



УДК 543.51+ 547.814.5

ГАЛОФИЛЬНЫЕ И ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ПРОДУЦЕНТЫ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ СОЛЕННЫХ ОЗЕР КАРУН (ЕГИПЕТ) И ЭЛЬТОН (РОССИЯ)



И. М. Ибрахим, С. А. Коннова, Е. Н. Сигида,
Ю. П. Федоненко, В. И. Сафронова, К. А. Elbanna

Ибрахим Мохаммед Ибрахим, аспирант кафедры биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; Assistant Lecturer of Department Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture Fayoum University (Fayoum, Egypt), ibrahim.egypt2016@yandex.ru

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского; ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Konnovasa@yandex.ru

Сигида Елена Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, si_elena@mail.ru

Федоненко Юлия Петровна, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, fedonenko_yu@ibprm.ru

Сафронова Вера Игоревна, кандидат биологических наук, руководитель Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, v.safronova@rambler.ru

Khaled Abdelrahman Youssef Elbanna, Professor of Department Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture Fayoum University (Fayoum, Egypt); Faculty of Applied Science, Biology Department, Umm Al Qura University (Makkah, KSA)

Микроорганизмы, способные к существованию в высоко засоленных средах, являются продуцентами уникальных по структуре и свойствам соединений, что обуславливает возросший в последнее время интерес исследователей к изучению их биотехнологического потенциала. Целью работы являлся скрининг экзополисахарид-продуцирующих галофильных и галотолерантных микроорганизмов из соленых озер в Египте и России. Для выделения и характеристики штаммов использованы микробиологические, физико-химические методы, световая и просвечивающая электронная микроскопия. Таксономические исследования изолятов проведены на основании анализа культурально-морфологических, биохимических свойств и данных секвенирования 16S рДНК. Из выделенных 104 изолятов микроорганизмов охарактеризованы 49 штаммов-продуцентов экзополисахаридов. Содержание полисахаридов в культуральной жидкости исследуе-

мых микроорганизмов максимально достигало 13.7 мг/мл. Для 16 изолятов установлена видовая принадлежность.

Ключевые слова: галофильные и галотолерантные микроорганизмы, экзополисахариды, видовое разнообразие, филогенетические связи.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-345-353

Большая часть земной поверхности покрыта Мировым океаном, характеризующимся высоким разнообразием населяющей его биоты, что дает исследователям шанс обнаружить микроорганизмы, продуцирующие соединения с уникальными свойствами и химическим составом [1]. В то же время гиперсоленые среды, такие как естественные соленые и соляные озера, представляют экосистемы с меньшим разнообразием, но более высокой плотностью сообществ [2]. Эти относительно просто организованные экосистемы по сравнению с морскими или пресноводными представляют удобный объект исследования фундаментальных аспектов биоразнообразия, селекции, биогеографии и эволюции микроорганизмов. Среди входящих в их состав галотолерантных и галофильных микроорганизмов встречаются представители трех основных доменов – эукариоты, археи и бактерии [3], причем среди последних представлены аэробы, факультативные и облигатные анаэробы, как грамотрицательные, так и грамположительные [4].

По способности обитать в средах с различными концентрациями хлорида натрия выделенные и охарактеризованные до настоящего времени галофильные микроорганизмы разделяют на четыре группы: слабые (2–5% NaCl), умеренные (5–15% NaCl), экстремальные (15–32%) и пограничные экстремальным галофилами (>15% NaCl). Галотолерантные (осмофильные) микробы не требуют хлорида натрия для своего роста, но могут адаптироваться к довольно высоким (до 15%) концентрациям соли [5–7].

Галофильные микроорганизмы представляют перспективный объект исследований с целью дальнейшего использования их биотехнологического потенциала. Среди галобактерий часто встречаются продуценты экстраклеточных



ферментов. Например, из различных образцов соли, собранных компанией «Emisal salt company» в озере Карун (Египет), были выделены 33 бактериальных изолята – продуценты протеаз и 16 изолятов, производящих целлюлазы [8, 9].

Вызывают несомненный интерес и экзополисахариды (ЭПС) галобактерий. Сазерленд впервые использовал термин «экзопполисахарид» для описания высокомолекулярных углеводных полимеров, производимых именно морскими бактериями [10]. В ходе адаптации к существованию в засоленных условиях обитания у многих микроорганизмов происходят модификации молекул, формирующих поверхность клетки, например, фосфолипидов [10]. Охарактеризованы ЭПС некоторых галофильных/галотолерантных микроорганизмов, среди которых преимущественно представлены археи и морские бактерии [11–14]. Микробиом соленых и соляных озер, проявляющих различия в химическом составе, уровне техногенного загрязнения и т.д., исследован недостаточно и, как следствие, ограничена информация о продуцируемых микроорганизмами ЭПС.

Благодаря уникальной структуре и проявляемым физико-химическим свойствам микробные полисахариды широко используются в пищевой, фармацевтической и других отраслях производства. Некоторые из них являются эмульгаторами, стабилизаторами, загустителями, желирующими агентами, коагулянтами, компонентами смазок, материалами для пленочных покрытий и пр. [15].

