

Научная статья

УДК 579.2(517.3)

DOI: 10.18101/2542-0623-2022-4-23-37

РАЗНООБРАЗИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГАЛОФИЛЬНЫХ И ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ В ОСАДКАХ СОДОВЫХ ОЗЕР БЕЛОЗЕРСКОЙ ГРУППЫ (РЕСПУБЛИКА БУРЯТИЯ)

С. В. Зайцева, Е. П. Никитина, Ч. Сун, Е. Ю. Абидуева

© Зайцева Светлана Викторовна

кандидат биологических наук,

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

svet_zait@mail.ru

© Никитина Елена Петровна

младший научный сотрудник,

Байкальский институт природопользования СО РАН

Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

lenauude@mail.ru

© Сун Ченгхан

профессор,

Институт медицинской биотехнологии Китайской академии медицинских наук,

Китай, 100050, г. Пекин, Си Ли Тянь Тань, 1

chenghangsun@hotmail.com

© Абидуева Елена Юрьевна

доктор биологических наук,

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

abidueva_1@mail.ru

Аннотация. Впервые исследовано культивируемое разнообразие актинобактерий в осадках содовых озер Верхнее Белое и Нижнее Белое (Республика Бурятия). Выделен 61 штамм алкалофильных, галофильных и галотолерантных актинобактерий, которые на основании сходства последовательностей гена 16S рРНК представляли 13 родов и 37 видов. Были идентифицированы таксоны, которые ранее не выделялись из содовых озер. Показано влияние минерализации на распространение и разнообразие культивируемых актинобактерий. Галофильные актинобактерии доминировали в микробном сообществе озера Верхнее Белое с минерализацией 34 г/л. В поверхностных осадках оз. Нижнее Белое с минерализацией 20 г/л культивируемое сообщество актинобактерий было более разнообразным, с преобладанием в составе галотолерантных штаммов.

Ключевые слова: микробная экология, содовые озера, галофильные актинобактерии.

Благодарности

Работа выполнена в рамках темы госзадания № 121030100229-1 и частично за счет гранта CAMS 2017-269 I2M-B&R-08.

Для цитирования

Разнообразие культивируемых галофильных и галотолерантных актинобактерий в осадках содовых озер белозерской группы (Республика Бурятия) / С. В. Зайцева, Е. П. Никитина, Ч. Сун, Е. Ю. Абидуева // Природа Внутренней Азии. Nature of Inner Asia. 2022. № 4. С. 23–37. DOI: 10.18101/2542-0623-2022-4-23-37

Введение

Галофильные и галотолерантные актинобактерии повсеместно распространены в соленых местообитаниях, в том числе, в морских экосистемах, внутриконтинентальных содовых и соленых озерах, приозерных солончаках, засоленных и щелочных почвах [Hamed et al., 2013; Malviya et al., 2014; Messaoudi et al., 2020]. В культивируемом галоалкалофильном гетеротрофном микробном сообществе содовых озер актинобактерии представляют достаточно многочисленную и разнобразную группу микроорганизмов, выделенных из содового озера Лонар Лейк и содово-соленых озер Восточно-Африканского рифта [Joshi et al., 2008; Mwirichia et al., 2010; Ronoh et al., 2013]. Наибольшее количество галофильных и галотолерантных актинобактерий включают роды: *Nocardiopsis*, *Nesterenkonia*, *Salinispora* и *Streptomonospora* [Hamed et al., 2013].

В нашем исследовании было определено разнообразие культивируемых актинобактерий в осадках содовых озер Верхнее Белое и Нижнее Белое, расположенных в зоне Байкальского рифта. Локальное расположение двух озер на расстоянии примерно 1 км друг от друга и одинаковых высотах (606 м над уровнем моря) практически нивелирует изменчивость, связанную с конкретными местными различиями, такими как местные климатические эффекты, геология, атмосферные осадки, и позволяет определить возможные закономерности распространения и биогеографии отдельных групп микроорганизмов в локальном масштабе.

Ранее из микробных сообществ высокощелочных (рН 9.8-9.9) Белозерских озер были выделены алкалофильные бактерии, представляющие различные таксоны, многие из них были предложены как новые [Zhilina et al., 2004; Жилина и др., 2005; Жилина и др., 2009 а, б; Garnova et al., 2003; 2004]. В то же время не предпринимались попытки выделения алкалофильных актинобактерий, поэтому культивируемое разнообразие этой группы бактерий — деструкторов, обладающих весомым биотехнологическим потенциалом и способных к образованию биологически значимых соединений [Bennur et al. 2015; He et al. 2015; Zhao et al. 2016], совершенно не исследовано. Однако по результатам анализа микробного разнообразия методом высокопроизводительного секвенирования было выявлено, что их обилие в микробных сообществах осадков озер может достигать 4% общего микробного разнообразия [Зайцева и др., 2018]. Экологические условия в исследуемых озерах — высокая щелочность (рН до 10), доминирование карбонатов и гидрокарбонатов, значительные перепады минерализации — способствуют развитию алкалофильного микробного сообщества с возможным доминированием галофильных и галотолерантных бактерий.

Целью нашего исследования было выделение алкалофильных, галофильных и галотолерантных актинобактерий из донных осадков Белозерских озер и выявление возможных закономерностей распространения этой группы микроорганизмов в локальном масштабе.

Материалы и методы исследования

Озера Верхнее Белое ($N\ 50^{\circ}37'425''\ E\ 105^{\circ}45'075''$) и Нижнее Белое ($N\ 50^{\circ}36'367''\ E\ 105^{\circ}45'801''$) расположены в южной части Боргойской степи (Джидинский район, Республика Бурятия). Территория характеризуется аридным климатом, низкими зимними температурами, большой сухостью воздуха и небольшим годовым количеством осадков (250–330 мм). Озерные бассейны не имеют стока и характеризуются смешанным типом водно-минерального питания, которое происходит за счет как атмосферных осадков, вымывающих соли из почв и горных пород водосбора, так родников и ручьев. Площадь и глубина озер варьируют в зависимости от температурных условий и количества осадков.

