

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

Калёнов Сергей Владимирович

**Биотехнология и применение микроорганизмов,
выделенных из гиперсоленых сред**

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Складнев Дмитрий Анатольевич

Москва – 2020 год

СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

БР – бактериородопсин

ПМ – пурпурные мембраны

АСБ – абсолютно сухая биомасса

ПО – программное обеспечение

ГГАБ – глубоководные гиперсоленые анаэробные бассейны

ПФЭ – полный факторный эксперимент

ДФЭ – дробный факторный эксперимент

АК – аминокислота

ИНС – искусственная нейронная сеть

ДМСО – диметилсульфоксид

АФК – активные формы кислорода

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

БАВ – биологически активные вещества

БМ – биомасса

ОП – оптическая плотность

КЖ – культуральная жидкость

УФ модуль – ультрафильтрационный модуль

LB – Лурия-Бертани среда

МІСР (microbial induced calcium carbonate precipitation) – индуцированное микроорганизмами осаждение карбоната кальция

КОЕ – колониеобразующая единица

ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

АМФ – аденозинмонофосфат

УМФ – уридинмонофосфат

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	20
1.1. Характеристика гиперсоленых сред обитания и их обитателей.....	20
1.1.1. Гиперсоленые среды.....	20
1.1.2. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы.....	24
1.1.3. Высокая соленость.....	25
1.1.3.1. Стратегия “high-salt-in”.....	26
1.1.3.2. Стратегия “low-salt-in”.....	27
1.1.4. Природный цикл галофилов.....	32
1.1.5. Излучения.....	39
1.2. Полиэкстремофилы.....	42
1.2.2. Алкалифилы, ацидофилы и галоалкалифилы.....	49
1.2.3. Пьезофилы.....	53
1.2.4. Галофильные аэробы и анаэробы.....	56
1.3. Таксономия.....	58
1.3.1. Галофильные археи.....	58
1.3.2. Галофильные бактерии.....	63
1.3.2.1. <i>Proteobacteria</i>	63
1.3.2.2. <i>Firmicutes</i>	67
1.3.2.3. <i>Actinobacteria</i>	70
1.3.2.4. <i>Rhodothermaeota</i> , <i>Balneolaeota</i> и <i>Bacteroidetes</i>	72
1.3.2.5. <i>Thermotogae</i>	75
1.3.2.6. <i>Cyanobacteria</i>	75
1.3.2.7. <i>Tenericutes</i>	75
1.3.3. Эукариоты.....	76
1.3.4. Галовирусы.....	78
1.4. Гиперсоленые экосистемы.....	81
1.4.1. Солнечные солеварни.....	82
1.4.2. Большое Соленое озеро.....	86
1.4.3. Мертвое море.....	92
1.4.4. Озеро Вади ан-Натрун.....	95
1.4.5. Глубоководные гиперсоленые анаэробные бассейны.....	98
1.4.5.1. ГГАБы Красного моря.....	100
1.4.5.2. ГГАБы Средиземного моря.....	103
1.5. Морфология, специфика строения, компоненты и уникальные БАВ клеток галофилов.....	106
1.6. Адаптивные системы и механизмы.....	112