Целью настоящего исследования являлся скрининг галофильных микроорганизмов, изолированных из соленых озер Карун (мухафаза Эль-Файюм, Египет) и Эльтон (Волгоградская область, Россия), направленный на выявление наиболее перспективных штаммов в отношении продукции ЭПС, с дальнейшей их идентификацией на основании данных фенотипического исследования и анализа нуклеотидной последовательности генов 16S рДНК.

Материалы и методы

Галофильные изоляты выделяли с использованием модифицированной среды S-G (Sehgal and Gibbons, 1960). Отдельно подготавливали два раствора, содержащих в пересчете на конечный объем среды (1 л) следующие компоненты: А – 200 мл раствора глюкозы (1%), сахарозы (1%), дрожжевого экстракта (1%), который трижды дробно пастеризовали (100°C, 15 мин); Б – 800 мл раствора, NaCl (в зависимости от варианта опыта: 0, 5, 10, 15 или 25%), MgSO₄·7H₂O (2%), KCl (0.2%), цитрат натрия Na₃C₆H₅O₇ (0.3%), который автоклавировали (121°C, 30 мин). После стерили-

зации растворы смешивали и титровали 1н NaOH до конечного значения pH 7.5. Для культивирования микробных изолятов использовали жидкую и агаризованную (1.5% бактоагара) среду.

Для получения накопительной культуры в среду S-G (90 мл) добавляли образцы в жидкой (10 мл) либо твердой (10 г) форме, инкубировали при 30 и 37°C в течение 3–7 суток на ротационном шейкере (200 об/мин). Затем из аликвот последовательных разведений каждой накопительной культуры делали высевы на твердую среду S-G и инкубировали при 30 и 37°C в течение 2 недель. ЭПС-продуцирующие изоляты отбирали по способности к образованию ослизненных колоний, которые рассеивали на свежую среду для получения отдельных колоний. Чистоту культур контролировали с помощью световой микроскопии. Хранение отобранных микробных культур осуществляли при –70°C в среде S-G, содержащей 20% глицерина. Штаммы депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ).

Для каждой изолированной культуры микроорганизмов описывали морфологию колоний, осуществляли окрашивание по Граму согласно процедуре [16], также выполняли тесты с гидроксидом калия [17]. Окрашивание спор было выполнено по Шефферу–Фултону и др. в соответствии с [17]. Подвижность изолятов исследовали микроскопическими методами, морфология клеток оценивалась с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на микроскопе Libra 120 («Carl Zeiss», Германия) в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Для отнесения галофильных микроорганизмов к одной из четырех групп изоляты тестируют на способность к росту на плотной S-G среде с различным содержанием NaCl (0, 5, 10, 15 и 25%) [18].

Из жидкой культуры на стационарной фазе роста клетки осаждали центрифугированием (4400 об/мин, 40 мин). Содержание ЭПС в культуральной жидкости определяли после осаждения двумя объемами охлажденного 96% этанола (4°C, 12 ч). Осадок ЭПС дважды промывали этанолом, а затем диализовали в течение 72 ч против дистиллированной воды через мембрану с пределом исключения 14 кДа («Росмедбио», Россия). Концентрацию углеводов в ЭПС определяли методом [19] с использованием глюкозы в качестве стандарта.

Идентификацию микроорганизмов осуществляли на основании данных анализа культурально-морфологических и биохимических свойств (GENIII MicroPlate BioLog, США),



а также последовательности гена 16S рРНК, амплификацию которого проводили с использованием пар универсальных праймеров: 5'GCCGGAGGTCATTGCTAGTGGAGTC3' и 5'AGGAGGTGATCCAGCCGCAGATTCC3' [20] и fD1 5'AGAGTTTGTATCC-TGGCTCAG3' и rD1 5'CTTAAGGAGGTGATCCAGCC3' [21].

ПЦР выполняли в течение 30 циклов: денатурация 30 с при 95°C, отжиг 1 мин при 40°C и полимеризация в течение 2 мин при 72°C. Продукты ПЦР (~1540 п. н.) разделяли электрофорезом в агарозном геле и извлекали с помощью набора Nucleotrap («Macherey-Nagel», Германия). Секвенирование осуществляли на коммерческой основе в компании «Синтол» (г. Москва), а также в рамках договора о научном сотрудничестве с ФГБНУ ВНИИСХМ (г. Санкт-Петербург).

Сравнение полученных последовательностей 16S рДНК с таковыми в базе данных GenBank осуществляли с использованием онлайн сервиса Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Построение филогенетических дендрограмм методом присоединения соседей осуществляли с использованием программного пакета FASTMe (<https://galaxy.pasteur.fr>). Статистическую достоверность

дендрограмм рассчитывали с помощью «bootstrap» анализа с использованием построения 1000 альтернативных деревьев. *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (NR114673) был использован в качестве референтного штамма – представителя неродственной группы.

Результаты и их обсуждение

Из восьми образцов соли оз. Карун (Египет, 29°27'13»с.ш. 30°34'51» в.д.), полученных в 2015–2016 гг. из различных источников, включающих природный неокрашенный соляной раствор, окрашенные соляные растворы из искусственных солнечных соляных прудов, прибрежную и донную почвы солнечных соляных прудов, а также необработанную соль («Emisal Salt Company», Египет), было выделено 78 изолятов, из которых 39 оказались продуцентами ЭПС. Из 26 изолятов, выделенных в 2016 г. из трех различных соляных проб оз. Эльтон (Россия, 49°08'с.ш. и 46°42' в.д.), ЭПС продуцировали 10 изолятов.

