

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Галофильные бактерии соленых озер и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан) и их биотехнологический потенциал

Э.А. Халилова¹✉, С.Ц. Котенко¹, Э.А. Исламмагомедова¹, А.А. Абакарова¹, Н.А. Черных², Д.А. Аливердиева¹

¹ Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Махачкала, Республика Дагестан, Россия

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

✉ eslanda61@mail.ru

Аннотация. Приведены результаты изучения биоразнообразия и биотехнологического потенциала галофильных микроорганизмов из термального высокоминерализованного Берикейского озера, соленого Тарумовского озера и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан). С использованием микробиологических методов и метода анализа генов 16S рРНК идентифицированы денитрифицирующие галофильные бактерии родов *Halomonas* и *Virgibacillus*. Выявлен новый вид *Halomonas* sp. G2 (MW386470) с 95 % уровнем сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Штамм G2 – экстремальный галофил, способный расти в диапазоне 5–25 % NaCl (оптимум 25 %) и образовывать каротиноидный пигмент. Мезофил (30–37 °С, оптимум 30 °С), нейтрофил (рН 6–8, оптимум 7.2–7.4). Хемолитотроф; редуцирует нитрат или нитрит в качестве доноров электронов; каталазо-, амилазо-, протеазо- и β-галактозидазоположительный; липазо-, оксидазо- и уреазоотрицательный. Не способен гидролизовать инозит, индол; продуцирует лизин, желатин, эктоин; в качестве источника углерода и энергии использует цитрат и малат натрия; не продуцирует орнитин, H₂S и кислоту из d-маннозы, сахарозы, глицерина, целлобиозы, кроме лактозы и d-глюкозы. Восприимчив к триметоприму, ципрофлоксацину, офлоксацину, канамицину, ванкомицину, рифампицину, цефуроксиму, ампициллину, цефтазидиму, фосфомицину, кларитромицину, цефепиму, цефаклору. Содержание G+C в ДНК 67.3 %. Отличительной характеристикой изолята являлось продуцирование промышленно значимых гидролитических ферментов, таких как амилаза, протеаза, β-галактозидаза и оксиредуктазы – каталазы при концентрации NaCl в среде 25 %. Местообитание: солончаковые почвы на территории Терско-Кумской низменности (Республика Дагестан, Россия). Остальные галофильные изоляты *H. ventosae* G1 (MW386469), *H. elongata* G3 (MW386471), *V. salinarius* B2 (MW386472) и *V. salinarius* B3 (MW386473) имели высокую степень сходства (100 %) с типовыми штаммами *H. elongata* DSM 2581^T и *V. salarius* DSM 18441^T; содержание G+C в ДНК составляло 65.8, 66.5, 42.8 и 37.3 % соответственно. Штаммы имели высокий биотехнологический потенциал при концентрации NaCl в среде 5 и 25 %. Полученные данные расширили представление о разнообразии и экологическом значении денитрифицирующих бактерий в функционировании засушливых экосистем и выявлении штаммов, продуцирующих ферменты промышленного значения.

Ключевые слова: бактерии; род *Halomonas*; род *Virgibacillus*; соленые озера; почвы; солончаки; биотехнологический потенциал.

Для цитирования: Халилова Э.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А., Абакарова А.А., Черных Н.А., Аливердиева Д.А. Галофильные бактерии соленых озер и солончаковых почв Прикаспийской низменности (Республика Дагестан) и их биотехнологический потенциал. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):224-233. DOI 10.18699/VJ21.026

Halophilic bacteria of salt lakes and saline soils of the Peri-Caspian lowland (Republic of Daghestan) and their biotechnological potential

Е.А. Khalilova¹✉, S.T. Kotenko¹, E.A. Islammagomedova¹, A.A. Abakarova¹, N.A. Chernyh¹, D.A. Aliverdiyeva¹

¹ Precaspian Institute of Biological Resources of the Daghestan Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Makhachkala, Daghestan, Russia

² Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

✉ eslanda61@mail.ru

Abstract. The article presents the results of studying the biodiversity and biotechnological potential of halophilic microorganisms from the thermal highly mineralized Berikye Lake, the salty Lake Tarumovskoye and saline soils of the Peri-Caspian Lowland (Republic of Daghestan). Denitrifying halophilic bacteria of the genus *Halomonas* and *Virgibacillus* were identified using microbiological methods and 16S rRNA gene analysis. A new species *Halomonas* sp. G2 (MW386470) with a similarity of the nucleotide sequences of the 16S rRNA genes is 95 %. Strain G2 is an extreme halophile capable of growing in the range of 5–25 % NaCl (optimum 25 %) and forming a carotenoid pigment. Mesophil, 30–37 °C (optimum 30 °C); neutrophil,

pH 6–8 (optimum 7.2–7.4). Strain G2 chemolithotroph; reduces nitrate or nitrite as electron donors; catalase-, amylase-, protease- and β -galactosidase-positive; lipase-, oxidase- and urease-negative. Not able to hydrolyze inositol, indole; produces lysine, gelatin, ectoine; uses citrate and sodium malate as a source of carbon and energy; does not produce ornithin, H_2S or acid from d-mannose, sucrose, glycerol, cellobiose, except for lactose and d-glucose. Susceptible to trimethoprim, ciprofloxacin, ofloxacin, kanamycin, vancomycin, rifampicin, cefuroxime, ampicillin, ceftazidime, fosfomycin, clarithromycin, cefepime, cefaclor. The G+C content in DNA is 67.3 %. A distinctive characteristic of the isolate was the production of industrially significant hydrolytic enzymes such as amylase, protease, β -galactosidase, and oxidoreductase (catalase) at a NaCl concentration of 25 % in the medium. Habitat: saline soils on the territory of the Tersko-Kumskaya lowland (Republic of Daghestan, Russia). The rest of the halophilic isolates of *H. ventosae* G1 (MW386469), *H. elongata* G3 (MW386471), *V. salinarius* B2 (MW386472), and *V. salinarius* B3 (MW386473) had a high degree of similarity (100 %) with the type strains of *H. elongata* DSM 2581^T and *V. salarius* DSM 18441^T; the content of G+C in DNA was 65.8, 66.5, 42.8 and 37.3 %, respectively. The strains had a high biotechnological potential at NaCl concentrations of 5 and 25 % in the medium. The data obtained expanded the understanding of the diversity and ecological significance of denitrifying bacteria in the functioning of arid ecosystems and make it possible to identify strains producing enzymes of industrial importance.

Key words: bacteria of the genus *Halomonas* and *Virgibacillus*; salt lakes; salt marshes soils; biotechnological potential.