Физико-химические параметры придонной воды и осадков были определены непосредственно в местах отбора проб с использованием портативных приборов, макрокомпонентный состав придонной воды определяли в лабораторных условиях, как описано ранее [Зайцева и др., 2018].

Выделение культур микроорганизмов

Для выделения культур актинобактерий воздушно-сухие образцы осадков помещали в колбы со средой (1:9) следующего состава (г/л): NaCl — 7.5; KCl — 0.1; CaCl_2 — 0.1; NaHCO_3 — 0.2; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ — 1.0; дрожжевой экстракт — 60. Далее образцы перемешивали на шейкере со стеклянными бусинами в течение двух часов, при 28°C и 180 оборотах. Посев проводили методом предельных разведений на агаризованные среды (г/л): M1: пептон — 3.0, дрожжевой экстракт — 5.0, глицерин — 10.0, бетаин гидрохлорид — 1.64, $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ — 1.25; M2: глюкоза — 4.0, дрожжевой экстракт — 4.0, солодовый экстракт — 5.0, витамин B1 — 1 мл, солевой раствор — 1 мл; M3 (R2A, (BD)): дрожжевой экстракт — 0.50, протеозопептон — 0.50, казаминовые кислоты — 0.50, глюкоза — 0.50, растворимый крахмал — 0.50, K_2HPO_4 — 0.30, MgSO_4 — 0.05, $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ — 0.30; M4 (SCA): растворимый крахмал — 10.0, казеин — 0.3, KNO_3 — 2.0, MgSO_4 — 0.5, K_2HPO_4 — 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2.0, CaCO_3 — 0.2, NaHCO_3 — 2.0, солевой раствор — 1 мл. Солевой раствор (г/100 мл): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0.1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1. Доводили pH среды до 8–8.5. Каждую питательную среду готовили в трех вариантах: без добавления NaCl , с 2%-ной и 5%-ной концентрацией NaCl . Для подавления роста микромицетов и грамотрицательных бактерий в среды после автоклавирования добавляли налидиксовую кислоту (25 $\mu\text{г}/\text{мл}$), циклогексимид (40 $\mu\text{г}/\text{мл}$) и дихромат калия (50 $\mu\text{г}/\text{мл}$). Чашки Петри культивировали при 28 – 30°C в течение 3–7 недель. Для дальнейшего выделения и очистки культур актиномицетов использовали среду ISP2 [Shirling and Gottlieb, 1966]. Рост полученных штаммов при различных значениях pH (6–11) определяли на агаризованной среде M4 (SCA) при 30°C и с добавлением NaCl в концентрации 2–5%. Определение устойчивости выделенных культур к различным концентрациям NaCl проводили на готовых агаризованных средах TSA (BD) и R2A (BD) с содержанием соли 2%, 5%, 10% и 15%.

Молекулярно-биологические методы

Выделение ДНК проводили согласно методу, описанному ранее [Zhou et al., 2010]. Для амплификации фрагментов гена 16S рРНК использовали универсальные праймеры 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') [Lane, 1991]. Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл — $95^{\circ}\text{C} \times 5$ мин; последующие

35 циклов — $94^{\circ}\text{C} \times 1$ мин, $55^{\circ}\text{C} \times 1$ мин, $72^{\circ}\text{C} \times 2$ мин; завершающий цикл — $72^{\circ}\text{C} \times 10$ мин. Очистку и секвенирование продуктов ПЦР осуществляли в компании Sangon Biotech (Шанхай, КНР). Определение таксономической принадлежности полученных последовательностей гена 16S рРНК проводили с использованием инструментов сайта EzTaxon-e (<https://www.ezbiocloud.net/>) [Kim et al., 2012]. Соответствующие последовательности близкородственных видов были извлечены из базы данных GenBank с помощью сервера EzBioCloud. Множественное выравнивание сделано с использованием инструмента CLUSTALW в программном пакете MEGA версии 7.0 [Kumar et al., 2016]. Таксономическое положение определяли путем сравнения полученных последовательностей гена 16S рРНК длиной 850–900 н. п. с данными сервера EzTaxon-e (<https://www.ezbiocloud.net/>) и сайта LSPN (<https://www.bacterio.net/>), где перечислены все валидно опубликованные видовые названия прокариот. По итогам работы было выявлено 98–100%-ное сходство выделенных культур бактерий с ранее описанными типовыми штаммами. Филогенетические деревья построены с использованием метода максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) [Felsenstein, 1981] на основе генетических расстояний, которые рассчитывали с использованием двухпараметрической модели Кимуры [Kimura, 1980] с использованием MEGA 7.0. Для оценки устойчивости топологии полученных деревьев применяли метод bootstrap (1000 альтернативных деревьев) [Felsenstein, 1985]. На дендрограммах представлены значения выше 50%.

Результаты и обсуждение

Физико-химическая характеристика мест отбора проб

Пробы поверхностных осадков (5–10 см) были отобраны в августе 2018 г. Озера характеризовались мелководностью со средними глубинами до 2 м, соленостью (до 20.4 г/л в оз. Нижнее Белое и 34.7 г/л в оз. Верхнее Белое), сильнощелочным значением pH воды (9.75–9.8). В период исследований были отмечены максимальные значения минерализации воды за все годы наших исследований этих озер. Ранее минерализация воды в оз. Верхнее Белое не превышала 12–15 г/л, в оз. Нижнее Белое минерализация варьировала от 4.3 до 12 мг/л [Зайцева и др., 2018].

По гидрохимическим характеристикам озера являются типичными содовыми водоемами, с высоким щелочным pH (до 10), низкой концентрацией кальция и магния, с преобладанием в анионном составе карбонатов и гидрокарбонатов. По составу доминирующих ионов вода оз. Верхнее Белое отнесена к типу гидрокарбонатной натриевой, вода оз. Нижнее Белое — к гидрокарбонатно-сульфатной, натриевой (табл. 1).