ЭПС-продуцирующие изоляты характеризовались способностью к образованию на агаризованной среде S-G, содержащей разные концентрации NaCl, мукоидных колоний (рис. 1).

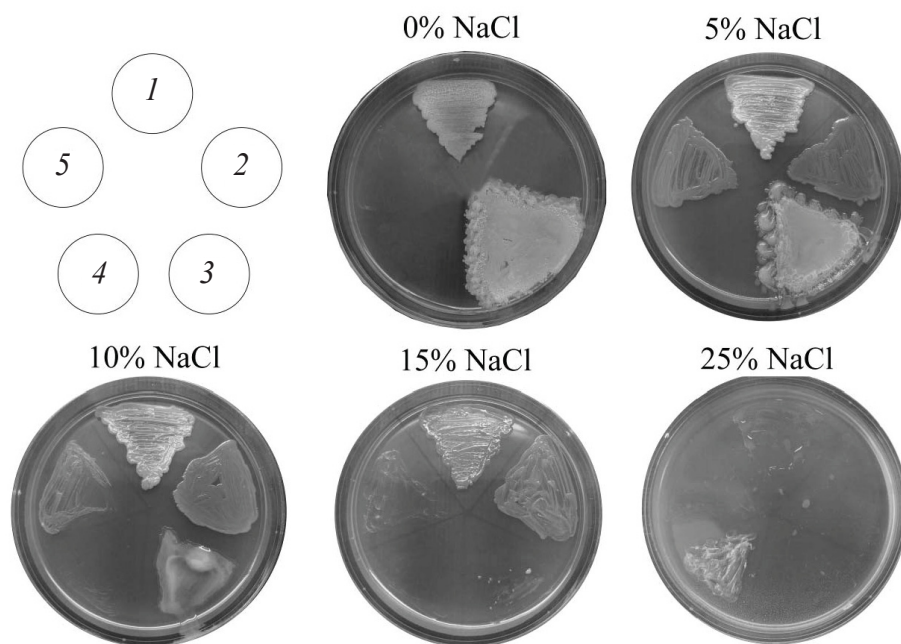


Рис. 1. Рост колоний галофильных и галотолерантных изолятов на средах с различным содержанием соли: 1 – EG1QL3; 2 – EG 9S8QL; 3 – EG1QL30; 4 – EG3QL57; 5 – RU5S2EL

При исследовании отобранных культур методом ПЭМ наблюдали микробные клетки, окруженные слоем слизи (рис. 2).

По устойчивости к различному содержанию NaCl в среде культивирования исследуемые

микроорганизмы были условно разделены на четыре группы (табл. 1), причем основным критерием при отнесении каждого изолята к определенной группе являлась оптимальная для роста бактериальной культуры концентрация NaCl.

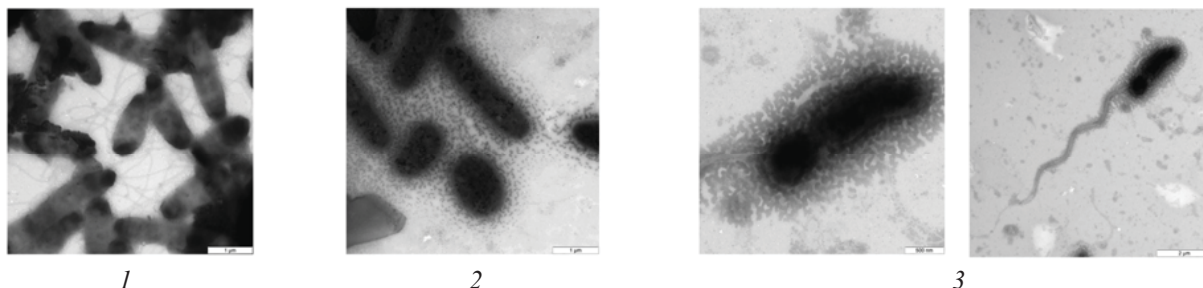


Рис. 2. Морфология клеток изолятов, продуцирующих ЭПС, визуализированная методом ПЭМ: 1 – EG1QL3; 2 – EG3QL57; 3 – EG1QL30

Исследования показали, что в составе первой группы только четыре изолята не демонстрировали рост при концентрациях соли ниже 25%, в то время как изоляты EG4QL54 и EG1QL53 были способны расти в диапазоне 15–25% NaCl, а изолят RU2EL38 – 10–25% NaCl. Таким образом, все семь изолятов первой группы можно рассматривать как экстремальные галофилы. Микроорганизмы, отнесенные ко второй группе, демонстрировали активный рост при 15% NaCl, за исключением EG1QL3, который способен расти в широком диапазоне концентраций NaCl (0–15%). Часть изолятов третьей (EGP5QL1, RU2EL5, EGP2QL34, EGP6QL35, EGP5QL12) и четвертой групп (EGP6QL14, RU2EL4, EGP3QL11, RU2EL1) обнаружили способность к росту как в среде с соответствующей концентрацией NaCl (10 и 5%), так и в среде, не содержащей соли, а часть изолятов этих групп (EG24S8QL, EG18S7QL, EGP1QL18, EG27S8QL, EG1HP4QL, EG33S7QL, EGP3QL10, EG26S8QL) демонстрировала слабый рост при 15% NaCl.

