier B.V., 2017b. 491–507 с.
128. Neilson J.W., Quade J., Ortiz M., Nelson W.M., Legatzki A., Tian F., LaComb M., Betancourt J.L., Wing R.A., Soderlund C.A., Maier R.M. Life at the hyperarid margin: Novel bacterial diversity in arid soils of the Atacama Desert, Chile // Extremophiles. 2012. T. 16. № 3. C. 553–566.
129. Oremland R.S. Nitrogen fixation dynamics of two diazotrophic communities in Mono Lake, California // Appl. Environ. Microbiol. 1990. T. 56. № 3. C. 614–622.
130. Oren A., Weisburg W. G., Kessel M., Woese C. R. *Halobacteroides halobius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic anaerobic bacterium from the Bottom

- Sediments of the Dead Sea // Syst. Appl. Microbiol. 1984. T. 5. № 1. C. 58–70.
131. Oren A., Gurevich P., Gemell R. T., Teske A. *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic Archaeon from the Dead Sea // Int. J. Syst. Bacteriol. 1995. T. 45. № 4. C. 747–754.
132. Oren A. Salinibacter: An extremely halophilic bacterium with archaeal properties // FEMS Microbiol. Lett. 2013. T. 342. № 1. C. 1–9.
133. Oren A., Arahall D.R., Ventosa A. Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. T. 59. № 3. C. 637–642.
134. Pagaling E., Wang H., Venables M., Wallace A., Grant W.D., Cowan D.A., Jones B.E., Ma Y., Ventosa A., Heaphy S. Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina // Appl. Environ. Microbiol. 2009. T. 75. № 18. C. 5750–5760.
135. Park S., Song J., Yoshizawa S., Choi A., Cho J.C., Kogure K. *Rubrivirga marina* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Rhodothermaceae* isolated from deep seawater // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. T. 63. № PART6. C. 2229–2233.
136. Pavlova I.N., Rotanova T.V., Zholne L.G. Aminopeptidase from a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis* // Mikrobiol. Zh. 1989. T. 51. № 2. C. 47–52.
137. Pérez Bernal M.F., Brito E. M. S., Bartoli M., Aubé J., Fardeau M. L., Rodriguez G. C., Ollivier B., Guyoneaud R., Hirschler-Réa A. *Desulfonatronum parangueonense* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from sediment of an alkaline crater lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. T. 67. № 12. C. 4999–5005.
138. Pikuta E.V., Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Kostrikina N.A., Osipov G.A., Rainey F.A. *Desulfonatronum lacustre* gen. nov., sp. nov.: a new alkaliphilic sulfate-reducing bacterium utilizing ethanol // Mikrobiologiya. 1998. T. 67. № 1. C. 123–131.
139. Porciero S., Receveur-Bréchet V., Mori K., Franzetti B., Roussel A. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a deblocking aminopeptidase from *Pyrococcus horikoshii* // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 2005. T. 61. № 2. C. 239–242.

140. Poser A., Lohmayer R., Vogt C., Knoeller K., Planer-Friedrich B., Sorokin D., Richnow H.H., Finster K. Disproportionation of elemental sulfur by haloalkaliphilic bacteria from soda lakes // *Extremophiles*. 2013. T. 17. № 6. С. 1003–1012.
141. Pujalte M.J., Lucena T., Ruvira M.A., Arahall D.R., Macian M.C. The Family *Rhodobacteraceae* // *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* / под ред. E. Rosenberg и др. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. С. 439–512.
142. Purohit M.K., Raval V.H., Singh S.P. Haloalkaliphilic bacteria: molecular diversity and biotechnological applications // *Geomicrobiology and Biogeochemistry* / под ред. N. Parmar, A. Singh. : Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. С. 61–79.
143. Purohit M.K., Singh S.P. Comparative analysis of enzymatic stability and amino acid sequences of thermostable alkaline proteases from two haloalkaliphilic bacteria isolated from Coastal region of Gujarat, India // *Int. J. Biol. Macromol.* 2011. T. 49. № 1. С. 103–112.
144. Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. and, Deshpande V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. T. 62. № 3. С. 597–635.
145. Rasuk M.C. и др. Bacterial Diversity in Microbial Mats and Sediments from the Atacama Desert // *Microb. Ecol.* 2016. T. 71. № 1. С. 44–56.
146. Raval V. H., Pillai S., Rawal C. M., Singh S. P. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria // *Process Biochem.* 2014. T. 49. № 6. С. 955–962.
147. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. Asparagine Peptide Lyases. A seventh catalytic type of proteolytic enzymes // *J. Biol. Chem.* 2011. T. 286. № 44. С. 38321–38328.
148. Rawlings N.D., Salvesen G. *Handbook of Proteolytic Enzymes Volume 1* / под ред. N.D. Rawlings, G. Salvesen. India: Elsevier Ltd., 2013. 984 с.
149. Rioual P., Lu Y., Yang H., Scuderi L., Chu G., Holmes J., Zhu B., Yang X.