Характеристика выделенных штаммов актинобактерий

Из донных осадков содовых озер В. Белое и Н. Белое был выделен 61 штамм умеренно алкалофильных актинобактерий. Все культуры развивались в широком диапазоне pH (от 7 до 10), оптимальные значения pH для большинства изолятов составляли 8–8.5. Штаммы N45 и N271 оптимально росли при pH 8.5–9, а штаммы N47, N152 и N277 имели оптимум pH для роста 9–9.5. Все исследуемые штаммы принадлежали к филуму *Actinobacteria*, классу *Actinobacteria*. Штаммы, выделенные из осадков оз. Верхнее Белое, таксономически были соотнесены с 7 порядками: *Corynebacteriales*, *Streptosporangiales*, *Micrococcales*, *Micromonosporales*,

Streptomycetales, *Streptosporangiales*, *Pseudonocardiales*; изоляты из оз. Нижнее Белое были близки с представителями 5 порядков: *Micrococcales*, *Micromonosporales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Pseudonocardiales*.

Таблица 1

Физико-химические параметры мест отбора проб

Озеро	T, °C	pH	OM, г/л	Na ⁺ , г/л	Ca ²⁺ , г/л	Mg ²⁺ , г/л	HCO ₃ ⁻ + CO ₃ ²⁻ , г/л	SO ₄ ²⁻ , г/л	Cl ⁻ , г/л	Хл a, мкг/л
Верхнее Белое	26.4	9.80	34.7	12.2	0.020	0.009	13.5	5.8	3.2	3.5±1.6
Нижнее Белое	27.3	9.75	20.9	7.0	0.052	0.009	7.7	4.6	1.6	15.3±1.5

Примечания: Т — температура; ОМ — общая минерализация; Хл a — хлорофилл a.

Наибольшее число штаммов было соотнесено с родами *Streptomyces* (15 штаммов) и *Nocardiopsis* (11 штаммов). Пять изолятов, N263, N152, N98, N77 и N94, были отнесены со 100%-ным сходством к типовым штаммам, принадлежащим к роду *Streptomyces* (табл. 2). Процент сходства для других 9 изолятов, относящихся к роду *Streptomyces*, колебался от 98.65% для изолята N89 со *St. ferralitis* до уровня сходства 99.88% для штаммов N75 со *St. roseolilacinus* и N169 со *St. tritolerans*. Согласно молекулярной идентификации, 10 изолятов близки к типовым штаммам р. *Nocardiopsis* с разными значениями сходства (табл. 2), тогда как штамм N79-I имеет 100% сходство с видом *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei*. Род *Nesterenkonia* был представлен семью штаммами, причем четыре штамма (N179, N182, N219 и N261) были отнесены к *N. halotolerans* YIM 70084(T) на уровне сходства 99.88%. Шесть изолятов были близки с типовым штаммом *Kocuria rosea* с уровнем сходства 99.74–99.76%. С типовым штаммом экстремально алkalотолерантного вида *Verrucosispora andamanensis* были близки шесть штаммов, четыре из них с уровнем сходства 100% [Supong et al. 2013].

Культивируемое разнообразие актинобактерий представлено 14 родами, в оз. Верхнее Белое выявлено 10 родов, в оз. Нижнее Белое — 12 родов, 8 родов были общими в составе микробных сообществ двух озер. Отличия заключались в том, что изоляты, близкие к представителям родов *Dietzia* и *Kytoscoccus*, были выделены лишь из осадков оз. Верхнее Белое, штаммы, представляющие роды *Actinotalea*, *Brevibacterium*, и *Cellulomonas* — из оз. Нижнее Белое.

По результатам молекулярной идентификации, выделенные из осадков оз. Верхнее Белое 30 штаммов актинобактерий сгруппированы в 10 родов и представляют 20 различных видов актинобактерий, 12 из которых присутствовали только в этом озере. Культивируемые актинобактерии в микробном сообществе осадков оз. Нижнее Белое характеризовались большим разнообразием, 31 штамм из этого озера представляли 27 различных видов, из которых 18 видов присутствовали только в этом озере. Изоляты, имеющие наибольшее сходство с актинобактериями *Kocuria rosea*, *Verrucosispora andamanensis*, *Nesterenkonia halotolerans*, *Nocardiopsis umidischolae*, *Saccharopolyspora endophytica*, *Micromonospora chalcea* и *Nocardiopsis synnemataformans*, были выделены из осадков обоих озер.

Таблица 2

Штаммы актинобактерий, выделенные с использованием трех различных концентраций NaCl (0, 2 и 5%) из осадков оз. Верхнее Белое, со значениями сходства и полноты для последовательностей гена 16S рРНК