Следует отметить, что среди выделенных культур грамположительных бактерий было приблизительно в два раза больше, чем граммотрицательных. Только семь изолятов характеризовались отсутствием подвижности и все они относились к грамположительным бактериям. Соотношение споро- и неспорообразующих микроорганизмов было примерно одинаковым.

При микроскопическом исследовании было выявлено, что большинство изолятов представляли собой короткие либо длинные палочки. Исключение составили три штамма микроорганизмов первой группы, которые были плейоморфными (EG4QL54, EG3QL57) и кокками (RU2EL38), а также три штамма бактерий третьей группы, которые были кокками (EGP5QL1, RU1EL6) и диплококками (EGP1QL18). Сведения о культуральных свойствах исследуемых изолятов на твердой питательной среде представлены в табл. 1.

Все изоляты охарактеризованы по продукции ЭПС, которая достаточно сильно отличалась у разных штаммов (от 0.1 до 13.7 мг в мл культуральной среды (см. табл. 1)). Следует отметить, что проведенный скрининг характеризует способность к продукции ЭПС у выделенных штаммов только в общих чертах, поскольку потенциал этих микроорганизмов может быть более высоким при оптимизации условий их культивирования. Тем не менее уровень синтезированных исследуемыми микроорганизмами ЭПС согласуется с таковым для других галофильных бактерий [22].

Отбор штаммов для проведения дальнейших исследований осуществляли, учитывая их способность к продукции ЭПС (мг/мл) в пределах каждой группы (см. табл. 1). Поскольку группы различались количеством отнесенных к ним штаммов, то из первой и второй групп было отобрано по три изолята – EG3QL57, EG3QL50, RU2EL38 и EG1QL3, EG9S8QL, EGP4QL47 соответственно. Из третьей группы были отобраны шесть изолятов – EG1QL30, EGP5QL12, EG24S8QL, EG18S7QL, EGT5QL15 и EG2QL8, а из четвертой – двенадцать изолятов: EG1HP4QL, RU2EL4, EGP5QL39, RU3EL3, RU5S2EL, EG6S8QL, RU2EL1, EG19S7QL, EG27S8QL, EG30S8QL, EG33S7QL и EG26S8QL.

По результатам исследования последовательности нуклеотидов генов 16S рДНК для шестнадцати из отобранных изолятов установлена принадлежность к десяти родам, восемь из которых – представители бактерий: *Bacillus*, *Salinibacillus*, *Virgibacillus*, *Piscibacillus*, *Halobacillus*, *Marinococcus*, *Chromohalobacter*, *Halomonas*, а два – архей: *Haloterrigena* и *Halobacterium*. Как следует из приведенных данных, на рис. 3 и в табл. 2 гомология нуклеотидной последовательности генов 16S рДНК исследуемых изолятов с таковой наиболее близких видов (база данных GenBank) для большинства штаммов составляла от 98.5 до 99%, в некоторых случаях – 100%.



Таблица 1

Характеристика морфологии колоний и клеток, продуцирующих ЭПС галофильных и галотолерантных микроорганизмов