1.6.1.	Устройство клеточной стенки.....	113
1.6.2.	Системы транспорта. Транспорт неорганических ионов. Биоэнергетика.....	121
1.6.3.	Системы транспорта органических соединений, в частности, осмопротекторов.....	128
1.6.4.	Адаптации протеома.....	134
1.6.5.	Системы фотореактивации и защиты от АФК.....	137
1.6.5.1.	Фотопротективные механизмы.....	138
1.6.5.1.1.	Белковые антиоксидантные системы.....	138
1.6.5.1.2.	Небелковые антиоксидантные системы.....	142
1.6.5.1.3.	Каротиноиды.....	144
1.6.6.	Системы репарации ДНК.....	150
1.6.6.1.	Световая репарация.....	150
1.6.6.2.	Темновая репарация.....	151
1.6.6.3.	Репарация фото- и химически индуцированных необратимых повреждений.....	153
1.6.6.3.1.	Эксцизионная репарация оснований.....	153
1.6.6.3.2.	Репарация двуцепочечных разрывов.....	155
1.6.7.	Особенности генетического аппарата.....	156
1.7.	Особенности питания и метаболизма.....	161
1.7.1.	Метаболизм галофильных архей.....	161
1.7.2.	Метаболизм галофильных бактерий.....	173
1.7.3.	Родопсины.....	174
1.7.4.	Цитотаксис.....	179
1.8.	Биотехнологический потенциал галофилов.....	183
1.8.1.	Пищевое применение.....	183
1.8.2.	Экстремозимы.....	188
1.8.2.1.	Протеазы.....	189
1.8.2.2.	Карбогидразы.....	192
1.8.2.3.	Липолитические ферменты.....	201
1.8.2.4.	Катализ в средах органических растворителей.....	204
1.8.3.	Бактериородопсин.....	211
1.8.4.	Биобетон.....	215
1.8.5.	Полимеры.....	222
1.9.	Биотехнология галофилов.....	230
1.9.1.	Подходы к культивированию.....	230
1.9.1.1.	Ростовые среды.....	231
1.9.1.2.	Ростовые среды и их оптимизация для разных технологических нужд.....	236
1.9.1.2.1.	Получение биомассы.....	237
1.9.1.2.2.	Получение каротиноидов.....	238

1.9.1.2.3.	Получение бактериородопсина	240
1.9.1.2.4.	Получение галоэнзимов	243
1.9.2.	Культивирование галофилов в опытно-промышленных и промышленных масштабах	246
1.9.3.	Сохранение биомассы микроорганизмов.....	248
2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	254
2.1.	Характеристики исходных и мутантных штаммов галоархей <i>Hbt. salinarum</i>	254
2.2.	Бактериальные культуры для исследований карбонатогенеза.....	254
2.3.	Модифицированный метод мутагенеза для получения и отбора мутантов.....	255
2.4.	Сравнение мутантов и коллекционных штаммов	256
2.5.	Компоненты комплексных питательных сред для глубинного культивирования <i>Hbt. salinarum</i> и <i>Halomonas utahensis</i>	260
2.6.	Компоненты синтетической среды для культивирования <i>Hbt. salinarum</i>	261
2.7.	Питательные среды и культивирование уробактерий	261
2.8.	Твердофазное культивирование экстремально галофильных микроорганизмов в чашках Петри.....	262
2.8.1.	Агаризованная питательная среда с градиентом от комплексной до синтетической для выявления быстрорастущих колоний.....	263
2.8.2.	Агаризованная двухслойная питательная среда.....	264
2.9.	Глубинное культивирование галоархей и галобактерий в колбах	264
2.9.1.	Характеристики адсорбентов, использовавшихся при культивировании.....	266
2.10.	Глубинное культивирование галоархей в биореакторе	269
2.11.	Экспресс-методика определения содержания БР в клетках галоархей.....	272
2.12.	Характеристики биомассы, клеточной суспензии и высушенных образцов.....	273
2.13.	Планирование экспериментов и статистическая обработка результатов	275
2.14.	Эксперименты с источниками излучения, обладающими разными спектральными характеристиками.....	275
2.15.	Ферментативные гидролизаты зерновых культур для культивирования галоархей	277
2.16.	Определение протеолитической активности по казеину.....	278
2.17.	Определение аминокислотного состава образцов.....	279
2.18.	Подготовка биомассы для высушивания	281
2.19.	Распылительная сушка.....	281
2.20.	Лиофильная сушка	284
2.21.	Хранение биомассы.....	284
2.22.	Просвечивающая электронная микроскопия.....	284
2.22.1.	Приготовление ультратонких срезов высушенных клеток <i>Hbt. salinarum</i>	285
2.23.	Сканирующая электронная микроскопия	285
2.24.	Определение размеров частиц высушенных образцов	286
2.21.	Разработка нейросетевой модели.....	286
2.25.	Измерение ζ -потенциала.....	289