- Diatom-environment relationships and a transfer function for conductivity in lakes of the Badain Jaran Desert, Inner Mongolia, China // *J. Paleolimnol.* 2013. T. 50. № 2. C. 207–229.
150. Rodríguez-Absi, J., Prescott J.M. Isolation and properties of an aminopeptidase from *Bacillus licheniformis* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1978. T. 186. № 2. C. 383–391.
151. Rohban R., Amoozgar M.A., Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009. T. 36. № 3. C. 333–340.
152. Ruiz D.M., Paggi R.A., Giménez M.I., Castro R.E. De. Autocatalytic maturation of the tat-dependent halophilic subtilase nep produced by the archaeon *Natrialba magadii* // *J. Bacteriol.* 2012. T. 194. № 14. C. 3700–3707.
153. Samylina O.S., Sapozhnikov F. V., Gainanova O.Y., Ryabova A. V., Nikitin M.A., Sorokin D.Y. Algo-bacterial communities of the Kulunda steppe (Altai Region, Russia) Soda Lakes // *Microbiology.* 2014. T. 83. № 6. C. 849–860.
154. Sauer T., Galinski E.A. Bacterial Milking: A Novel bioprocess for production of compatible solutes // *Biotechnol. Bioeng.* 1998. T. 57. № 3. C. 306–313.
155. Savage K.N., Krumholz L.R., Oren A., Elshahed M.S. *Halosarcina pallida* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon from a low-salt, sulfide-rich spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. T. 58. № 4. C. 856–860.
156. Schagerl M., Renaut R.W. Dipping into the Soda Lakes of East Africa // *Soda Lakes of East Africa* / под ред. M. Schagerl.: Springer International Publishing, 2016. Вып. 1. C. 3–24.
157. Schink B., Munos R. The Family *Syntrophomonadaceae* // *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes* / под ред. E. Rosenberg и др. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. C. 1–567.
158. Schulze-Makuch D., et al. Transitory microbial habitat in the hyperarid Atacama Desert // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018. T. 115. № 11. C. 2670–2675.
159. Setati M.E. Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria // *African J. Biotechnol.* 2010. T. 9. № 11. C.

- 1555–1560.
160. Shimane Y., Hatada Y., Minegishi H., Mizuki T., Echigo A., Miyazaki M., Ohta Y., Usami R., Grant W.D., Horikoshi K. *Natronoarchaeum mannanilyticum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic archaeon isolated from commercial salt // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. T. 60. № 11. C. 2529–2534.
 161. Siddiqui K.S., Cavicchioli R. Cold adapted enzymes // *Annu. Rev. Biochem.* 2006. T. 75. № 1. C. 403–433.
 162. Sierra E. M., Pereira M. R., Maester T. C., Gomes-Pepe E. S., Mendoza E. R., Lemos E. G. Halotolerant aminopeptidase M29 from *Mesorhizobium SEMIA 3007* with biotechnological potential and its impact on biofilm synthesis // *Sci. Rep.* 2017. T. 7. № 1. C. 1–14.
 163. Silva R., Oliveira A.H., Oliveira L., Caetano R., Okamoto D., Bertolin T., Rosae J., Juliano M., Cabral H., Juliano L. The identification and biochemical properties of the catalytic specificity of a serine peptidase secreted by *Aspergillus fumigatus fresenius* // *Protein Pept. Lett.* 2014. T. 21. № 7. C. 663–671.
 164. Silva R.R. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017. T. 183. № 1. C. 1–19.
 165. Singh P., Cameotra S.S. Potential applications of nanoshells in biomedical sciences // *J. Drug Target.* 2004. T. 22. № 3. C. 142–146.
 166. Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce // *Food Chem.* 2010. T. 119. № 2. C. 573–579.
 167. Soliman G.S.H., Trueper H.G. *Halobacterium pharaonis* sp. nov., a new, extremely haloalkaliphilic archaebacterium with low magnesium requirement // *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abteilung, Originalien, Allgemeine und Ökologische Mikrobiologie.* 1982. T. 3. № 2. C. 318–329.
 168. Sorokin D. Y., Gorlenko V. M., Namsaraev B. B., Namsaraev Z. B., Lysenko A. M., Eshinimaev B. T., Khmelenina V. N., Trotsenko Y. A., Kuenen J. G. Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian soda lakes // *Hydrobiologia.* 2004. T. 522. № 1–3. C. 235–248.