For citation: Khalilova E.A., Kotenko S.T., Islammagomedova E.A., Abakarova A.A., Chernykh N.A., Aliverdiyeva D.A. Halophilic bacteria of salt lakes and saline soils of the Peri-Caspian lowland (Republic of Daghestan) and their biotechnological potential. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):224-233. DOI 10.18699/VJ21.026

Введение

Экстремофильные микроорганизмы представляют большой интерес благодаря их биологической исключительности. Немалая заслуга в изучении природных микробных сообществ принадлежит школе российских ученых (Заварзин, 2004; Namsaraev et al., 2010; Bonch-Osmolovskaya, Atomi, 2015). Доминирующее положение в экологических нишах с высоким содержанием солей (солнечные солеварни, океаны и моря, гиперсоленые озера, солончаковые почвы, пустыни, растения, соленые продукты) и антропогенных экосистемах с повышенным уровнем минерализации занимают археи и высокоспециализированные бактерии родов *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Micrococcus* и *Pseudomonas* (Wang et al., 2019; Banciu et al., 2020; Begmatov et al., 2020).

Соленые и гиперсоленые почвы и водоемы являются важнейшей составляющей крупнейших экосистем на планете (Ghosh et al., 2019). Дагестан – уникальная природная провинция России, обладающая многообразием природных ландшафтов благодаря влиянию тектонических процессов, эрозионной деятельности текущих вод, трансгрессивной и регрессивной динамике Каспийского моря, засушливому климату. В ряде работ исследуются микробные сообщества различных экологических ниш этого региона: литотрофные сероокисляющие представители сульфидных источников, углеводородокисляющие бактерии геотермального источника Кизлярского месторождения (Черноусова и др., 2008; Гриднева и др., 2009; Халилова и др., 2014).

В высокоминерализованных озерах Терско-Кумской низменности с повышенной соленостью формируются условия для существования галофильных бактерий. Микроорганизмы из экстремальных мест обитаний являются продуцентами ценных, промышленно значимых ферментов, антибиотиков, могут участвовать в биодegradации почв, обладают повышенной устойчивостью к контаминации посторонней микрофлорой (Corral et al., 2020).

Нами проведены исследования пространственного распределения галофильных микробных сообществ растений-галофитов, засоленных почв и высокоминерализованных озер в засушливых регионах Прикаспийской

низменности (Халилова и др., 2017, 2020). Показано, что основными компонентами микробной флоры Терско-Кумской и Терско-Сулакской провинций были хемоорганогетеротрофные бактерии родов *Virgibacillus*, *Bacillus*, *Halomonas* и *Salimicrobium* из филумов *Firmicutes* и *Proteobacteria*. Выявлена значительная корреляция между изолированными микробными сообществами и концентрациями химических элементов и соединений (Na, K, Ca, Mg, Cl, Cu, Sr, SO_4 , Cl, HCO_3), служащими одними из главных регуляторов микробиологической активности в почвах и озерах.

Целью настоящей работы было молекулярно-таксономическое исследование изолированных галофильных бактерий и изучение их биотехнологического потенциала.

Материалы и методы

Объектом исследований служили природные микробные сообщества соленых водоемов и почв на территории Прикаспийской низменности Республики Дагестан (Халилова и др., 2020) (табл. 1). Пробы отобраны в июле-сентябре 2014 г.

Культивирование. Для культивирования галофильных бактерий использовали модифицированную среду следующего состава (г/л): bacto yeast extract – 10.00, $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5.5H_2O$ – 3.0, NaCl – 50, 100, 250, KCl – 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 20.0, глицерин – 4.0 (Пат. РФ № 2115722, 1998; Пат. РФ № 2323226, 2008). В качестве субстрата применяли bacto-peptone (Difco, Испания) – 5 г/л; pH среды корректировали 1N HCl или 4M KOH (Россия) до 7.2–7.4 с помощью pH-метра Hanna Instrumentals pH 211 (Германия). Инкубирование культур осуществляли в микробиологическом инкубаторе Binder-115 (США) при рабочей температуре $(30–37) \pm 1$ °C в течение 3–20 дней.

Морфологию бактериальных клеток (морфология клеток, подвижность, наличие споробразования) изучали с помощью светового микроскопа CX21 FS1 (Olympus, Япония) и цифровой фотокамеры PoverShot A640 (Canon, Япония) при рабочем увеличении $\times 600$.

Эколого-физиологические характеристики роста (температура, pH, соленость). Влияние концентрации NaCl (0, 5, 10, 15, 25 %, вес:объем) в количестве 2 % от

Таблица 1. Штаммы галофильных бактерий и источники отбора проб

Номер штамма	Место выделения	Характеристика источника
G1	Терско-Кумская низменность, оз. Тарумовское (44°23'28" N, 46°33'55" E)	Вода хлоридно-гидрокарбонатно-сульфатно-натриевая, минерализация 73.5 г/л, температура 50–60 °C, pH 7.2–7.4 Концентрация доминирующих катионов, мг/л: Na ⁺ – 23.0, Ca ²⁺ – 1.56, K ⁺ – 1.36, Mg ²⁺ – 0.1, Sr ²⁺ – 0.27, Li ⁺ – 0.08; анионов: Cl ⁻ – 44.0, HCO ₃ ²⁻ – 1.1, SO ₄ ²⁻ – 0.12. В минорном количестве присутствовали катионы Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ и NH ₄ ⁺
G2 G3	Терско-Кумская низменность, почва, солончак типичный (44°04'25" N, 46°32'10" E)	Почва – гидроморфное хлоридно-сульфатно-натриевое засоление; средние данные зимнего и летнего периода: температура 1.5–3.5 °C, +30...+46 °C; pH 8.0–9.0
B2 B3	Терско-Сулакская низменность, оз. Берикейское (42°13'25" N, 48°04'38" E)	Вода хлоридно-гидрокарбонатно-сульфатно-натриевая, минерализация 76.5 г/л, температура 55–60 °C, pH 6.4–6.5 Концентрация доминирующих катионов, мг/л: Na ⁺ – 25.4, Ca ²⁺ – 2.5, K ⁺ – 0.59, V ⁺ – 0.33, Mg ²⁺ – 0.3, Sr ²⁺ – 0.26, Ba ⁺ – 0.23, Br ⁺ – 0.165, Li ⁺ – 0.11; анионов: Cl ⁻ – 46.0, HCO ₃ ²⁻ – 1.35, SO ₄ ²⁻ – 0.24; кислот: H ₃ BO ₃ – 0.33, H ₂ SiO ₃ – 0.15 г/л. В минорном количестве присутствовали катионы Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , As ³⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺ , Fe ²⁺ , NH ₄ ⁺ и анионы SO ₄ ²⁻ , I ⁻

объема среды на рост клеток в жидких и твердых средах определяли при 30–37 °C в инкубаторе Binder-115 (США). Рост отслеживали с 24-часовыми интервалами в течение 7 дней путем измерения мутности на спектрофотометре Genesys-20 (Thermo Spectronic, США). Влияние температуры (30 и 37 °C) на скорость роста устанавливали культивированием при тех же условиях.