| № | Изолят | Морфология колоний | ЭПС, мг/мл | Окраска по Граму | Подвижность | Спорообразование |
|--|----------|----------------------------------|------------|------------------|-------------|------------------|
| Группа 1: экстремальные галофилы (25% NaCl) | | | | | | |
| 1 | EG2QL55 | Круглые розовые ослизненные | 0.4 | - | + | - |
| 2 | EG3QL50 | Точечные розовые ослизненные | 1.5 | - | + | - |
| 3 | RU1EL16 | Круглые ярко-красные ослизненные | 0.5 | + | + | - |
| 4 | RU2EL38 | Точечные розовые ослизненные | 0.9 | + | - | - |
| 5 | EG4QL54 | Круглые оранжевые ослизненные | 0.3 | + | + | - |
| 6 | EG3QL57 | Круглые красные ослизненные | 2.3 | - | + | - |
| 7 | EG1QL53 | Круглые розовые ослизненные | 0.2 | - | + | - |
| Группа 2: пограничные экстремальным галофилы (15% NaCl) | | | | | | |
| 8 | EGP3QL23 | Круглые желтые маслянистые | 0.4 | + | + | + |
| 9 | EG9S8QL | Круглые бежевые ослизненные | 1.5 | - | + | - |
| 10 | EGT2QL27 | Точечные кремовые ослизненные | 0.4 | + | + | + |
| 11 | EGP5QL24 | Круглые белые маслянистые | 0.1 | + | + | - |
| 12 | RU1EL3 | Неправ. бежевые маслянистые | 0.9 | + | + | + |
| 13 | EGP3QL2 | Круглые белые ослизненные | 0.6 | + | - | + |
| 14 | EGP4QL47 | Круглые кремовые маслянистые | 1.1 | + | + | + |
| 15 | EG1QL3 | Круглые кремовые ослизненные | 13.7 | - | + | - |
| Группа 3: умеренные галофилы 10% NaCl | | | | | | |
| 16 | EGT5QL15 | Круглые светло-серые маслянистые | 2.0 | + | + | + |
| 17 | EGP5QL1 | Точечные белые ослизненные | 0.3 | + | - | - |
| 18 | RU2EL5 | Круглые оранжевые маслянистые | 1.1 | + | + | + |
| 19 | EGT2QL37 | Точечные кремовые маслянистые | 0.6 | - | + | - |
| 20 | EG24S8QL | Круглые бежевые ослизненные | 2.7 | - | + | - |
| 21 | EG2QL8 | Точечные желтые ослизненные | 1.8 | + | + | + |
| 22 | EGP2QL34 | Круглые белые маслянистые | 0.9 | + | + | + |
| 23 | EG1QL30 | Неправильные белые ослизненные | 9.3 | + | + | + |
| 24 | EG18S7QL | Круглые кремовые ослизненные | 2.5 | - | + | - |
| 25 | EGP6QL35 | Точечные кремовые маслянистые | 0.2 | + | + | - |
| 26 | RU1EL6 | Неправильн. бежев. ослизненные | 0.8 | + | - | - |
| 27 | EGT2QL36 | Круглые бежевые ослизненные | 0.9 | + | + | + |
| 28 | EGP1QL18 | Точечные белые маслянистые | 0.4 | + | - | - |
| 29 | EGP5QL12 | Круглые белые ослизненные | 5.7 | + | + | + |
| 30 | RU3EL7 | Круглые белые ослизненные | 1.2 | + | + | + |
| Группа 4: слабые галофилы (5% NaCl) | | | | | | |
| 31 | EG27S8QL | Круглые белые ослизненные | 1.8 | - | + | - |
| 32 | RU3EL3 | Круглые белые ослизненные | 2.9 | + | + | + |
| 33 | EGP6QL14 | Круглые белые ослизненные | 0.7 | + | + | + |
| 34 | EGT4QL13 | Неправильн. кремов. маслянистые | 1.1 | + | - | + |
| 35 | EG6S8QL | Неправильные белые ослизненные | 2.3 | - | + | - |
| 36 | EG1HP4QL | Круглые желтые маслянистые | 5.2 | + | + | + |
| 37 | RU2EL4 | Круглые белые ослизненные | 4.6 | + | + | + |
| 38 | EGP3QL11 | Круглые кремовые маслянистые | 0.4 | + | + | - |
| 39 | EGP5QL39 | Неправильные белые ослизненные | 4.2 | + | + | + |
| 40 | EG33S7QL | Круглые белые ослизненные | 1.5 | - | + | - |
| 41 | EGP3QL10 | Неправильн. кремов. ослизненные | 0.8 | - | + | - |
| 42 | EGT2QL9 | Круглые белые ослизненные | 1.3 | + | - | + |
| 43 | EG30S8QL | Круглые белые ослизненные | 1.7 | - | + | - |
| 44 | RU2EL1 | Неправильные белые ослизненные | 2.1 | + | + | + |
| 45 | EGT4QL42 | Круглые кремовые маслянистые | 0.5 | + | + | + |
| 46 | EG26S8QL | Круглые бежевые маслянистые | 1.5 | - | + | - |
| 47 | EGT4QL43 | Неправильные белые ослизненные | 0.2 | + | + | + |
| 48 | EG19S7QL | Круглые белые маслянистые | 1.8 | - | + | - |
| 49 | RU5S2EL | Круглые коричневые слизистые | 2.8 | - | + | - |