169. Sorokin D.Y., Foti M., Pinkart H.C., Muyzer G. Sulfur-oxidizing bacteria in Soap Lake (Washington State), a meromictic, haloalkaline lake with an unprecedented high sulfide content // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. T. 73. № 2. C. 451–455.
170. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Sukhacheva M. V., Mardanov A. V., Ravin N. V. Bacterial chitin utilisation at extremely haloalkaline conditions // *Extremophiles.* 2012a. T. 16. № 6. C. 883–894.
171. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Panteleeva A. N., Muyzer G. *Desulfonatronobacter acidivorans* gen. nov., sp. nov. and *Desulfobulbus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012b. T. 62. № 9. C. 2107–2113.
172. Sorokin D. Y., Berben T., Melton E. D., Overmars L., Vavourakis C. D., Muyzer G. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes // *Extremophiles.* 2014a. T. 18. № 5. C. 791–809.
173. Sorokin D. Y., Abbas B., Tourova T. P., Bumazhkin B. K., Kolganova T. V., Muyzer G. Sulfate-dependent acetate oxidation under extremely natron-alkaline conditions by syntrophic associations from hypersaline soda lakes // *Microbiology.* 2014b. T. 160. C. 723–732.
174. Sorokin D.Y., Banciu H.L., Muyzer G. Functional microbiology of soda lakes // *Curr. Opin. Microbiol.* 2015. T. 25. C. 88–96.
175. Sorokin D.Y., Chernyh N.A. *Desulfonatronospira sulfatiphila* sp. nov., and *Desulfitispora elongata* sp. nov., two novel haloalkaliphilic sulfidogenic bacteria from soda lakes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. T. 67. № 2. C. 396–401.
176. Sorokin I. D., Kravchenko I. K., Tourova T. P., Kolganova T. V., Boulygina E. S., Sorokin D. Y. *Bacillus alkalidiazotrophicus* sp. nov., a diazotrophic, low salt-tolerant alkaliphile isolated from Mongolian soda soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008a. T. 58. № 10. C. 2459–2464.
177. Sorokin I. D., Zadorina E. V., Kravchenko I. K., Boulygina E. S., Tourova T. P., Sorokin D. Y. *Natronobacillus azotifigens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic diazotrophic haloalkaliphile from soda-rich habitats // *Extremophiles.* 2008b. T. 12. № 6. C. 819–827.

178. Souza P.M., Bittencourt M.L. A., Caprara C.C., Freitas M., Almeida R.P.C., Silveira D., Fonseca Y.M., Filho E.X.F., Junior A.P., Magalhães P.O. A biotechnology perspective of fungal proteases // *Brazilian J. Microbiol.* 2015. T. 46. № 2. C. 337–346.
179. Sultanpuram V. R., Chintalapati V. R., Chintalapati S., Mothe T. *Pelagirhabdus alkalitolerans* gen. nov., sp. nov., an alkali-tolerant and thermotolerant bacterium isolated from beach sediment, and reclassification of *Amphibacillus fermentum* as *Pelagirhabdus fermentum* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. T. 66. № 1. C. 84–90.
180. Sultanpuram V.R., Mothe T. *Salipaludibacillus aurantiacus* gen. nov., sp. nov. a novel alkali tolerant bacterium, reclassification of *Bacillus agaradhaerens* as *Salipaludibacillus agaradhaerens* comb. nov. and *Bacillus neizhouensis* as *Salipaludibacillus neizhouensis* comb. nov // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. T. 66. № 7. C. 2747–2753.
181. Sultanpuram V.R., Mothe T., Mohammed F. *Salisediminibacterium haloalkalitolerans* sp. nov., isolated from Lonar soda lake, India, and a proposal for reclassification of *Bacillus locisalis* as *Salisediminibacterium locisalis* comb. nov., and the emended description of the genus *Salisediminibacteriu* // *Arch. Microbiol.* 2015. T. 197. № 4. C. 553–560.
182. Switzer Blum J., Burns Bindi A., Buzzelli J., Stolz J. F., Oremland R. S. *Bacillus arsenicoselenatis* sp. nov. and *Bacillus selenitireducens* sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. // *Arch. Microbiol.* 1998. T. 171. № 1. C. 19–30.
183. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4 . 0 // *Mol. Biol. Evol.* 2007. T. 24. № 8. C. 1596–1599.
184. Tan D., Xue Y. S., Aibaidula G., Chen G. Q. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01 // *Bioresour. Technol.* 2011. T. 102. № 17. C. 8130–8136.
185. Tank M., Thiel V., Imhoff J.F. Phylogenetic relationship of phototrophic purple