Воздействие субстратов роста (усвоение органических кислот, образование кислоты из углеводов, восстановление нитратов в нитриты) изучали стандартными методами (Gordon, Smith, 1953; Holt et al., 1997; Нетрусов и др., 2005).

Акцепторы электронов. Способность к использованию нитрата в качестве акцептора электронов определяли с применением дисков BD BBL Taxo Differentiation Discs Nitrate (Becton Dickinson and Company, Австралия), согласно инструкции фирмы-производителя. Диски пропитаны раствором, содержащим 40 % нитрата калия и 0.1 % молибдата натрия. Восстановление нитрата до нитрита исследовали добавлением сульфаниловой кислоты и N,N-диметил-α-нафтиламина, который реагирует с нитритом с образованием вещества, имеющего красную окраску, – п-сульфобензолазо-α-нафтиламина (положительный результат). При отсутствии изменения окраски после добавления реагентов (отрицательный результат) добавляли цинковую пыль для обнаружения невосстановленного нитрата или продуктов, отличных от нитрита.

Ферментативная активность. Бактерии, продуцирующие гидролазу, подвергали скринингу на чашках с крахмалом, трибутирином и желатиновым агаром на амилазу, протеиназу, β-галактозидазу, лактазу, липазу, уреазу, а также на оксиредуктазы (каталазы, оксидазы) в зависимости от концентраций NaCl.

Амилазную активность изучали в электролитной среде (крахмал 1.0 %, пептон 0.5 %, дрожжевой экстракт 0.3 %, NaCl 1.0 %). Изоляты инкубировали при 45 °C в течение 24–36 ч, тестировали раствором Люголя (10.0 г калия йодида, 5 г йода, 100 мл дистиллированной воды). Потенциальные продуценты амилазы выбирали на основе

отношения диаметра зоны клиренса к диаметру колонии. Протеазу определяли на средах с агаром и 10 % обезжиренным молоком; β-галактозидазу (лактазу) – с помощью индикаторных дисков, пропитанных специальным реактивом (орто-нитрофенил-β-d-галактопиранозидом, Conda, Испания). Уреазу проверяли с использованием CLO теста (Kimberly-Clark, США); липазу – на чашках с 1 % трибутирином. Изоляты, показавшие четкие зоны гидролиза трибутирина, были идентифицированы как бактерии, продуцирующие липазу.

Определение оксиредуктаз: каталаза – с использованием 3 % H₂O₂ в качестве субстрата в среде в течение 24–48 ч, оксидаза – методом Ковача (Steel, 1961). Все скрининговые тесты на ферментативную активность были выполнены в трех повторностях. Инкубация бактерий осуществлялась при 37 °C в течение 7 дней.

Устойчивость к антибиотикам (триметоприм, ципрофлоксацин, офлоксацин, канамицин, ванкомицин, рифампицин, цефуроксим, ампициллин, цефтазидим; фосфомицин, кларитромицин, цефепим, цефаклор) изучали по интенсивности бактериального роста на базовой агаризованной среде «В» в чашках Петри с помощью стандартных дисков «Системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов» НПО «Микроген» (холдинг «Надимбио», Россия) с 10–30 мкг антимикробного агента (Baumann P., Baumann L., 1986).

G+C состав и филогенетический анализ. Выделение геномной ДНК проводили согласно методам (Marmur, 1961; Thomas et al., 1997). Нуклеотидный состав ДНК определяли термической денатурацией (0.5 °C·мин⁻¹) с использованием спектрофотометра Cary-100 Bio UV-VIS (Varian, Австралия). Содержание G+C в составе ДНК – по методике (Owen et al., 1969). В качестве стандарта применяли ДНК *Escherichia coli* K-12 (51.7 %).

Для филогенетического анализа ДНК из образцов выделяли модифицированным щелочным методом Бирнбойма–Доли (Birnboim, Doly, 1979) и с помощью Wizard-технологии фирмы Promega (США) (Бульгина и др., 2002). Концентрация полученного препарата ДНК при этом

методе составляла 30–50 мкг/мл. РНК в препарате присутствует в следовых количествах (менее 1 %, согласно данным электрофоретического анализа, – не представлены).

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК для каждого из исследуемых образцов были использованы универсальные праймерные системы, позволяющие детектировать как зубактерии (11f-1492г) (Lane, 1991), так и археи (8fa-A915R) (Колганова и др., 2002). Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1× буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 2 мМ MgCl₂), по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы, по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл – 94 °С × 9 мин, 55 °С × 1 мин, 72 °С × 2 мин; последующие 30 циклов – 94 °С × 1 мин, 55 °С × 1 мин, 72 °С × 2 мин; завершающий цикл – 72 °С × 7 мин. Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 2 % агарозном геле при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов WizardPCRPreps (Promega, США) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование ПЦР-продуктов выполняли в Центре «Биоинженерия» РАН, Москва, по методу (Sanger et al., 1977) с помощью набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 на генетическом анализаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, США). Для секвенирования использовали стандартные праймеры (Camacho et al., 2009).

Анализ последовательностей 16S рРНК. Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов проводили в программе BLAST на сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Van de Peer, De Wachter, 1994).

Последовательности генов 16S рРНК всех изучаемых штаммов депонированы в GenBank: G1 – MW386469, G2 – MW386470, G3 – MW386471, B2 – MW386472, B3 – MW386473.

Результаты и обсуждение

Штаммы галофильных бактерий G1, G2, G3, B2 и B3, выделенные из соленых озер и солончаков Терско-Кумской и Терско-Сулакской низменностей, росли при температуре 30–37 °С и pH 6.4–7.4. Культуры демонстрировали устойчивый рост на агаризованной элективной среде в присутствии 5–25 % NaCl с оптимумом 5, 10, 25 %, что указывало на их принадлежность к умеренным и экстремальным галофилам в соответствии с известной классификацией (Kushner, Kamekura, 1988).