№	NaCl%	Ближайшие культивируемые виды	Сходство (%)	Полнота (%)
Штаммы из оз. Верхнее Белое				
N293	5	<i>Dietzia cercidiphylli</i> YIM 65002(T)	99.87	55.7
N136	2	<i>Dietzia cercidiphylli</i> YIM 65002(T)	99.87	55.7
N283	5	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447(T)	99.76	58.9
N148	2	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447(T)	99.74	54.0
N314	2	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447(T)	99.76	58.0
N56	2	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447(T)	99.74	54.0
N300	5	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447(T)	99.76	58.8
N135	5	<i>Kytococcus sedentarius</i> DSM 20547(T)	99.76	58.3
N224	5	<i>Micrococcus endophyticus</i> YIM 56238(T)	99.88	59.2
N65	2	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026(T)	99.88	57.1
N45	2	<i>Nesterenkonia sandarakina</i> YIM 70009(T)	99.53	59.6
N271	5	<i>Nesterenkonia sandarakina</i> YIM 70009(T)	99.51	56.2
N182	2	<i>Nesterenkonia halotolerans</i> YIM 70084(T)	99.88	59.7
N219	2	<i>Nesterenkonia halotolerans</i> YIM 70084(T)	99.88	57.6
N48-I	2	<i>Nocardiopsis umidischolae</i> 66/93(T)	98.70	58.6
N101	5	<i>Nocardiopsis sinuspersici</i> HM6(T)	98.97	54.0
N46	0	<i>NYMS_s</i> TRM49117	99.51	56.7
N47	2	<i>Nocardiopsis ganjahuensis</i> DSM 45031(T)	98.69	63.2
N138	5	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i> NBRC 13392(T)	99.74	54.0
N55	2	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i> DSM 44143(T)	99.76	57.4
N139	0	<i>Saccharopolyspora endophytica</i> YIM 61095(T)	100.00	55.0
N263	2	<i>Streptomyces puniceus</i> NBRC 12811(T)	100.00	58.8
N312	2	<i>Streptomyces capparidis</i> EGI 6500195(T)	99.14	57.7
N313-II	2	<i>Streptomyces javensis</i> NBRC 100777(T)	99.51	56.2
N152	0	<i>Streptomyces lonarensis</i> NCL 716(T)	100.00	58.9
N98	5	<i>Streptomyces tricolor</i> NBRC 15461(T)	100.00	58.2
N133	0	<i>Verrucosispora andamanensis</i> SP03-05(T)	100.00	55.7
N304	2	<i>Verrucosispora andamanensis</i> SP03-05(T)	99.76	57.1

N53	2	<i>Verrucosispora andamanensis</i> SP03-05(T)	99.54	60.6
N58	2	<i>Verrucosispora andamanensis</i> SP03-05(T)	100.00	57.8

Штаммы из оз. Нижнее Белое

N260	0	<i>Actinotalea ferrariae</i> CF5-4(T)	99.28	57.6
N258-I	2	<i>Brevibacterium permense</i> VKM Ac-2280(T)	99.41	59.2
N83-IIcons	0	<i>Cellulomonas aerilata</i> 5420S-23(T)	98.69	89.9
N178	5	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447(T)	99.76	56.9
N87	0	<i>Micrococcus aloeverae</i> AE-6(T)	99.74	54.5
N297	2	<i>Micrococcus aloeverae</i> AE-6(T)	99.64	57.9
N338	0	<i>Micromonospora palomenae</i> NEAU-CX1(T)	99.65	59.2
N281	5	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026(T)	99.88	57.8
N179	5	<i>Nesterenkonia halotolerans</i> YIM 70084(T)	99.88	57.0
N180	5	<i>Nesterenkonia lutea</i> YIM 70081(T)	99.76	58.1
N261	0	<i>Nesterenkonia halotolerans</i> YIM 70084(T)	99.88	56.3
N298	5	<i>Nocardiopsis umidischolae</i> 66/93(T)	98.70	58.6
N80	0	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i> DSM 44143(T)	99.74	54.0
N290	0	NYMS_s TRM49117	99.75	55.3
N76	2	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i> DSM 44143(T)	99.61	53.9
N79-I	2	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111(T)	100.00	58.1
N307	2	<i>Saccharopolyspora gregorii</i> NCIMB 12823(T)	99.52	58.2
N86	0	<i>Saccharopolyspora endophytica</i> YIM 61095(T)	100.00	54.3
N177	2	<i>Saccharopolyspora gregorii</i> NCIMB 12823(T)	99.76	58.9
N75	2	<i>Streptomyces roseolilacinus</i> NBRC 12815(T)	99.88	59.1
N169	2	<i>Streptomyces tritolerans</i> DAS 165(T)	99.88	58.9
N277	5	<i>Streptomyces alkaliphilus</i> No. 7(T)	99.18	59.0
N162	0	<i>Streptomyces alkaliphilus</i> No. 7(T)	99.10	55.7
N85	0	<i>Streptomyces ederensis</i> NBRC 15410(T)	99.48	54.2
N81	0	<i>Streptomyces massasporeus</i> NBRC 12796(T)	99.66	62.0
N77	2	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877(T)	100.00	54.1
N89	2	<i>Streptomyces ferralitis</i> SFOP68(T)	98.65	56.7
N94	2	<i>Streptomyces sodiophilus</i> YIM 80305(T)	100.00	55.2
N172	5	<i>Streptomyces sparsus</i> YIM 90018(T)	99.74	54.2
N73	5	<i>Verrucosispora andamanensis</i> SP03-05(T)	100.00	57.1
N280	5	<i>Verrucosispora andamanensis</i> SP03-05(T)	100.00	59.2

Результаты определения устойчивости штаммов к содержанию NaCl показывают, что большинство штаммов являются галофильными или галотолерантными бактериями (табл. 3). Галотолеранты не проявляют абсолютной потребности в соли для роста, но хорошо растут до часто очень высоких концентраций соли (100 г/л NaCl) [Oren, 2002]. Из осадков оз. Нижнее Белое были выделены галотолерантные актинобактерии, близкие к *Streptomyces massasporeus*, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei*, *Nesterenkonia halotolerans* и *Saccharopolyspora gregorii*, которые росли при концентрации NaCl в среде до 100–150 г/л.