- sulfur bacteria according to *pufL* and *pufM* genes // *Int. Microbiol.* 2009. T. 12. № 3. C. 175–185.
186. Tchorbanov B., Marinova M., Grozeva L. Debittering of protein hydrolysates by *Lactobacillus* LBL-4 Aminopeptidase // *Enzyme Res.* 2011. T. 2011. C. 1–7.
187. Thaz C.J., Jayaraman G. Stability and detergent compatibility of a predominantly β -sheet serine protease from halotolerant *B. aquimaris* VITP4 strain // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014. T. 172. № 2. C. 687–700.
188. Thomas C. P., Duvall M. L., Robertson E. P., Barrett K. B., Bala G. A. Surfactant-Based EOR Mediated by Naturally Occurring Microorganisms // *SPE Reserv. Eng.* 1993. T. 8. № 04. C. 285–291.
189. Thorpe C. L., Morris K., Boothman C., Lloyd J. R. Alkaline Fe(III) reduction by a novel alkali-tolerant *Serratia* sp. isolated from surface sediments close to Sellafield nuclear facility, UK // *FEMS Microbiol. Lett.* 2012. T. 327. № 2. C. 87–92.
190. Tindall B.J., Mills A.A., Grant W.D. An alkalophilic red halophilic bacterium with a low magnesium requirement from a Kenyan Soda Lake // *Microbiology.* 2009. T. 116. № 1. C. 257–260.
191. Tindall B.J., Ross H.N.M., Grant W.D. *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov. Two New Genera of haloalkaliphilic *Archae* bacteria // *Syst. Appl. Microbiol.* 1984. T. 5. № 1. C. 41–57.
192. Torreblanca M. и др. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* 1986. T. 8. № 1–2. C. 89–99.
193. Tourova T. P., Slobodova N. V., Bumazhkin B. K., Kolganova T. V., Muyzer G., Sorokin D. Y. Analysis of community composition of sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline and soda lakes using *soxB* as a functional molecular marker // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013. T. 84. № 2. C. 280–289.
194. Tursunov O., Dobrowolski J., Nowak W. Catalytic Energy Production from Municipal Solid Waste Biomass: Case Study in Perlis-Malaysia // *World Journal of Environmental Engineering.* – 2015. – V. 3, № 1. – C. 7-14.