Определено филогенетическое положение выделенных штаммов. Для этого проанализированы последовательности генов 16S рРНК новых галофильных штаммов и проведено сравнение их с последовательностями 16S рРНК валидно описанных видов бактерий. Анализ показал, что новые изоляты относятся к двум родам бактерий, также содержащих галофильные микроорганизмы *Halomonas* и *Virgibacillus* (табл. 2, рис. 1). При этом штамм G2 представляет новый вид в роде *Halomonas*. Штаммы *H. ventosae* G1 (MW386469) и *H. elongata* G3 (MW386471), по всей

Таблица 2. Сходство гена 16S рРНК галофильных бактерий, выделенных из соленых озер и солончаков Прикаспийской низменности, с наиболее близкородственными видами

Штамм	Ближайшие родственные виды	Уровень сходства последовательностей генов 16S рРНК, %
G1	<i>Halomonas ventosae</i>	99.0
G2	<i>Halomonas</i> sp.	96.8
G3	<i>Halomonas elongata</i>	100
B2	<i>Virgibacillus salinarium</i>	100
B3	<i>Virgibacillus salinarium</i>	100

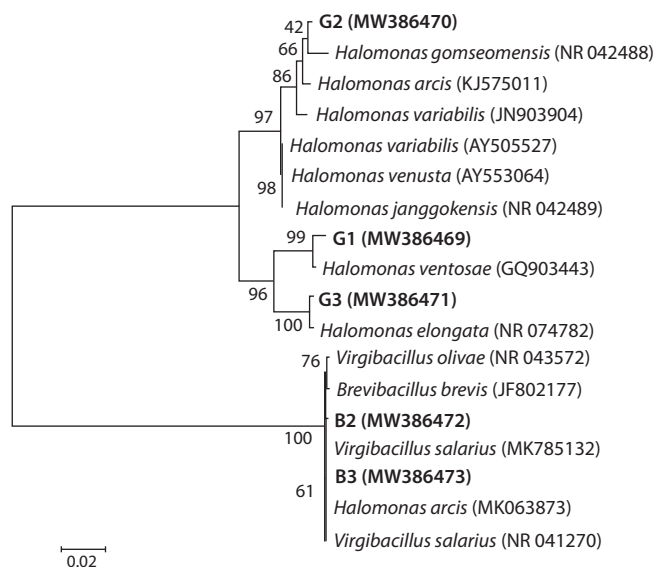


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method) на основе модели Tamura-Nei (Tamura, Nei, 1993) и MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

Всего использовано 18 последовательностей с минимальной длиной 1381 нуклеотид. Бар соответствует двум заменам на 100 нуклеотидов. Значения Bootstrap (500 повторов) показаны рядом с ветвями дерева.

видимости, относятся к видам *H. ventosae* и *H. elongata* соответственно, а штаммы *V. salinarium* B2 (MW386472) и *V. salinarium* B3 (MW386473) – к группе видов, родственных *V. salinarium*.

Характеристика штамма *Halomonas* sp. G2

Основным объектом дальнейших исследований являлся штамм *Halomonas* sp. G2. Содержание G+C в ДНК штамма составляло 67.3 %.

Морфология клеток и колоний. Палочковидные грамотрицательные подвижные палочки размером 0.8–1.0 × 1.5–3.0 мкм. Клетки встречались поодиночке, парами или короткими цепочками (рис. 2, з). Подвижность клеток обеспечивалась за счет одного или двух боковых жгутиков, расположенных с одной стороны клетки. На элективной твердой среде штамм демонстрировал активный рост колоний округлой формы с волнистым краем, желтого и темно-палевого цвета с блеском. С увеличением

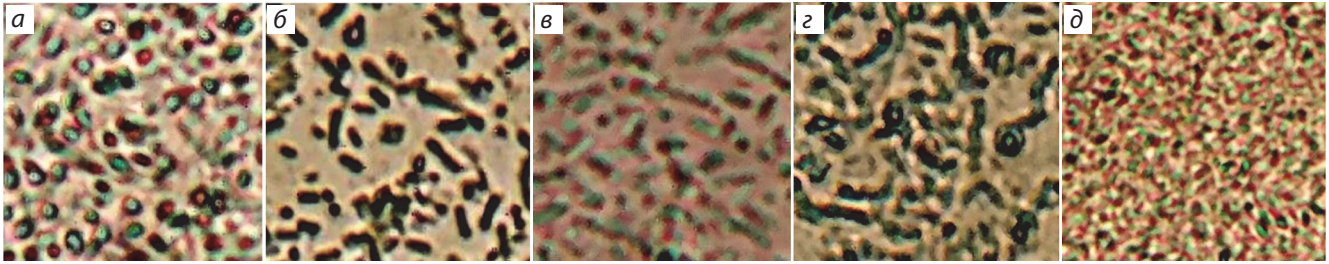


Рис. 2. Морфология клеток штаммов из проб воды и почвы: а – *V. salinarium* B2; б – *V. salinarium* B3; в – *H. elongata* G1; з – *Halomonas* sp. G2; д – *H. elongata* G3.

Световая микроскопия, увеличение $\times 600$.

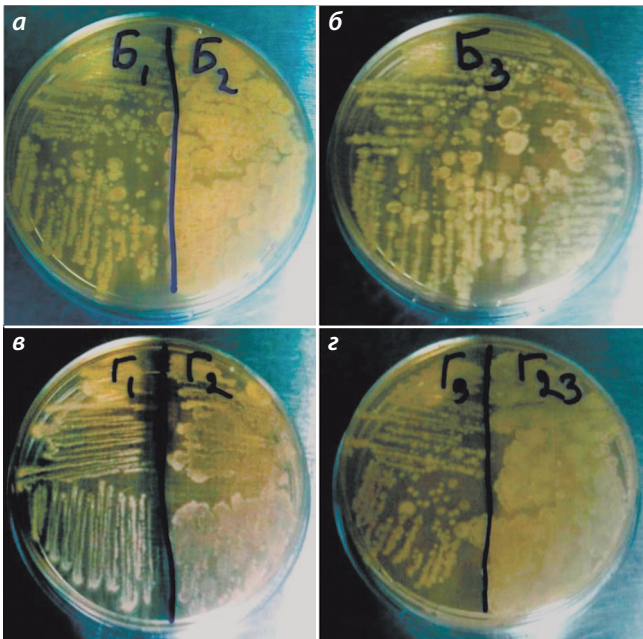


Рис. 3. Рост выделенных чистых культур бактерий на МПА: а – *V. salinarium* B2; б – *V. salinarium* B3; в – *H. elongata* G1, *Halomonas* sp. G2; з – *H. elongata* G3.

концентрации NaCl в среде культивирования в колониях бежевого цвета появлялся яркий каротиноидный пигмент. На мясо-пептонном агаре (МПА) образовывал гладкие блестящие, светло-бежевые с розовинкой, мелкие колонии округлой формы и с волнистым краем, расположенные близко друг к другу цепочкой и переходящие в сплошной рост. Во всех вариантах наблюдалась мажущая консистенция (рис. 3, з).

Физиология роста штамма (температура, pH, соленость). При определении оптимальных параметров роста штамм G2 отнесен к мезофилам (от 30 до 37 °C, оптимум 30 °C) и умеренным алкалофилам (pH 6–8, оптимум 7.2–7.4). Как представитель рода *Halomonas*, способен расти в широком диапазоне концентрации NaCl – от 10 до 25 %, с оптимумом 25 %; экстремальный галофил.

Акцепторы электронов, влияние субстратов, отношение к кислороду. Штамм G2 способен осуществлять денитрификацию, используя в качестве акцептора электронов нитраты, восстанавливая их до нитритов.

Дифференцирующие характеристики штамма G2 представлены в табл. 3. Штамм имел положительную реакцию на лизин, желатин, эктоин, лактозу и d-глюкозу; утилизировал цитрат и малонат Na. Тесты на β -галактозидазу, амилазу, протеазу и каталазу положительные; на оксидазу, липазу и уреазу – отрицательные. В анаэробных условиях рост не происходит.