Таблица 3

Рост выделенных штаммов актинобактерий при разных концентрациях NaCl (%)

Изолят		среда TSA				среда R2A				NaCl 0%
		2%	5%	10%	15%	2%	5%	10%	15%	
N135	<i>Kytococcus sedentarius</i> ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	-
N101	<i>Nocardiopsis sinuspersici</i> ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	-
N73	<i>Verrucosispora andamanensis</i> ¹	+	в	-	-	+	+	-	-	-
N281	<i>Micromonospora chalcea</i> ¹	+	в	-	-	+	+	-	-	-
N271	<i>Nesterenkonia sandarakina</i> ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	-
N138	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i> ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	-
N76	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i> ¹	+	+	+	в	+	+	+	-	-
N139	<i>Saccharopolyspora endophytica</i> ¹	+	+	-	-	+	+	+	-	+
N313-II	<i>Streptomyces javensis</i> ¹	+	+	-	-	+	+	+	-	-
N152	<i>Streptomyces lonarensis</i> ¹	+	+	-	-	+	+	-	-	+
N98-I	<i>Streptomyces tricolor</i> ¹	+	+	+	-	+	+	+	-	-
N258-I	<i>Brevibacterium permense</i> ²	+	+	+	+	+	+	+	+	-
N338	<i>Micromonospora palomae</i> ²	+	-	-	-	+	-	-	-	+
N261	<i>Nesterenkonia halotolerans</i> ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N180	<i>Nesterenkonia lutea</i> ²	+	+	+	-	+	+	+	-	+
N79-I	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+
лнота	<i>Saccharopolyspora gregorii</i> ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N277	<i>Streptomyces alkaliphilus</i> ²	+	+	-	-	+	+	-	-	-
N77	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ²	+	+	+	-	+	+	+	-	-
N85	<i>Streptomyces ederensis</i> ²	+	+	-	-	+	+	-	-	+
N81	<i>Streptomyces massasporeus</i> ²	+	+	+	-	+	+	+	-	+
N75	<i>Streptomyces roseolilacinus</i> ²	+	+	-	-	+	+	-	-	-
N169	<i>Streptomyces tritolerans</i> ²	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Примечания: ¹изолят из оз. Верхнее Белое; ²изолят из оз. Нижнее Белое; в — вариабельно.

В культивируемом микробном сообществе оз. Верхнее Белое преобладали галофильные актинобактерии, растущие в диапазоне 2–15% NaCl, большая часть штаммов была выделена на средах с добавлением 2% NaCl (табл. 3). Галотолерантные изоляты N152 и N139 не проявляли абсолютной потребности в NaCl, однако хорошо росли на среде с 50 и 100 г/л соли соответственно. Значительная часть, 11 штаммов, актинобактерий из осадков озера Нижнее Белое была выделена на средах без добавления NaCl. Изоляты: N85, N81, N79-I, N338 и N177, близкие, соответственно, к *Streptomyces ederensis*, *Streptomyces massasporeus*, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei*, *Micromonospora palomenae* и *Saccharopolyspora gregorii*, по отношению к соли характеризовались как галотолеранты. Умеренно галофильные штаммы N277, N77, N75, N169 и N258-I, близкие к *Streptomyces alkaliphilus*, *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces roseolilacinus*, *Streptomyces tritolerans* и *Brevibacterium permense*, соответственно, росли лишь в присутствии в среде NaCl (табл. 3). Кроме того, из осадков озер были выделены штаммы, близкие к галотолерантным видам р. *Nesterenkonia* (*N. halotolerans* и *N. lutea*) и галофильному *N. sandrakina*.

В этом исследовании разнообразие культивируемых актинобактерий, выделенных из осадков Белозерских озер, было высоким, составляло 13 родов и соответствовало уровню разнообразия культивируемых актинобактерий в других соленых местообитаниях. Из поверхностных осадков пересохшего гиперсоленого озера Эйдинг были выделены актинобактерии из восьми порядков (*Actinopolysporales*, *Glycomycetales*, *Jiangellales*, *Micrococcoales*, *Micromonosporales*, *Pseudonocardiales*, *Streptomycetales* и *Streptosporangiales*), представляющие 18 родов [Guan et al. 2020]. Четыре рода актинобактерий (*Dietzia*, *Microbacterium*, *Nocardia* и *Rhodococcus*) были выделены из озера Магади (Кения) [Ronoh et al., 2013], а *Nocardiopsis* и *Streptomyces* были выделены ранее из содового озера Элментейта (Кения) [Mwirichia et al., 2010]. Культивируемое разнообразие сильнощелочного (pH 10.5) индийского озера Лонар лейк (Lonar Lake) включало актинобактерии родов *Cellulosimicrobium*, *Dietzia*, *Arthrobacter* и *Micrococcus*, принадлежащих к разным семействам *Promicromonosporaceae*, *Dietziaceae* и *Micrococcaceae*, соответственно [Joshi et al., 2008].

Было выявлено значительное различие в распространении актинобактерий в осадках Белозерских озер. Наибольшее разнообразие среди выделенных штаммов было отмечено для родов *Streptomyces* и *Nocardiopsis*, широко распространенных представителей актинобактерий, характерных для соленых местообитаний, в том числе морских экосистем, приозерных солончаков, засоленных и щелочных почв и представляющих значительный интерес как продуценты антибиотиков [Bennur et al., 2015; He et al., 2015; Zhao et al., 2016]. Таксономическое разнообразие рода *Streptomyces* среди выделенных штаммов составляло 14 видов, практически все виды ранее из содовых озер не выделялись, за исключением *St. lonarensis*, образованного из почвы щелочного соленого метеоритного озера Лонар Лейк [Sharma et al., 2016]. Два изолятов с уровнем сходства 99.31% со штаммом вида *St. ambofaciens* ранее были выделены из поверхностных осадков гиперсоленого пересохшего озера с pH 7.6–8.3 [Guan et al., 2020]. Несмотря на то, что многие виды *Streptomyces* растут в ограниченном диапазоне pH с оптимумом pH 7.0, из

воды и осадков солоноватого озера Чилика (Индия) было выделено 19 алкало-галофильных штаммов, близких к видам р. *Streptomyces*, растущим при pH 9.0 и NaCl 10% [Malviya et al. 2014]. Из донных осадков оз. Верхнее Белое с pH 9.8 было выделено пять штаммов, по молекулярной идентификации близкие к видам *S. puniceus*, *S. capparidis*, *S. javensis*, *S. lonarensis* и *S. tricolor*, растущим при концентрации NaCl 5–10%. В менее соленых донных осадках оз. Нижнее Белое в состав культивируемых стрептомицетов входило 10 изолятов, близких к видам: *S. alkaliphilus*, *S. ambofaciens*, *S. ederensis*, *S. ferralitis*, *S. massasporeus*, *S. puniceus*, *S. roseolilacinus*, *S. sodiophilus*, *S. sparsus* и *S. tritolerans* (табл. 2).