195. Upasani V., Desai S. Sambhar Salt: Lake Chemical composition of the brines and studies on haloalkaliphilic archae bacteria // Arch. Microbiol. 1990. T. 154. № 6. C. 589–593.
196. Uraji M., Arima J., Uesugi Y., Iwabuchi M., Hatanaka T. Effect of salt on the activity of *Streptomyces prolyl aminopeptidase* // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 2007. T. 1774. № 11. C. 1462–1469.
197. Ventosa A., Nieto J.J. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms // World J. Microbiol. Biotechnol. 1995. T. 11. № 1. C. 85–94.
198. Ventosa A., Nieto N.J., Oren A. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. T. 62. № 2. C. 504–544.
199. Vsevolodov N.N., Dyukova T. V. Retinal-protein complexes as optoelectronic components // Trends Biotechnol. 1994. T. 12. № 3. C. 81–88.
200. Wang F., Sun D., Chen F., Bloemendal J., Guo F., Li Z., Zhang Y., Li B., Wang X. Formation and evolution of the Badain Jaran Desert, North China, as revealed by a drill core from the desert centre and by geological survey // Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 2015a. T. 426. № May. C. 139–158.
201. Wang G., Tang M., Li T., Dai S., Wu H., Chen C., He H., Fan J., Xiang W., Li X. *Wenzhouxiangella marina* gen. nov, sp. nov, a marine bacterium from the culture broth of *Picochlorum* sp. 122, and proposal of *Wenzhouxiangellaceae* fam. nov. in the order *Chromatiales* // Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 2015b. T. 107. № 6. C. 1625–1632.
202. Ward O.P., Rao M.B., Kulkarni A. Proteases, Production // Encycl. Microbiol. 2009. C. 495–511.
203. Williams W.D. Environmental threats to salt lakes and the likely status of inland saline ecosystems in 2025 // Environ. Conserv. 2002. T. 29. № 2. C. 154–167.
204. Wu B., Shi P., Li J., Wang Y., Meng K., Bai Y., Luo H., Yang P., Zhou Z., Yao B. A new aminopeptidase from the keratin-degrading strain *Streptomyces fradiae* var. *k11* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. T. 160. № 3. C. 730–739.
205. Wu X., Wang X. S., Wang Y., Hu B. X. Origin of water in the Badain Jaran Desert, China: New insight from isotopes // Hydrol. Earth Syst. Sci. 2017. T. 21.

- № 9. C. 4419–4431.
206. Wu Y., Wang N., Zhao L., Zhang Z., Chen L., Lu Y., Lü X., Chang J. Hydrochemical characteristics and recharge sources of Lake Nuoertu in the Badain Jaran Desert // Chinese Sci. Bull. 2014a. T. 59. № 9. C. 886–895.
207. Wu Y. T., Zhou N. Di, Zhou Z. M., Gao X. X., Tian Y. P. A thermo-stable lysine aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*: Isolation, purification, characterization, and sequence analysis // J. Basic Microbiol. 2014b. T. 54. № 10. C. 1110–1119.
208. Yang J., Ma L., Jiang H., Wu G., Dong H. Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes // Sci. Rep. 2016. T. 6. № November 2015. C. 6–11.
209. Yang L.F., Jiang J.Q., Zhao B.S., Zhang B., Feng D.Q., Lu W.D., Wang L., Yang S.S. A Na⁺/H⁺ antiporter gene of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T: Cloning and molecular characterization // FEMS Microbiol. Lett. 2006. T. 255. № 1. C. 89–95.
210. Yang X., Ma N., Dong J., Zhu B., Xu B., Ma Z., Liu J. Recharge to the inter-dune lakes and Holocene climatic changes in the Badain Jaran Desert, western China // Quat. Res. 2010. T. 73. № 1. C. 10–19.
211. Yang X., Williams M.A.J. The ion chemistry of lakes and late Holocene desiccation in the Badain Jaran Desert, Inner Mongolia, China // Catena. 2003. T. 51. № 1. C. 45–60.
212. Yegin S., Fernandez-Lahore, Tari M., Salgado, Antonio Jose Gama Guvene U., Goksungur Y., Tari C. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. T. 89. № 4. C. 949–960.
213. Yin J., Chen J., Wu Q., Chen G. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology // Biotechnol. Adv. 2015. T. 33. № 7. C. 1433–1442.
214. Yue H., Ling C., Yang T., Chen X., Chen Y., Deng H., Wu Q., Chen J., Chen G.Q. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates // Biotechnol. Biofuels. 2014. T. 7. № 1. C. 1–12.