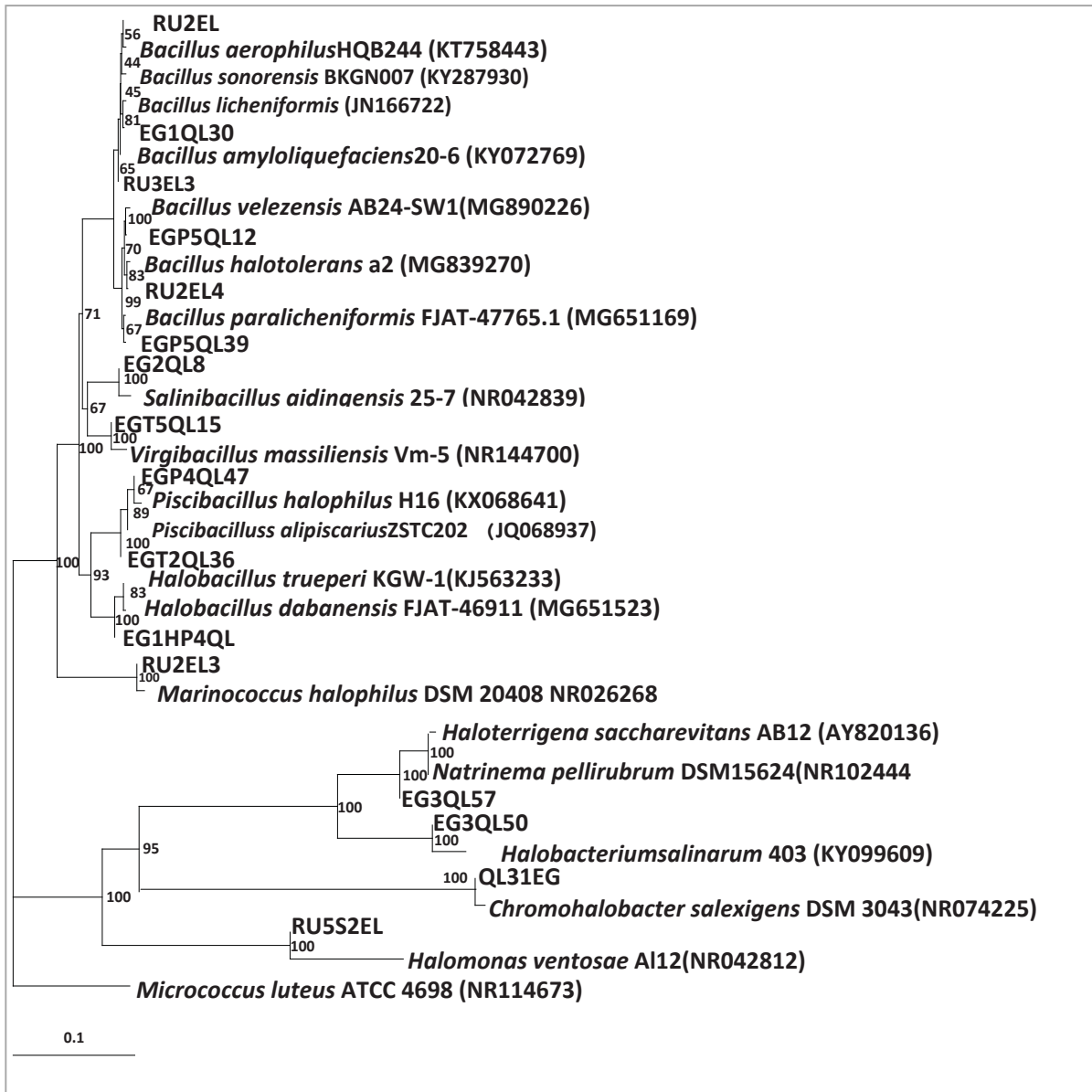


Рис. 3. Дендрограмма филогенетического сходства, построенная на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рДНК выделенных изолятов и других близкородственных микроорганизмов. Для построения использован метод присоединения соседей («neighbor-joining»). Слева внизу дан масштаб эволюционных расстояний. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 альтернативных деревьев

В составе галофильных микроорганизмов, изолированных из образцов соли озер Карун и Эльтон, выявлено присутствие представителей семейств Halobacteriaceae, Halomonadaceae и Bacillaceae (см. табл. 2). В группе экстремальных галофилов были выявлены представители семейства р. *Halobacterium* и *Haloterrigena* (Halobacteriaceae) и *Marinococcus* (Bacillaceae). Во второй группе удалось установить видовую принадлежность двух изолятов – представителей р. *Piscibacillus* (Bacillaceae) и *Chromohalobacter*

(Halobacteriaceae). Среди умеренных и слабых галофилов преобладали представители сем. Bacillaceae: *Bacillus*, *Salinibacillus*, *Virgibacillus*, *Piscibacillus* и *Halobacillus*. Единственный представитель сем. Halomonadaceae – *Halomonas ventosae* был идентифицирован в составе четвертой группы.

Полученные в нашей работе данные о видовом составе засоленных водоемов коррелируют с результатами подобных исследований. Так, Hedi et al. [23] проводили скрининг бактери-



Таблица 2

**Определение видовой принадлежности микроорганизмов
по анализу нуклеотидных последовательностей гена 16S рДНК**

| № | Изоляты | Наиболее близкие виды (ID GenBank) | Идентичность, % |
|-----------------|----------|--|-----------------|
| Группа 1 | | | |
| 1 | EG3QL57 | <i>Haloterrigena saccharevitans</i> * (AY820136) | 98.9 |
| 2 | EG3QL50 | <i>Halobacterium salinarum</i> * (KY099609) | 100.0 |
| 3 | RU2EL38 | <i>Marinococcus halophilus</i> (NR026268) | 98.7 |
| Группа 2 | | | |
| 4 | EGP4QL47 | <i>Piscibacillus halophilus</i> (KX068641) | 100.0 |
| 5 | EG1QL3 | <i>Chromohalobacter salexigens</i> (NR074225) | 100.0 |
| Группа 3 | | | |
| 6 | EG2QL8 | <i>Salinibacillus aidingensis</i> (NR042839) | 98.8 |
| 7 | EG1QL30 | <i>Bacillus licheniformis</i> (JN166722) | 98.9 |
| 8 | EGT2QL36 | <i>Piscibacillus salipiscarius</i> (JQ068937) | 98.8 |
| 9 | EGT5QL15 | <i>Virgibacillus massiliensis</i> (NR144700) | 100.0 |
| 10 | EGP5QL12 | <i>Bacillus velezensis</i> (MG890226) | 98.9 |
| Группа 4 | | | |
| 11 | EGP5QL39 | <i>Bacillus paralicheniformis</i> (MG651169) | 98.7 |
| 12 | RU2EL1 | <i>Bacillus aerophilus</i> (KT758443) | 100.1 |
| 13 | RU3EL3 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KY072769) | 98.9 |
| 14 | EG1HP4QL | <i>Halobacillus dabanensis</i> (MG651523) | 100.0 |
| 15 | RU2EL4 | <i>Bacillus halotolerans</i> (MG839270) | 98.9 |
| 16 | RU5S2EL | <i>Halomonas ventosae</i> (NR042812) | 98.7 |

Примечание. * – представители Archaea.