Чувствительность к антибиотикам. Культура G2 отличалась чувствительностью к триметоприму из группы сульфаниамидов; фторхинолонам первого и второго поколения (ципрофлоксацин, офлоксацин, канамицин); ванкомицину из макролидной группы; рифампицину из группы рифамицинов; цефуроксиму и ампициллину из группы пенициллинов; антибиотикам третьего поколения цефалоспоринов из группы макролидов (цефтазидим, фосфомицин и кларитромицин); антибиотикам четвертого поколения цефалоспоринов (цефепим, цефаклор).

Характеристика изолятов G1, G3, B2, B3

Палочковидные подвижные клетки штаммов G1, G3 имели размеры 0.6–0.8 \times 1.6–1.9 мкм (G1) и 0.7–1.0 \times 1.5–2.5 мкм (G3) (см. рис. 2, в, д). Наблюдались одиночные клетки и цепочки из них. Подвижность обеспечивалась за счет жгутиков, расположенных с одной стороны клетки. Клетки штаммов B2 и B3 – подвижные, в форме палочек размерами 0.5–0.7 \times 1.0–2.5 мкм (B2) и 0.2–0.7 \times 1.0–5.0 мкм (B3). Образовывали эндоспores. Биомасса изолированных штаммов на среде МПА представлена цепочкой расположенных друг за другом колоний, различающихся формой, цветом, размером, пигментом и морфологией (см. рис. 3, а, б). На элективной агаровой среде с 5–25 % NaCl (G1, G3) и 5–10 % NaCl (B2, B3) культуры формировали колонии с липохромным пигментом.

Результаты филогенетического анализа последовательностей генов 16S рРНК свидетельствовали о том, что ближайшим типовым штаммом (100 %) для G1 и G3 являлся штамм *H. elongata* DSM 2581^T, для B2 и B3 – *V. salarius* DSM 18441^T. На дендрограмме культуры образовали общий с типовыми штаммами кластер, что позволяло причислить изолированные культуры к этим видам. Родственными культурами для G1 и G3 были *H. ventosae* GQ903443, *H. elongata* NR 074782; для B2 и B3 – *V. salarius* MK785132, *B. brevis* JF802177, *V. olivae* NR 043572, *H. arcis* MK063873, *V. salarius* NR 041270, которые объединены типичными признаками умеренных и экстремальных галофилов.

Таблица 3. Сравнительные дифференцирующие признаки новых штаммов рода *Halomonas* и типового штамма *H. elongata* DSM 2581^T

Фенотипические признаки	<i>H. ventosae</i> G1 (MW386469)	<i>Halomonas</i> sp. G2 (MW386470)	<i>H. elongata</i> G3 (MW386471)	<i>H. elongata</i> DSM 2581 ^T (Vreeland et al., 1980; Schwibbert et al., 2011; Kindzierski et al., 2017)
Восстановление NO ₃ в нитриты	+	+	+	+
Субстраты				
эктоин	+	+	+	+
желатин	+	+	+	+
орнитин	+	–	+	+
лизин	+	+	+	+
цитрат натрия	+	+	–	+
малонат натрия	+	+	+	Н
сахароза	–	–	–	+
глицерин	–	–	–	+
d-манноза	–	–	–	+
целлобиоза	–	–	–	+
лактоза	–	+	–	+
d-глюкоза	+	+	+	+
Продуцирует ферменты				
оксидаза	–	–	–	–
уреаза	–	–	–	+
липаза	+	–	–	Н
β-галактозидаза	+	+	+	+
каталаза	+	+	+	+
амилаза	+	+	+	–
протеаза	+	+	–	–
Содержание G+C в геномной ДНК, %	65.8	67.3	66.5	63.6

Примечание. «+» – положительно; «–» – отрицательно; «Н» – не исследовано.

Отличительными характеристиками, дифференцирующими культуры *H. ventosae* G1 и *H. elongata* G3, являлись: оптимум роста при 5–25 % NaCl против 32 %; pH 7.2–7.4 против 7–9; отсутствие утилизации сахарозы, глицерина, d-маннозы, целлобиозы, лактозы и продуцирования уреазы, оксидазы и протеазы (исключение G3) при концентрации NaCl в среде 5–25 % (см. табл. 3). Для штаммов *V. salarius* B2 и B3 в сравнении с типовым *V. salarius* DSM 18441^T такими признаками служили: отсутствие потребности в d-маннозе, способность к продуцированию ферментов амилазы, протеазы и β-галактозидазы при концентрации NaCl в среде 5–10 % (табл. 4).

Характеристика родов *Halomonas* и *Virgibacillus*

Далее мы приводим краткое описание штамма нового вида *Halomonas* sp. G2 и галофильных штаммов *H. ventosae* G1, *H. elongata* G3, *V. salinarius* B2, *V. salinarius* B3, сделанное на основании проведенных фенотипических и генетических исследований.

В настоящее время род *Halomonas* включает 91 вид, среди которых *H. elongata* выступает как типовой ([http://](http://www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html)

www.bacterio.cict.fr/h/halomonas.html). Впервые семейство Halomonadaceae было описано в 1988 г. при объединении умеренно галофильных и морских бактерий родов *Deleya* и *Halomonas* (Franzmann et al., 1988). В течение последних трех десятилетий многие виды были отнесены к роду *Halomonas*, домену Bacteria, филу Proteobacteria, классу Gammaproteobacteria, порядку Oceanospirillales, семейству Halomonadaceae; однако на момент написания 7 видов реклассифицированы. Представители рода – граммотрицательные факультативные анаэробы, аэробы, прототрофы, мезофилы, денитрифицирующие. Продуцируют экзополисахариды; преимущественно используют кислород, нитрат или нитрит в качестве акцептора электрона; в условиях солевого стресса синтезируют эктоин, обеспечивая защиту клеток от неблагоприятных воздействий окружающей среды (Schwibbert et al., 2011).

Род *Virgibacillus* создан в результате реклассификации рода *Bacillus* после анализа вида *Virgibacillus pantothenicus* (Heyndrickx et al., 1998; Heyrman et al., 2003). На данный момент род состоит из 27 видов, представители которых являются грамположительными облигатными

Таблица 4. Сравнительные дифференцирующие признаки галофильных штаммов *V. salarius* B2 и B3 с типовым *V. salarius* DSM 18441^T

Фенотипические признаки	<i>V. salarius</i> B2 (MW386472)	<i>V. salarius</i> B3 (MW386473)	<i>V. salarius</i> DSM 18441 ^T (SA-Vb1 ^T = JCM 12946 ^T) (Hua et al., 2008)
H ₂ S	–	–	–
Восстановление NO ₃ в нитриты	+	+	–
Субстраты			
индол	–	–	–
эскулин	H	H	+
лизин	–	+	+
цитрат натрия	+	+	–
малонат натрия	–	–	–
d-манноза	–	–	+
d-глюкоза	+	+	+
желатин	+	+	+
инозит	–	–	–
Продуцирует ферменты			
оксидаза	–	–	+
лактоза	–	–	H
уреаза	–	–	–
β-галактозидаза	+	+	H
каталаза	+	+	+
амилаза	+	+	H
протеаза	+	+	H
Содержание G+C в геномной ДНК, %	42.8	37.3	37.3

Примечание. «+» – положительно; «–» – отрицательно; «H» – не исследовано.