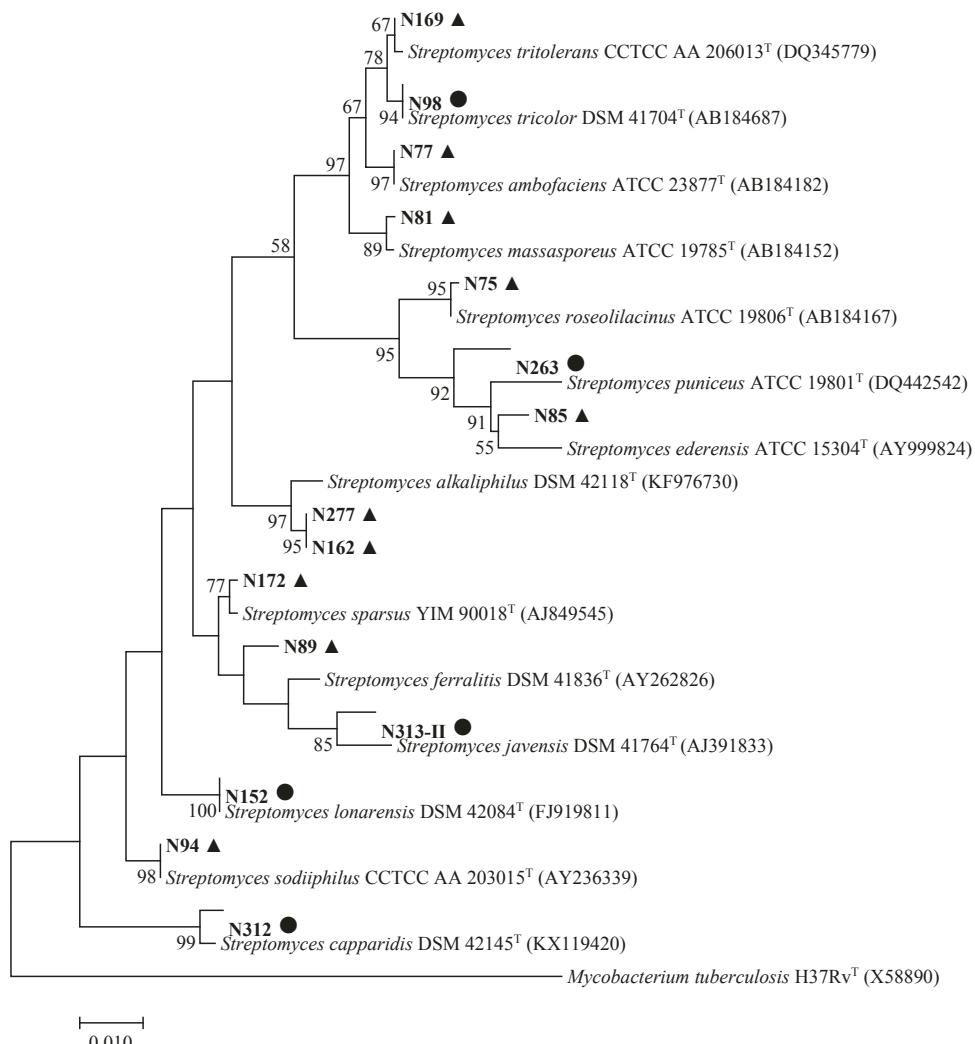


Рис. 1. Филогенетическое положение выделенных изолятов, близких к типовым штаммам рода *Streptomyces*. Круги (●) и треугольники (▲) обозначают штаммы, выделенные из озер Верхнее Белое и Нижнее Белое

Наблюдаемое локальное распределение штаммов *Streptomyces* подтверждает особенности микробной биогеографии этого рода. Ранее было показано, что пространственное расстояние и факторы окружающей среды, в том числе минерализация, по-разному влияют на формирование микробной биогеографии в соленных и солоноватых местообитаниях в отношении этой группы микроорганизмов [Malviya et al. 2014; Zhao et al., 2016]. Наши результаты дополняют и расширяют данные по экологии этого рода актинобактерий.

По результатам молекулярной идентификации 11 выделенных штаммов были близки к 7 видам р. *Nocardiopsis* с уровнем сходства 98.69–100% (табл. 2 и 3, рис. 2). Из них *N. dassonvillei* subsp. *albirubida*, *N. ganjahuensis* и *N. sinuspersici* выделены исключительно из осадков оз. Верхнее Белое, лишь из осадков оз. Нижнее Белое был выделен штамм, представляющий *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei*. Актино-бактерии, близкие к видам *N. synnemataformans*, *N. umidischolae* и *NYMS_s*, были выделены из осадков обоих озер.