215. Zaitseva S. V., Abidueva E.Y., Namsaraev B.B., Wang L., Wu L. Microbial community of the bottom sediments of the brackish Lake Beloe (Transbaikal region) // *Microbiology*. 2014. T. 83. № 6. C. 861–868.
216. Zavarzin G.A., Zhilina T.N., Kevbrin V. V. Alkaliphilic microbial community and its functional diversity // *Mikrobiologiya*. 1999. T. 68. № 5. C. 579–599.
217. Zhang H., Wang Z., Wang L., Mu R., Zou Z., Yuan K., Wang Y., Wu H., Jiang J., Yang L. 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 // *Extremophiles*. 2014. T. 18. № 1. C. 89–98.
218. Zhao F., Qin Y. H., Zheng X., Zhao H. W., Chai D. Y., Li W., Pu M. X., Zuo X. S., Qian W., Ni P., Zhang Y., Mei H., He S. T. Biogeography and Adaptive evolution of *Streptomyces* Strains from saline environments // *Sci. Rep.* 2016. T. 6. № August. C. 1–9.
219. Zhilina T., Garnova E., Turova T., Kostrikina N., Zavarzin G. A. *Amphibacillus fermentum* sp. nov., *Amphibacillus tropicus* sp. nov.--new alkaliphilic, facultatively anaerobic, saccharolytic Bacilli from Lake Magadi // *Микробиология*. 2001. T. 70. № 6. C. 825–837.
220. Zhilina T. N., Zavarzin G. A., Rainey F. A., Pikuta E. N., Osipov G. A., Kostrikina N. A. *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* gen. nov., sp. nov., an Alkaliphilic, Sulfate-Reducing Bacterium // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997. T. 47. № 1. C. 144–149.
221. Zhilina T.N., Kevbrin V. V., Tourova T. P., Lysenko A. M., Kostrikina N. A., Zavarzin G. A. *Clostridium alkalicellum* sp. nov., an obligately alkaliphilic cellulolytic bacterium from a soda lake in the Baikal region // *Microbiology*. 2005a. T. 74. № 5. C. 557–566.
1. 215. Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Kolganova T.V., Tourova T.P., Zavarzin G.A. «*Candidatus Contubernalis alkalaceticum*» an obligately syntrophic alkaliphilic bacterium capable of anaerobic acetate oxidation in a coculture with *Desulfonatronum cooperativum* // *Microbiology*. 2005b. T. 74. № 6. C. 695–703.
222. Zhou C., Qin H., Chen X., Zhang Y., Xue Y., Ma Y. A novel alkaline protease

- from alkaliphilic *Idiomarina* sp. C9-1 with potential application for eco-friendly enzymatic dehairing in the leather industry // Sci. Rep. 2018. Т. 8. № 1. С. 1–18.
223. Абидуева Е.Ю., Зайцева С.В. Микробное разнообразие в щелочных соленых озёрах Приононья (Забайкалье) // Вестник Бурятского государственного университета. Биология. География. 2017. Т. 3. С. 83–86.
224. Абидуева Е.Ю., Сыренжапова А.С., Намсараев Б.Б. Функционирование микробных сообществ в содово-соленых озёрах Онон-Керуленской группы (Забайкалье и Северо-восточная Монголия) // Сибирский экологический журнал. 2006. Т. 13. № 6. С. 707–716.
225. Болтянская Ю.В. Физиолого-биохимические особенности представителей галоалкалофильных бактерий из содовых озёр: дис. канд.биол.наук: 03.00.07. / Болтянская Юлия Владимировна. – М., 2006.- 139 с.
226. Болтянская Ю.В. Галоалкалофильные денитрифицирующие бактерии рода *Halomonas* из содовых озёр // Труды института микробиологии имени С.Н. Виноградского. Выпуск 14: Алкалофильные микробные сообщества. 2007. С. 276–98.
227. Валяшко М.Г. Валяшко классификация озёр соленых / под ред. А.П. Виноградова: Издательство Московского университета, 1962. 1–403 с.
228. Гланц С.А. Медико-биологическая статистика / под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. Москва: Практика, 1998. Вып. пер. с англ. 459 с.
229. Горленко В.М. Аноксигенные фототрофные бактерии содовых озёр // Труды института микробиологии имени С.Н. Виноградского. Вып. 14. Алкалофильные микробные сообщества / под ред. В.М. Гальченко. Москва: Наука, 2007. С. 159–183.
230. Егорова Д.В., Ананьина Л.Н., Козырева Л.П., Захарюк А.Г., Плотникова Е.Г. Физико-химические свойства и микробное разнообразие озёра Соленое (Республика Бурятия) // Вестник Пермского Университета. 2011. Т. 120. № 1. С. 55–59.
231. Заварзин Г.А. Образование содовых условий как глобальный процесс // Труды Института микробиологии им. С. Н. Виноградского. Вып. 14.