2.26. Определение таксономической принадлежности культур микроорганизмов.....	289
2.27. Эксперименты с умеренными вирусами.....	289
2.28. ВЭЖХ образцов культуральной жидкости и экстрактов из адсорбентов.....	290
2.29. Приготовление образцов цементного камня.....	291
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	292
3.1. Выбор и оптимизация питательных сред для промышленного использования при культивировании экстремально галофильных микроорганизмов.....	292
3.1.1. Синтетические питательные среды для <i>Hbt. salinarum</i> , особенности субстратной специфичности разных штаммов.....	294
3.1.2. Комплексные питательные среды, особенности их компонентов и условий культивирования, влияющие на ростовые характеристики штаммов <i>Hbt. salinarum</i> , синтез бактериородопсина и каротиноидов.....	303
3.1.2.1. Коммерческие препараты – компоненты комплексных питательных сред для <i>Hbt. salinarum</i>	304
3.1.2.2. Условия аэрации и освещения при культивировании <i>Hbt. salinarum</i>	308
3.1.2.3. “Старение” комплексной питательной среды экстремально галофильных микроорганизмов	310
3.1.2.4. Культивирование <i>Hbt. salinarum</i> с внесением отработанной культуральной жидкости (режим рецикла среды).....	312
3.2. Разработка способов культивирования <i>Hbt. salinarum</i> в условиях контролируемого окислительного стресса.....	314
3.2.1. Подготовка посевного материала при культивировании экстремально галофильных микроорганизмов.....	315
3.2.2. Культивирование <i>Hbt. salinarum</i> в доливном и хемостатном режимах.....	317
3.2.3. Культивирование <i>Hbt. salinarum</i> с извлечением ингибиторов биосинтеза из ростовой среды адсорбентом.....	319
3.2.4. Оптимизация условий освещения при культивировании экстремально галофильных микроорганизмов.....	323
3.2.5. Применение антиоксидантов при культивировании <i>Hbt. salinarum</i> для снижения окислительных повреждений ростовой среды.....	328
3.2.6. Высокоплотностное культивирование штаммов-продуцентов каротиноидов в мембранном биореакторе.....	330
3.2.7. Разработка универсального высокоавтоматизированного комплекса для культивирования микроорганизмов (с учётом особенностей экстремальных галофилов) с программным обеспечением “BioDrome 3.0”.....	331
3.3. Ферментативные гидролизаты зерновых для культивирования и производства биомассы <i>Hbt. salinarum</i>	342
3.3.1. Ферментные препараты и режимы предобработки зерновых.....	344
3.4. Хранение биомассы <i>Hbt. salinarum</i> , регидратация после высушивания и оптимизация сохранения внутриклеточных каротиноидов.....	348
3.4.1. Параметры для оптимизации распылительной сушки биомассы галоархей.....	351
3.4.2. Сканирующая электронная микроскопия и гранулометрический состав высушенной биомассы галоархей.....	355

3.4.3. Фазово-контрастная микроскопия	358
3.4.4. Электронная микроскопия ультратонких срезов клеток галоархей	360
3.4.5. Хранение высушенных образцов биомассы галоархей	363
3.5. Техничко-экономические показатели производства бактериородопсина и биомассы <i>Hbt. salinarum</i> при различных вариантах исполнения	367
3.5.1. Особенности реализации элементов технологического процесса.....	369
3.5.2. Оценка себестоимости производства бактериородопсина и биомассы <i>Hbt. salinarum</i> при различных вариантах производства.....	379
3.6. Критика нестерильного культивирования экстремально галофильных микроорганизмов	383
3.6.1. Контаминация культур галофилов посторонней микрофлорой	383
3.6.2. Вирусное заражение при культивировании <i>Hbt. salinarum</i>	391
3.7. Карбонатогенез бактерий, выделенных из гиперсоленых сред, для улучшения свойств и защиты бетона и биопрепарат на их основе	395
3.7.1. Уреазная активность, ростовые характеристики и способность к биокальцинированию у бактерий, выделенных из различных источников	397
3.7.2. Исследование осаждения карбоната кальция клетками уробактерий.....	399
3.7.3. Исследование поверхностного заряда клеток уробактерий.....	402
3.7.4. Применение <i>Lysinibacillus macroides</i> для улучшения характеристик образцов гипсового камня...403	
3.7.5. Изучение характеристик цементного камня при введении уробактерий	405
3.7.6. Исследование функциональной активности иммобилизованных клеток уробактерий и микроструктуры иммобилизованной формы на основе диатомита	407
3.7.7. “Залечивание” трещин в бетоне с применением препаратов уробактерий	413
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	416
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	418
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	423
Приложение 1	560
Приложение 2	563
Приложение 3	569
Приложение 4	572
Приложение 5	575
Приложение 6	579