аэробами или факультативными анаэробами, умеренными галофилами, хемотаксономичными; основная жирная кислота – C_{15:0} (Lee et al., 2012).

Штамм нового вида *Halomonas* sp. G2. Клетки штамма G2 – капсулированные подвижные аэробные грамотрицательные палочки, 0.8–1.0 × 1.5–3.0 мкм. Встречались поодиночке или цепочкой из 2–4 сцепленных между собой клеток. Штамм G2 – экстремальный галофил, способен расти в диапазоне 10–25 % NaCl (оптимум 25 %) и образовывать каротиноидный пигмент. На элективной твердой среде с 25 % NaCl формирует колонии округлой формы с волнистым краем, бежевого цвета с блеском, образуя участки яркого каротиноидного пигмента. Штамм растет на мясопептонном бульоне. Мезофил, температурный диапазон 30–37 °C (оптимум 30 °C). Нейтрофил, pH 6–8 (оптимум 7.2–7.4). Штамм денитрифицирующий, хемолитотрофен. Редуцирует нитрат или нитрит в качестве доноров электронов; каталазо-, амилазо-, протеазо- и β-галактозидазоположительный; липазо-, оксидазо- и уреазоотрицательный. Не способен гидролизовать инозит, индол; продуцирует лизин, желатин, эктоин; в качестве источника углерода и энергии использует цитрат и малат натрия; не продуцирует орнитин; H₂S и кислоту из d-маннозы, сахарозы, глицерина, целлобиозы, кроме

лактозы и d-глюкозы. Восприимчив к триметоприму, ципрофлоксацину, офлоксацину, канамицину, ванкомицину, рифампицину, цефуросиму, ампициллину, цефтазидиму, фосфомицину, кларитромицину, цефепиму, цефаклору. Содержание G+C в ДНК 67.3 %.

На основании физиологических, биохимических и филогенетических свойств штамм G2 представляет собой новый вид, получивший название *Halomonas* sp. G2. Отличительная характеристика изолята – продуцирование гидролитических ферментов протеазы, амилазы, β-галактозидазы и оксиредуктазы – каталазы при 25 % концентрации NaCl в среде.

Местообитание: почва (солончак типичный) на территории Терско-Кумской низменности (Республика Дагестан, Россия).

Штаммы *Halomonas ventosae* G1 (MW386469) и *Halomonas elongata* G3 (MW386471). Штаммы *Halomonas* G1 и G3 – аэробы, грамотрицательные, денитрифицирующие; мезофилы, прототрофы, хемолитотрофы и экстремальные галофилы (от 5 до 25 % NaCl). Не способны гидролизовать инозит; продуцируют лизин, орнитин, желатин, эктоин; редуцируют нитрат или нитрит в качестве доноров электронов; утилизируют цитрат (исключение G3) и малонат натрия как источник углерода

и энергии; не продуцируют H_2S и кислоту из d-маннозы, сахарозы, глицерина, целлобиозы, кроме d-глюкозы. Содержание G+C в ДНК для G1 и G3 составляло 65.8 и 66.5 % соответственно. На основании фенотипической и генотипической характеристик изолированные бактерии классифицированы как *H. ventosae* G1 (MW386469) и *H. elongata* G3 (MW386471).

Местообитание: солончаковые почвы (Тарумовский район, Кочубейская биосферная станция) и оз. Тарумовское на территории Терско-Кумской низменности (Республика Дагестан, Россия). Типовой штамм *H. elongata* DSM 2581^T выделен при микробиологическом исследовании оборудования для добычи соли из рапы (Нидерландские Антильские острова, южный остров Бонайре).

Штаммы *V. salinarius* B2 (MW386472) и B3 (MW386473). Штаммы грамположительные; являются мезофилами, нейтрофилами, хемолитотрофами, умеренными галофилами (оптимум 5 и 10 % NaCl). Культуры не способны гидролизовать инозит, малонат натрия; не продуцировали лизин (исключение B3), индол, H_2S и кислоту из d-маннозы, сахарозы, кроме d-глюкозы; редуцировали нитрат до нитрита; способны к утилизации полипептидного субстрата желатина и цитрата натрия как источника углерода. Содержание G+C в ДНК штаммов B2 и B3 составляло 42.8 и 37.3 % соответственно. На основании фенотипической и генотипической характеристик выделенные культуры классифицированы как штаммы *V. salinarius* B2 (MW386472) и *V. salinarius* B3 (MW386473).

Местообитание: вода техногенного высокоминерализованного Берикейского озера (Дербентский район, Республика Дагестан, Россия). Типовой штамм *Virgibacillus salarius* DSM 18441^T выделен из соляной корки оз. Гарса в Шотт-эль-Гарса (Сахара) в Тунисе (Hua et al., 2008).

Биотехнологическая значимость галофильных микроорганизмов

Галофильные бактерии все чаще изучают на предмет их биотехнологического потенциала для производства биохимически активных и устойчивых ферментов к щелочному значению pH, высокой температуре и концентрации солей (Di Donato et al., 2019; Liu et al., 2019). Эти многоплановые свойства привлекательны для различных отраслей (Delgado-García et al., 2012), таких как производство ферментированных пищевых продуктов, текстильная, фармацевтическая, косметическая и кожевенная промышленность (De Lourdes Moreno et al., 2013). Большинство продуцентов внеклеточных гидролитических ферментов липазы, амилазы, протеазы, инулиназы, ксиланазы, целлюлазы, ДНКазы и пектиназы являются галофильными бактериями, в том числе штаммами родов *Halomonas* и *Virgibacillus* (Cira-Chávez et al., 2018; Liu et al., 2019; Kaitouni et al., 2020; Varrella et al., 2020).

Выделение природных штаммов в наших исследованиях позволило обнаружить новый вид *Halomonas* sp. G2 (MW386470) и новые штаммы *Halomonas* G1 (MW386469) и G3 (MW386471), *Virgibacillus* B2 (MW386472) и B3 (MW386473), способные к продуцированию гидролитических ферментов (амилаза, протеаза, лактаза, липаза, уреаза, β -галактозидаза) и оксиредуктаз (каталаза, оксидаза).