- Алкалофильные микробные сообщества / под ред. В.Ф. Гальченко. Москва: Наука, 2007. С. 8–57.
232. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н. Содовые озёра - природная модель древней биосферы континентов // Природа. 2000. № 2. С. 1–9.
233. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Заварзин - Книга Введение в природовенческую микробиологию. Москва: Книжный дом «Университет», 2001. 256 с.
234. Лаврентьева Е.В., Банзаракцаева Т.Г., Эрдынеева Е.Б., Биджоян А.М., Кабилов М.Р. Галофильные бактерии — первичные деструкторы в соленом озёре Гуджирганское (Баргузинская долина, Северное Прибайкалье) // Вестник Бурятского Государственного Университет а . Биология, География. 2018. Т. 108. № 4. С. 46–50.
235. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты / под ред. В.Л. Кретович. Москва: Наука, 1971. 1–404 с.
236. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высшего учебного заведений / под ред. Л.М.З. А.И. Нетрусов, М.А. Егорова. Москва: 2005. Вып. Академия. 608 с.
237. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод / под ред. А.М. Антокольская. Москва: Недра, 1970. 488 с.
238. Цыренова Д.Д., Брянская А.В., Намсараев З.Б., Акимов В.Н. Таксономическая и экологическая характеристика цианобактерий некоторых солоноватых и соленых озёр Южного Забайкалья // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 230–240.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ И ИЗМЕРЕНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
«Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления»
(ВСГУТУ)

ИНСТИТУТ ПИЩЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ

670013, г. Улан-Удэ
ул. Ключевская 40в
тел. (3012) 41-72-10

ПРОТОКОЛ
ИСПЫТАНИЙ (ИССЛЕДОВАНИЙ) И ИЗМЕРЕНИЙ

№ 6

Сведения об объекте испытаний (исследований), измерений:

Полное наименование объекта	Лабораторный ферментный препарат получен из культуральной жидкости чистых культур: №1 - <i>Halomonas</i> spp. 7P №2 - <i>Halomonas</i> spp. 7B №3 - <i>Halomonas mongoliensis</i> 3B
Тип объекта	Ферментный препарат
Акт отбора образцов (сведения об образце)	На исследования (испытания) предоставлены лабораторные образцы частично очищенного ферментного препарата, полученные из культуральной жидкости штаммов.
Дата поступления образцов ИЛЦ	21 октября 2019 г.
Цель проведения испытаний (исследований), измерений	Определение пептидазной активности ферментного препарата, определение температурного и pH оптимума и стабильности активности.
Даты проведения исследований (испытаний), измерений	22 – 25 октября 2019 г.

Сведения об оборудовании, использованном при проведении испытаний (исследований), измерений:

Наименование, инвентарный номер, год ввода в эксплуатацию	Сведения о поверке СИ (номер документа, срок действия)
Фотометр CARY модель 300, 2013 Заводской номер: EL 03015893	№1458/18 до 03.10.2020
Весы неавтоматического действия HR-250AZG Заводской номер: 6A 7707412	№1180/10 до 26.09.2020
Термостат электрический суховоздушный ТС-80 СПУ, Заводской номер: 31158	-
Термометр стеклянный керосиновый СП-2, (0...+100) °С Заводской номер: 54	-

Метод определения активности ферментных препаратов

Определение активности ферментных препаратов проводили общепринятыми биохимическими методами исследования

Идентификация объекта испытаний (исследований), измерений:

Шифр образца	Порядковый номер образца	Наименование образца Ферментный препарат полученный культуральной жидкости штаммов:	Партия	Количество.
A1	1	<i>Halomonas</i> spp. 7P	-	5 мл
A2	2	<i>Halomonas</i> spp. 7B	-	5 мл
A3	3	<i>Halomonas mongoliensis</i> 3B	-	5 мл

Результаты испытаний (исследований), измерений:

Шифр пробы	Пептидазная активность, ед./мг белка	Определяемые параметры	Оптимум активности	Диапазон стабильности
A1	26	pH	8,5	6,0 - 10,0
		NaCl, г/л	50	0 - 200
		Температура, °С	30	5 - 50
A2	22	pH	8,5	6,0 - 10,0
		NaCl, г/л	50	0 - 200
		Температура, °С	30	5 - 50
A3	20	pH	9	6,0 - 10,0
		NaCl, г/л	100	0 - 200
		Температура, °С	30	5 - 50

Ответственный за испытания:

доцент кафедры "Биотехнология" к.б.н. Гомбоева С.В.

25.10.2019 г.

/ Директор института пищевой инженерии и биотехнологии
к.б.н. доцент Бубеев А.Т.

25.10.2019 г.