альных и архейных сообществ в отложениях Эль-Джеридского соленого озера в Тунисе с использованием фенотипических и филогенетических подходов и обнаружили, что члены домена Bacteria принадлежат к родам *Salicola*, *Pontibacillus*, *Halomonas*, *Marinococcus* и *Halobacillus*, тогда как единственный член домена Archaea был представлен родом *Halorubrum*. Исследования разнообразия галофильных бактерий вдоль прибрежных районов Карнатака (Индия) показали преобладание родов *Virgibacillus*, *Halobacillus*, *Salinibacillus*, *Nesterenkonia*, *Pontibacillus* и *Staphylococcus* [24]. Аналогично умеренно галофильные аэробные бактерии, принадлежащие к родам *Halomonas*, *Bacillus* и *Chromohalobacter*, были выделены из многослойных солнечных сателлитов вдоль побережья Гуджарата, Ориссы и Западной Бенгалии, Индия [13].

Таким образом, по результатам исследования показано, что среди изолятов микроорганизмов, адаптированных к существованию в засоленных средах, 47% являются продуцентами полисахари-

дов ЭПС, т.е. для них, очевидно, продукция гликополимеров является стратегией выживания в экстремальных средах. Слой ЭПС защищает клетки от экстремальных условий окружающей среды и часто используется бактериями как источник углерода и энергии во время голодания. Учитывая, что адаптация к различной засолённости, техногенному загрязнению и другим негативным факторам путем изменения состава и продукции ЭПС исследована недостаточно, выделенные штаммы являются весьма перспективными объектами, как для изучения фундаментальных основ процесса адаптации с использованием ЭПС, так и для биотехнологических целей как продуценты полисахаридов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность ведущему инженеру ЦКП «Симбиоз» кандидату химических наук А. М. Бурову за получение микрофотографий ПЭМ, а также доктору биологических наук, профессору А. С. Кашину за



помощь в получении образцов из Озера Эльтон (Волгоградская область, Россия). Депонирование штаммов в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) было выполнено в рамках Программы ФАНО России по развитию и инвентаризации биоресурсных коллекций научными организациями.

Список литературы

1. Aneiros A., Garatei A. Bioactive peptides from marine sources. Pharmacological properties and isolation procedures // J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2004. Vol. 15. P. 41–53.
2. Ma Y., Galinski E. A., Grant W. D., Oren A., Ventosa A. Halophiles 2010 : life in saline environments // Appl. Environ. Microbiol. 2010. Vol. 76(21). P. 6971–6981.
3. Gontia-Mishra I., Sapre S., Tiwari S. Diversity of halophilic bacteria and actinobacteria from India and their biotechnological applications // Ind. J. Geo Marine Sci. 2017. Vol. 46 (8). P. 1575–1587.
4. Johnson A., Thurlow L., Zwenger R., Gillock E. Partial characterization of two moderately halophilic bacteria from a Kansas salt marsh // Prairie Nat. 2007. Vol. 39. P. 29–39.
5. Rodriguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Correnzana A. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations // Microb. Ecol. 1981. Vol. 7 (3). P. 235–243.
6. Rodriguez-Valera F. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments // Halophilic Bacteria / ed. F. Rodriguez-Valera. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1988. Vol. 1. P. 3–30.
7. Kushner D. J., Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria // Halophilic Bacteria / ed. F. Rodriguez-Valera. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1988. Vol. 1. P. 109–138.
8. Elbanna K., Ibrahim I. M., Revol-Junelles A.-M. Purification and characterization of halo-alkali-thermophilic protease from *Halobacterium* sp. strain HP25 isolated from raw salt, Lake Qarun, Fayoum, Egypt // Extremophiles. 2015. Vol. 19 (4). P. 763–774.
9. Korany A. H., Ali A. E., Essam T. M., Megahed S. A. Optimization of cellulase production by *Halobacillus* sp. QLS 31 isolated from Lake Qarun, Egypt // Appl. Biochem. Biotechnol. 2017. Vol. 183 (1). P. 189–199.
10. Sutherland I. W. Bacterial exopolysaccharides // Adv. Microb. Physiol. 1972. Vol. 8. P. 143–213.
11. Ventosa A., Mellado E., Sánchez-Porro C., Márquez M. C. Halophilic and halotolerant microorganisms from soils // Microbiology of extreme soils / eds. P. Dion, C. S. Nautiyal. Heidelberg : Springer, 2008. P. 85–111.
12. Litchfield C. D. Potential for industrial products from the halophilic Archaea // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 38. P. 1635–1647.
13. Biswas J., Paul A. K. Production of extracellular polymeric substances by halophilic bacterial diversity in multi-pond solar salterns // Chinese J. Biol. 2014. Vol. 12. DOI: 10.1155/2014/205731
14. Casillo A., Lanzetta R., Parrilli M., Corsaro M. M. Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications // Mar. Drugs. 2018. Vol. 16 (2). DOI: 10.3390/md16020069
15. Sutherland I. W. Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences // Pure Appl. Chem. 1997. Vol. 69 (9). P. 1911–1917.
16. Dussault H. P. An improved technique for staining halophilic bacteria // J. Bacteriol. 1955. Vol. 70. P. 484–485.
17. Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. Methods for general and molecular bacteriology / American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1994. P. 607–654.
18. Nieto J., Fernandez-Castillo R., Marquez M., Ventosa A., Quesada E., Ruiz Berraquero F. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1989. Vol. 55. P. 2385–2390.
19. DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Calorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. Vol. 28. P. 350–356.
20. Hezayen F. F., Tindall B. J., Steinbüchel A., Rehm B. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. Vol. 52. P. 2272–2280.
21. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173 (2). P. 697–703.
22. Fang Y., Ahmed S., Liu S., Wang S., Lu M., Jiao Y. Optimization of antioxidant exopolysaccharides production by *Bacillus licheniformis* in solid state fermentation // Carbohydr. Polym. 2013. Vol. 98 (2). P. 1377–1382.
23. Hedi A., Sadfi N., Fardeau M. L., Rebib H., Cayol J. L., Ollivier B., Boudabous A. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid salt lake (Tunisia) under aerobic conditions // Intern. J. Microbiol. 2009. DOI: 10.1155/2009/731786
24. Jayachandra S. Y., Kumar S. A., Merley D. P., Sulochana M. B. Isolation and characterization of extreme halophilic bacterium *Salinicoccus* spp. JAS4 producing extracellular hydrolytic enzymes // Rec. Res. Sci. Technol. 2012. Vol. 4 (4). P. 46–49.