Заключение

Настоящие исследования подтвердили биотехнологическое и научное значение галофильных денитрифицирующих бактерий, обитающих в экстремофильных экологических нишах Прикаспийской низменности Республики Дагестан. Показано, что изолированные нами штаммы бактерий родов *Halomonas* и *Virgibacillus* не являются строго приуроченными к обитанию в соленых озерах и почвах Прикаспийской низменности (Республика Дагестан, Россия), а имеют широкий ареал распространения, включающий экологические ниши о. Бонайре (Нидерландские Антильские острова) и Туниса. Выделение и изучение природных штаммов позволило обнаружить новый вид *Halomonas* sp. G2 и дополнить коллекцию уже известных штаммов, продуцирующих промышленно значимые ферменты, такие как амилаза, протеаза, лактаза, липаза, уреаза, β -галактозидаза, каталаза и оксидаза.

Список литературы / References

- Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. Изучение нуклеотидных последовательностей *nifH* генов у представителей метанотрофных бактерий. *Микробиология*. 2002;71(4):500-508. [Bulygina E.S., Kuznetsov B.B., Marusina A.I., Kravchenko I.K., Bykova S.A., Kolganova T.V., Galchenko V.F. Study of nucleotide sequences of *nifH* genes in methanotrophic bacteria. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2002;71(4):425-432.]
- Гриднева Е.В., Грабович М.Ю., Дубинина Г.А., Черноусова Е.Ю., Акимов В.Н. Экофизиология литотрофных сероокисляющих представителей рода *Sphaerotilus* – обитателей сульфидных источников Северного Кавказа. *Микробиология*. 2009;78(1):89-97. [Gridneva E.V., Grabovich M.Yu., Dubinina G.A., Chernousova E.Yu., Akimov V.N. Ecophysiology of lithotrophic sulfur-oxidizing *Sphaerotilus* species from sulfide springs in the Northern Caucasus. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2009;78(1):76-83.]
- Заварзин Г.А. Изучение микробного разнообразия в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского. *Микробиология*. 2004;73(5):598-612. [Zavarzin G.A. Microbial diversity studies at the Winogradsky Institute of Microbiology. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2004;73(5):509-522. DOI 10.1023/B:MICI.0000044242.93603.00.]
- Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П. Подбор и тестирование олигонуклеотидных праймеров для амплификации и секвенирования генов 16S рРНК архей. *Микробиология*. 2002;71(2):283-286. [Kolganova T.V., Kuznetsov B.B., Turova T.P. Designing and testing of oligonucleotide primers for amplification and sequencing of 16S rRNA genes of archaea. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2002;71(2):243-246.]
- Кузнецов А.Е., Каленов С.В. Патент RU 2323226. Способ получения биомассы галобактерий. Бюл. № 12. 2008;6. [Kuznetsov A.E., Kalenov S.V. Russian Federation Patent RU 2323226. Method for preparing halophilic bacterium biomass. Bull. No. 12. 2008;6. (in Russian)]
- Лалов В.В., Осокина Н.В., Пиорунский Д.А., Чижиков М.А. Патент RU 2115722 C1. Способ получения биомассы галобактерий. 1998;5. [Lalov V.V., Osokina N.V., Piorunskij D.A., Chizhikov M.A. Russian Federation Patent RU 2115722 C1. Method of halophilic microorganism culturing. 1998;5 (in Russian)]
- Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. М.: Академия, 2005. [Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. Laboratory Manual on Microbiology for college students. Moscow: Akademiya Publ., 2005. (in Russian)]