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Исследование физиологической активности микроорганизмов в экстремальных состояниях может дать импульс к созданию новых биопрепаратов и совершенствованию технологий получения широкого спектра ценных биологически активных соединений. При ведении процессов культивирования экстремофильных микроорганизмов (в условиях, которые принято считать экстремальными для большинства промышленных культур), способность управлять физиологическими реакциями клеток и возможность целенаправленного биосинтеза представляет важный резерв для развития промышленной биотехнологии.

Функционирование на грани выживаемости, в условиях повышенного осмотического давления при максимальном уровне солености, при высокой температуре и облучении, в условиях оксидативного стресса, на фоне межвидовой конкуренции, а также различной плотности популяции и доступности субстратов ведет к набору физиологических реакций, управление которыми может служить средством для совершенствования процессов управляемого культивирования микроорганизмов.

Поиск новых вариантов биосинтетических ответов клеток микроорганизмов на вышеперечисленные воздействия особенно интересен среди природных или искусственно сформированных лабораторных микробных сообществ, включающих экстремофильные культуры. Изучение многообразных обменных реакций внутри таких экстремофильных сообществ, установление вырабатываемых клетками веществ-регуляторов и продуктов метаболизма является более комплексным подходом, чем исследование традиционных биотехнологических процессов на основе монокультур. Биотехнологический потенциал и возможности особых метаболических путей, которые необходимы для существования сообществ экстремофильных культур, могут обеспечить

синтез более широкого спектра ценных, практически значимых биологически активных соединений.

В этой связи особенно интересны экотопы с экстремальными условиями, формирующие уникальные биоценозы микроорганизмов-экстремофилов, прежде всего – галофильные сообщества. Экстремально галофильные микроорганизмы обладают уникальным метаболизмом, который обусловлен необходимостью выживания клеток в водоёмах с максимальным уровнем солёности среды. Кроме того, в естественной среде обитания эти микроорганизмы встречаются с интенсивным солнечным облучением, несущим ультрафиолет, температурными аномалиями, резкими изменениями в обеспечении кислородом, окислительным стрессом, нехваткой питательных веществ, высыханием и регидратацией, которые определяют особенности общего и энергетического метаболизма галофилов.

Экстремальные галофилы уже десятки лет используются в ряде биотехнологических процессов. Наиболее исследованным экстремальным галофильным микроорганизмом являются галоархеи *Halobacterium salinarum*, биоактивные компоненты и биомасса которого находят различное практическое применение. Актуальность совершенствования биотехнологии галофильных микроорганизмов обоснована расширением, например, медицинского применения специфических биологически активных веществ, таких как каротиноиды, ферменты, гликопротеины галофилов, галоцины галоархей, полярные фосфолипиды и археосомы галоархей.

Однако, биотехнологический потенциал галофилов не раскрыт достаточно полно, что связано с наличием “белых пятен” в изученности физиологии клеток и применением стандартных (не достаточно адаптированных для галофилов) методов промышленного культивирования. Последнее приводит к неоптимальному функционированию продуцентов и незначительным выходам биосинтеза клетками целевых продуктов, выпуск препаратов на основе галофилов ограничивается малыми партиями.