Exopolysaccharide-Producing Halophilic and Halotolerant Microorganisms Isolated from the Saline Lakes Qarun (Egypt) and Elton (Russia)

I. M. Ibrahim, S. A. Konnova, E. N. Sigida,
Yu. P. Fedonenko, V. I. Safronova, K. A. Elbanna

Ibrahim M. Ibrahim, ORCID 0000-0002-5374-3508, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia; Fayoum University, Egypt, Fayoum, POBox: 63514 (Egypt), ibrahim.egypt2016@yandex.ru



Svetlana A. Konnova, ORCID 0000-0002-9607-8173, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia; Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, 13, Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia, konnovasa@yandex.ru

Elena N. Sigida, ORCID 0000-0002-9223-4589, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, 13, Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia, si_elena@mail.ru

Yulia P. Fedonenko, ORCID 0000-0003-0255-8190, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, 13, Entuziastov Pr., Saratov, 410049, Russia, fedonenko_yu@ibppm.ru

Vera I. Safronova, ORCID 0000-0003-4510-1772, All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint Petersburg; 8, Pushkin, Saint Petersburg, 196608, Russia, v.safronova@rambler.ru

Khaled A. Elbanna, ORCID 0000-0001-6499-9261, Faculty of Agriculture Fayoum University (Fayoum., Postal Address: Fayoum - Fayoum University - Faculty of Agriculture - microbiology Department - POBox: 63514, Egypt; Faculty of Applied Science, Biology Department, Umm Al Qura University (Makkah, KSA). Postal Address: P.O. Box: 7067, Makkah (21955), Saudi Arabia, kab00@fayoum.edu.eg

Microorganisms inhabiting saline environments can produce compounds unique in structure and properties. This ability recently prompted researchers to study the biotechnological potential of

halophiles. This work aimed at screening the exopolysaccharide-producing halophilic and halotolerant microorganisms of two saline lakes, one in in Egypt and the other in Russia. For strain isolation and characterization, we used microbiological and physico-chemical methods, as well as light and transmission electron microscopy. Taxonomy studies of the isolates was studied on the basis of analyses of cultural and morphological characteristics, biochemical properties and 16S rDNA sequencing data. Of 104 isolates adapted to saline environments we selected 49 exopolysaccharide-producing strains. The content of polysaccharides in the culture liquids of the isolated microorganisms reached 13.7 mg/ml⁻¹. Sixteen isolates were identified to species.

Key words: halophilic and halotolerant microorganisms, exopolysaccharides, species diversity, phylogenetic relationships.

Acknowledgements: *The authors are grateful to the leading engineer of the CCU "Symbiosis" Dr. A. M. Burov for obtaining TEM micrographs and to Professor Dr.Sc. A. S. Kashin for assistance in obtaining samples from the lake Elton (Volgograd Region, Russia). The deposition of strains in the Russian Collection of Agricultural Microorganisms was carried out as part of the FASO Russia program on the development and inventory of bioresource collections by scientific organizations.*

Образец для цитирования:

Ибрагим И. М., Коннова С. А., Сигида Е. Н., Федоненко Ю. П., Сафронова В. И., Elbanna К. А. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы – продуценты экзополисахаридов, выделенные из соленых озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия) // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 345–353. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-345-353

Cite this article as:

Ibrahim I. M., Konnova S. A., Sigida E. N., Fedonenko Yu. P., Safronova V. I., Elbanna K. A. Exopolysaccharide-Producing Halophilic and Halotolerant Microorganisms Isolated from the Saline Lakes Qarun (Egypt) and Elton (Russia). *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 345–353 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-345-353