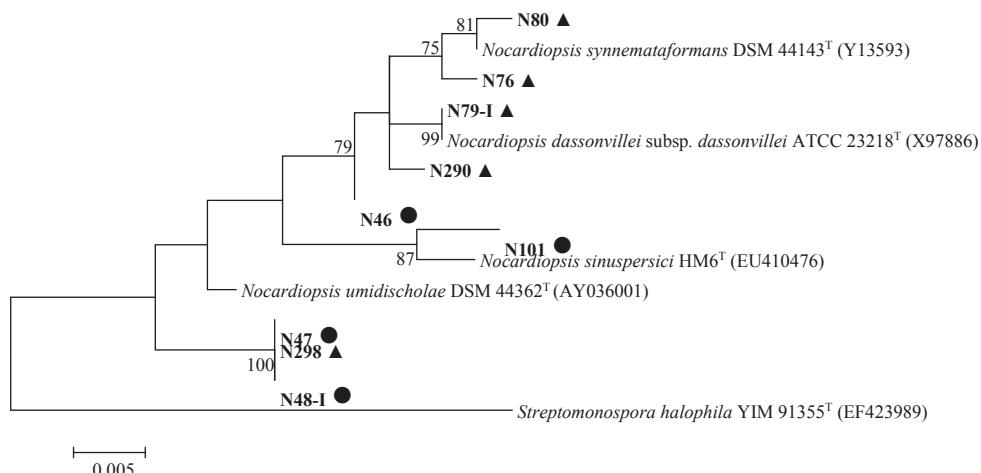


Рис. 2. Филогенетическое положение выделенных изолятов, близких к типовым штаммам, принадлежащим к роду *Nocardiopsis*. Круги (●) и треугольники (▲) обозначают штаммы, выделенные из озер Верхнее Белое и Нижнее Белое

Ранее некоторые виды *Nocardiopsis* были выделены исключительно из определенных мест обитания [Evtushenko et al., 2000; Sabry et al., 2004; Chen et al., 2008; Chen et al., 2010; Bennur et al., 2015]. Биогеографические закономерности среди *Nocardiopsis* по результатам предыдущих исследований показывают, что факторы окружающей среды, а не пространственное расстояние, вызывают бактериальную изменчивость в локальном масштабе (от 1 до 100 км²) [He et al., 2015].

Заключение

В целом надо отметить, что это первое исследование по выделению алкалоильных, галофильных и галотолерантных актинобактерий в содовых и соленых озерах, расположенных в зоне Байкальского рифта. Ранее целенаправленное выделение

актинобактерий с подбором нескольких оптимальных сред для культивирования из микробных сообществ не проводилось. Разнообразие и распространение этой биотехнологически важной группы гидролитиков и потенциальных продуцентов метаболитов, антибиотиков и разнообразных алкало- и солеустойчивых ферментов оценивались с помощью метода высокопроизводительного секвенирования. Выявленные нами различия в составе культивируемых актинобактерий двух озер демонстрируют, что минерализация оказывает влияние на распространение алкалофильных культивируемых актинобактерий. Поверхностные осадки оз. Нижнее Белое с минерализацией 20 г/л являются местообитанием более разнообразного культивируемого сообщества актинобактерий, с преобладанием в составе галотolerантных штаммов. В то время как в более соленых осадках оз. Верхнее Белое с минерализацией 34 г/л в сообществе актинобактерий доминируют галофильные виды.

Литература

1. Жилина Т. Н., Заварзина Д. Г., Колганова Т. В., Лысенко А. М., Турова Т. П. *Alkaliphilus peptidofermentans* sp. nov. алкалофильная бактерия из содового озера, сбраживающая пептиды и восстанавливающая Fe(III) // Микробиология. 2009а. Т. 78. С. 496–505. Текст : непосредственный.
2. Жилина Т. Н., Заварзина Д. Г., Осипов Г. А., Кострикина Н. А., Турова Т. П. *Natronincola ferrireducens* sp. nov. и *Natronincola peptidovorans* sp. nov. — новые анаэробные алкалофильные пептолитические и железоредуцирующие бактерии из содовых озер // Микробиология. 2009б. Т. 78, № 4. С. 506–518. Текст : непосредственный.
3. Жилина Т. Н., Кевбрин В. В., Турова Т. П., Лысенко А. М., Кострикина Н. А., Заварзин Г. А. *Clostridium alkalicellum* sp. nov. — облигатно алкалофильный целлюлозолитик из содового озера Прибайкалья // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 642–635. Текст : непосредственный.
4. Зайцева С. В., Абидуева Е. Ю., Раднагуруева А. А., Базаров С. М., Бурюхаев С. П. Структура микробных сообществ в осадках щелочных озер Забайкалья с различной минерализацией // Микробиология. 2018. Т. 87, № 4. С. 1–11. DOI: 10.1134/S0026261718040185. Текст : непосредственный.
5. Bennur T., Kumar A. R., Zinjarde S., Javdekar V. Nocardiopsis species: Incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiological Research*. 2015; 174: 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.010>
6. Chen Y.-G., Cui X.-L., Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E., Wen M.-L., Xu L.-H., Jiang Ch.-L. *Nocardiopsis quinghaiensis* sp. nov., isolated from saline soil in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008; 58: 699–705. DOI:10.1099/ijns.0.65441-0
7. Chen Y.-G., Zhang Y.-Q., Tang S.-K., Liu Z.-X., Xu L.-H., Zhang L.-X., Li W.-J. *Nocardiopsis terrae* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from saline soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2010; 98: 31–38. DOI: 10.1007/s10482-010-9425-5
8. Evtushenko L. I., Taran V. V., Akimov V. N., Kroppenstedt R. M., Tiedje J. M., Stackebrandt E. *Nocardiopsis tropica* sp. nov., *Nocardiopsis trehalosi* sp. nov., nom. rev. and *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *albirubida* subsp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000; 50: 73–81. DOI: 10.1099/00207713-50-1-73
9. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39: 783–791.
10. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 1981; 17: 368–376.