- Халилова Э.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А., Гасанов Р.З., Абакарова А.А., Аливердиева Д.А. Экстремофильные микробные сообщества засоленных почв и их разнообразие в регионе Прикаспийской низменности. *Аридные экосистемы*. 2017; 23(2):58-63.
[Khalilova E.A., Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A., Hasanov R.Z., Abakarova A.A., Aliverdiyeva D.A. Extremophilic microbial communities of saline soils and their diversity in the regions of the Caspian depression. *Aridnye Ekosistemy = Arid Ecosystems*. 2017;7(2):116-120. DOI 10.1134/S2079096117020068.]
- Халилова Э.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А., Гасанов Р.З., Абакарова А.А., Аливердиева Д.А. Галофильные микробные сообщества и их биоразнообразие в засушливых регионах Прикаспийской низменности. *Аридные экосистемы*. 2020;26(1):94-101. DOI 10.24411/1993-3916-2020-10088.
[Khalilova E.A., Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A., Hasanov R.Z., Abakarova A.A., Aliverdiyeva D.A. Halophilic microbial communities and their biodiversity in the arid regions of the Caspian Lowland. *Aridnye Ekosistemy = Arid Ecosystems*. 2020;10(1):79-85. DOI 10.1134/S2079096120010084.]
- Халилова Э.А., Нуратинов Р.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А. Углеводородоокисляющие микроорганизмы геотермального источника и их значение в оценке биоразнообразия микробных сообществ. *Аридные экосистемы*. 2014;20(1):51-58.
[Khalilova E.A., Nuratinov R.A., Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms of hot springs and their significance in the assessment of the biodiversity of microbial communities. *Aridnye Ekosistemy = Arid Ecosystems*. 2014;4(1):25-30. DOI 10.1134/S2079096114010028.]
- Черноусова Е.Ю., Акимов В.Н., Гриднева Е.В., Дубинина Г.А., Грабович М.Ю. Филогенетический *in situ/ex situ* анализ микробного сообщества серного мата из термального сульфидного источника Северного Кавказа. *Микробиология*. 2008;77(2):255-260.
[Chernousova E.Yu., Akimov V.N., Gridneva E.V., Dubinina G.A., Grabovich M.Yu. Phylogenetic *in situ/ex situ* analysis of a sulfur mat microbial community from a thermal sulfide spring in the North Caucasus. *Mikrobiologiya = Microbiology*. 2008;77(2):219-223. DOI 10.1134/S002626170802015X.]
- Banciu H.L., Enach M., Rodriguez R.M., Oren A., Ventosa A. Ecology and physiology of halophilic microorganisms – Thematic issue based on papers presented at Halophiles 2019 – 12th International Conference on Halophilic Microorganisms, Cluj-Napoca, Romania, 24–28 June, 2019. *FEMS Microbiol. Lett.* 2020;366(23):1-4. DOI 10.1093/femsle/fnz250.
- Baumann P., Baumann L. The marine gram-negative Eubacteria. In: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G. (Eds.). *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Berlin: Springer-Verlag, 1986;2:1302-1331.
- Begmatov Sh.A., Selitskaya O.V., Vasileva L.V., Berestovskaja Yu.Yu., Manucharova N.A., Drenova N.V. Morphophysiological features of some cultivable bacteria from saline soils of the Aral Sea region. *Eur. J. Soil Sci.* 2020;53(1):90-96. DOI 10.1134/S1064229320010044.
- Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7(6):1513-1523.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Atomi H. Editorial overview: Extremophiles: from extreme environments to highly stable catalysts. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015;25:88-96.
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform.* 2009;10(421):1-9. DOI 10.1186/1471-2105-10-421.
- Cira-Chávez L.A., Guevara-Luna J., Soto-Padilla M.Y., Román-Ponce B., Vásquez-Murrieta M.S., Estrada-Alvarado M.I. Kinetics of halophilic enzymes. In: Rajendran L., Fernandez C. (Eds.). *Kinetics of Enzymatic Synthesis*. IntOpen, 2018;1-25. DOI 10.5772/intechopen.81100.
- Corral P., Amoozegar M.A., Ventosa A. Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. *Marine Drugs*. 2020;18:2-33. DOI 10.3390/md18010033.
- Delgado-García M., Valdivia-Urdiales B., Aguilar-Gonzalez C.N., Contreras-Esquivel J.C., Rodriguez-Herrera R. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J. Sci. Food Agric.* 2012;92(13):2575-2580. DOI 10.1002/jsfa.5860.
- De Lourdes Moreno M., Pérez D., García M.T., Mellado E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*. 2013;3(1):38-51. DOI 10.3390/life3010038.
- Di Donato P., Buono A., Poli A., Finore I., Abbamondi R.G., Nicolaus B., Lama L. Exploring marine environments for the identification of extremophiles and their enzymes for sustainable and green bioprocesses. *Sustainability*. 2019;11:149-169. DOI 10.3390/su11010149.
- Franzmann P.D., Wehmeyer U., Stackebrandt E. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Syst. Appl. Microbiol.* 1988;11:16-19.
- Ghosh S., Kumar S., Kumar Khare S. Microbial diversity of saline habitats: an overview of biotechnological applications. In: Giri B., Varma A. (Eds.). *Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions* (Ser. Soil Biology. 56). Cham: Springer, 2019;65-92. DOI 10.1007/978-3-030-18975-4_4.
- Gordon R.E., Smith M.M. Rapidly growing, acid fast bacteria. I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *J. Bacteriol.* 1953;66(1):41-48.
- Heyndrickx M., Lebbe L., Kersters K., De Vos P., Forsyth G., Logan N.A. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998;48(1):99-106. DOI 10.1099/00207713-48-1-99.
- Heyrman J., Logan N.A., Busse H.-J., Balcaen A., Lebbe L., Rodriguez-Diaz M., Swings J., De Vos P. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003;53(2):501-511. DOI 10.1099/ijs.0.02371-0.
- Holt J.R., Corey D.P., Eatock R.A. Mechano-electrical transduction and adaptation in hair cells of the mouse utricle, a low-frequency vestibular organ. *J. Neurosci.* 1997;17:8739-8748.
- Hua N.P., Hamza-Chaffai A., Vreeland R.H., Isoda H., Naganuma T. *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008;58:2409-2414. DOI 10.1099/ijs.0.65693-0.
- Kaitouni L.B.D., Anissi J., Sendide K., Hassouni M.E. Diversity of hydrolase-producing halophilic bacteria and evaluation of their enzymatic activities in submerged cultures. *Annals Microbiol.* 2020; 70:33. DOI 10.1186/s13213-020-01570-z.
- Kindzierski V., Raschke S., Knabe N., Siedler F., Scheffer B., Grau K.P., Pfeiffer F., Oesterheld D., Marin-Sanguino A., Kunte H.J. Osmoregulation in the halophilic bacterium *Halomonas elongata*: a case study for integrative systems biology. *PLoS One*. 2017;12(1):1-22. DOI 10.1371/journal.pone.0168818.
- Kushner D.J., Kamekura M. Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodríguez-Varela F. (Ed.). *Halophilic Bacteria*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1988;1:109-138.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.). New York: John Wiley & Sons, 1991;115-175.
- Lee S.-Y., Kang C.-H., Oh T.K., Yoon J.H. *Virgibacillus campisalis* sp. nov., from a marine solar saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012;62:347-351. DOI 10.1099/ijs.0.033084-0.

- Liu C., Baffoe D.K., Zhang M. Halophile, an essential platform for bio-production. *J. Microbiol. Methods*. 2019;166:105704. DOI 10.1016/j.mimet.2019.105704.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 1961;3:208-218. DOI 10.1016/S0022-2836(61)80047-8.
- Namsaraev Z.B., Babasanova O.B., Dunaevsky Y.E., Akimov V.N., Barkhutova D.D., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B. *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, Central Mongolia. *Microbiology*. 2010;79(4):491-499.
- Owen R.J., Hill L.R., Lapage S.P. Determination of DNA base composition from melting profiles in dilute buffers. *Biopolymers*. 1969; 7:503-516.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977;84:5463-5467.
- Schwibbert K., Marin-Sanguino A., Bagyan I., Heidrich G., Lentzen G., Seitz H., Rampp M., Schuster S.C., Klenk H.P., Pfeiffer F., Oesterhelt D., Kunte H.J. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Environ. Microbiol.* 2011;13:1973-1994. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02336.
- Steel K.J. The oxidase reaction as a taxonomic tool. *J. Gen. Microbiol.* 1961;25:297-306.
- Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 1993;10:512-526.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:2725-2729.
- Thomas J.C., Khour R., Neeley C.K., Akroush A.M., Davies E.C. A fast CTAB method of human DNA isolation for polymerase chain reaction applications. *Biochem. Educ.* 1997;25(4):233-235. DOI 10.1016/S0307-4412(97)00122-2.
- Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 1994; 10:569-570. DOI 10.1093/bioinformatics/10.5.569.
- Varrella S., Tangherlini M., Corinaldesi C. Deep hypersaline anoxic basins as untapped reservoir of polyextremophilic prokaryotes of biotechnological interest. *Mar. Drugs*. 2020;18(2):91. DOI 10.3390/md18020091.
- Vreeland R.H., Litchfield C.D., Martin E.L., Elliot E. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1980;3(2):485-495. DOI 10.1099/00207713-30-2-485.
- Wang T., Zhang L., Bo L., Zhu Y., Tang X., Liu W. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at high concentrations of NaCl by *Halomonas* bacteria. *IOP Conf. Ser.: Earth. Environ. Sci.* 2019;237(5):052033. DOI 10.1088/1755-1315/237/5/052033.

ORCID ID

S.C. Kotenko orcid.org/0000-0002-7099-873X
E.A. Islammagomedova orcid.org/0000-0002-9897-1256
A.A. Abakarova orcid.org/0000-0003-0888-9580
N.A. Chernyh orcid.org/0000-0003-3092-7539
D.A. Aliverdieva orcid.org/0000-0002-4784-4548

Благодарности. Работа Н.А. Черных выполнена при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Авторы выражают благодарность к.б.н. Е.Н. Детковой за помощь в определении G+C состава в ДНК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 12.09.2020. После доработки 02.02.2021. Принята к публикации 02.02.2021.