11. Garnova E. S., Zhilina T. N., Tourova T. P., Kostrikina N. A., Zavarzin G. A. Anaerobic, alkaliphilic, saccharolytic bacterium *Alkalibacter saccharofermentans* gen. nov., sp. nov. from a soda lake in the Transbaikal region of Russia. *Extremophiles*. 2004; 8: 309–316. DOI: 10.1007/s00792-004-0390-7
12. Garnova E. S., Zhilina T. N., Tourova T. P., Lysenko A. M. *Anoxynatronum sibiricum* gen. nov., sp. nov. alkaliphilic saccharolytic anaerobe from cellulolytic community of Nizhnee Beloe (Transbaikal region). *Extremophiles*. 2003; 7: 213–220. DOI: 10.1007/s00792-002-0312-5
13. Guan T.-W., Lin Y.-J., Ou M.-Y., Chen K.-B. Isolation and diversity of sediment bacteria in the hypersaline aiding lake, China. *PLoS ONE*. 2020; 15(7): e0236006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236006>
14. Hamed J., Mohammadipanah F. & Ventosa A. Systematic and biotechnological aspects of halophilic and halotolerant actinomycetes. *Extremophiles*. 17: 1–13. DOI: 10.1007/s00792-012-0493-5
15. 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; 5: 13323. <https://doi.org/10.1038/srep13323>
16. Joshi A. A., Kanekar P. P., Kelkar A. S., Shouche Y. S., Vani A. A., Borgave S. B., Sarnaik S. S. Cultivable bacterial diversity of alkaline Lonar Lake, India. *Microb. Ecol.* 2008; 55: 163–172. DOI: 10.1007/s00248-007-9264-8
17. Kim O. S., Cho Y. J., Lee K., Yoon S. H., Kim M., Na H., Park S. C., Jeon Y. S., Lee J. H., Yi H., Won S., Chun J. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012; 62: 716–721. DOI: 10.1099/ijst.0.038075-0
18. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 1980; 16: 111–120. DOI: 10.1007/BF01731581
19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016; 33: 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
20. Lane D. J. 16S/23S sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 1991, pp. 115–175.
21. Malviya N., Yandigeri M. S., Yadav A. K., Solanki M. K., Arora D. K. Isolation and characterization of novel alkali-halophilic actinomycetes from the Chilika brackish water lake, India. *Ann. Microbiol.* 2014; 64: 1829–1838. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0831-1>
22. Messaoudi O., Wink J., Bendahou M. Diversity of Actinobacteria Isolated from Date Palms Rhizosphere and Saline Environments: Isolation, Identification and Biological Activity Evaluation. *Microorganisms*. 2020; 8(12): 1853. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121853>
23. Mwirichia R., Muigai A. W., Tindall B., Boga H. I., Stackebrandt E.. Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya. *Extremophiles*. 2010; 14: 339–348. DOI: 10.1007/s00792-010-0311-x
24. Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2002; 28: 56–63. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>.
25. Ronoh R. C., Budambula N. L. M., Mwirichia R. K., Boga H. I. Isolation and characterization of actinobacteria from lake Magadi, Kenya. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2013; 7: 4200–4206.
26. Sabry S. A., Ghanem N. B., Abu-Ella G. A., Schumann P., Stackebrandt E., Kroppenstedt R. M. *Nocardiopsis aegyptia* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004; 54: 453–456.

27. Sharma T. K., Mawlankar R., Sonalkar V. V. et al. *Streptomyces lonarensis* sp. nov., isolated from Lonar Lake, a meteorite salt water lake in India. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2016; 109: 225–235. DOI: 10.1007/s10482-015-0626-9
28. Shirling E. B., Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1966; 16(3): 313–340.
29. Supong K., Suriyachadkun C., Suwanborirux K., Pittayakhajonwut P., Thawai C. *Verrucosiscpora andamanensis* sp. nov., isolated from a marine sponge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013; 63: 3970–3974. DOI 10.1099/ijss.0.050906-0
30. 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; 6: 32718. DOI: 10.1038/srep32718
31. Zhou S. Q., Huang X. L., Huang D. Y., Hu X. W., Chen J. L. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100. *Biotechnology Bulletin*. 2010; 2: 123–125.

Статья поступила в редакцию 21.10.2022; одобрена после рецензирования 05.11.2022; принята к публикации 25.11.2022.

DIVERSITY OF CULTIVATED HALOPHILIC AND HALOTOLERANT ACTINOBACTERIA IN THE SEDIMENTS OF BELOZERSK SODA LAKES (THE REPUBLIC OF BURYATIA)

S. V. Zaitseva, E. P. Nikitina, Chenghang Sun, E. Yu. Abidueva

Svetlana V. Zaitseva
Cand. Sci. (Biol.),
Institute for General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
svet_zait@mail.ru

Elena P. Nikitina
Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
lenauude@mail.ru

Chenghang Sun
Prof.,
Institute of Medicinal Biotechnology,
Chinese Academy of Medical Sciences
1 Tiantan Xili, Dongcheng District, Beijing 100050, China
chenghangsun@hotmail.com

Elena Yu. Abidueva
Dr. Sci. (Biol.),
Institute for General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
abidueva_l@mail.ru

Abstract. We have first investigated the cultivated diversity of actinobacteria in the sediments of soda lakes Verkhneye Beloye and Nizhneye Beloye (the Republic of Buryatia). 61 strains of alkalophilic, halophilic and halotolerant actinobacteria have been isolated. They represent 13 genera and 37 species in accordance with the similarity of 16S rRNA gene sequences. Some of them had not previously isolated from soda lakes. We have shown the influence of mineralization on the distribution and diversity of cultivated actinobacteria. Halophilic actinobacteria dominated in the microbial community of Lake V. Beloye with mineralization 34 g/L. The cultivated community of actinobacteria in the surface sediments of Lake N. Beloye with mineralization 20 g/L was more diverse, with a predominance of halotolerant strains.

Keywords: microbial ecology, soda lakes, halophilic actinobacteria.

Acknowledgments

The work was carried out within the framework of the state assignment no. FWSM-2021-0003 (0271-021-0003) and partially supported by CAMS 2017-269 I2M-B&R-08 grant.

For citation

Zaitseva S. V., Nikitina E. P., Chenghang Sun, Abidueva E. Yu. Diversity of Cultivated Halophilic and Halotolerant Actinobacteria in the Sediments of Belozersk Soda Lakes (the Republic of Buryatia). *Nature of Inner Asia*. 2022; 4(22): 23–37.

DOI: 10.18101/2542-0623-2022-4-23-37

The article was submitted 21.10.2022; approved after reviewing 05.11.2022 2022; accepted for publication 25.11.2022.