В любых естественных условиях микроорганизмы существуют в виде достаточно устойчивых микробных сообществ, обладающих системой

внутренних обменных реакций и связей. Для развития биотехнологии экстремофильных микроорганизмов особенно интересно знать и важно использовать полезные свойства микробных сообществ экстремальных экосистем. Изучение метаболизма сопутствующих и находящихся в тесном взаимодействии с экстремальными галофилами микроорганизмов, а также расширение знаний о принципах функционирования экстремофильных сообществ, несомненно, может помочь в разработке биопрепаратов для применения в новых, ранее *не предполагавшихся* областях. Так, мало изучена роль, казалось бы, контаминирующих гиперсоленые среды бактерий рода *Bacillus* и родственных им, которые не обладают высокой галотолерантностью. Среди этих бацилл можно найти и продуцентов протеаз и виды, обладающие высокой уреазной активностью и биокальцинирующей способностью, которая востребована при строительстве и восстановлении изделий из бетона. Примером перспективного использования высокогалотолерантных микроорганизмов из галофильных сообществ можно считать культуры, которые обладают свойствами деструкторов трудно разлагаемых токсичных соединений (пестицидов, нефти и т.п.) и активно работают в широком диапазоне солености среды.

Публикации последнего времени позволяют говорить о нарастающем интересе со стороны косметических и фармацевтических фирм к галоархеям и галофильным бактериям. Переключение такого внимания с одного из наиболее изученных из синтезируемых галоархеями продуктов – фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина на исследования, связанные с общим пулом галобактериальных и галоархейных метаболитов/компонентов, позволяет судить о заинтересованности крупнейших игроков на рынке косметики и фармацевтики в препаратах на основе галофилов. При этом следует отметить, что технологии производства этих препаратов весьма далеки от оптимальности.

Таким образом, исследовательская часть работы состояла в изучении особенностей чистых культур галофильных микроорганизмов и галофильных микробных сообществ с целью использования уникальных биосинтетических способностей этих природных экстремофилов для реализации в

биотехнологических процессах, нацеленных на различные варианты практического применения.

Цель работы состояла в разработке промышленной малоотходной технологии культивирования экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum*, включающей высокоавтоматизированное регулирование биосинтеза целевых продуктов и оптимизацию сохранения получаемой биомассы, а также в использовании потенциала экстремально галофильных сообществ для реализации природоподобной технологии биокальцинирования.

Задачи, решавшиеся в ходе исследования:

– Комплексный анализ сообществ экстремальных галофилов, отдельных микроорганизмов во взаимосвязи с физико-химическими особенностями среды их обитания;

– Определение пределов устойчивости отдельных микроорганизмов и сообществ экстремальных галофилов, изучение стратегий адаптации галофилов в составе сообществ при изменении параметров окружающей среды и состава микробного сообщества (в том числе в критических физико-химических условиях, приводящих к кардинальному изменению состава сообщества);

– Изучение особенностей метаболизма экстремальных галофилов в изменяемых физико-химических условиях: выяснение механизмов защиты микроорганизмов при высушивании/регидратации, повышении/понижении температуры, при различных значениях рН, облучении (различной мощности и спектра) т.д.;

– Изучение механизмов генетической регуляции клеточного и фотозависимого энергетического метаболизма галофилов и влияние их на выработку практически значимых БАС. Обобщение результатов исследований механизмов, лежащих в основе регуляции синтеза каротиноидов и бактериородопсина у производственных культур экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum*;

– Анализ перспектив практического применения экстремально галофильных микроорганизмов и подходов к их культивированию;

- Разработка оптимального состава питательных сред для культивирования производственных штаммов галоархей *Hbt. salinarum*;
- Оптимизация режимов культивирования и разработка высокоплотностного культивирования производственных штаммов галоархей *Hbt. salinarum*;
- Создание высокоавтоматизированного комплекса и разработка адаптивного программного обеспечения для культивирования производственных штаммов *Hbt. salinarum*;
- Оптимизация режимов распылительной сушки биомассы галоархей *Hbt. salinarum* для увеличения срока хранения как самой биомассы, так и для сохранения в ней каротиноидов;
- Анализ и технико-экономическая оценка различных вариантов производства биомассы *Hbt. salinarum* и бактериородопсина, разработка высокоэффективной технологической схемы промышленного производства;
- Изучение возможности для создания биопрепарата, основанного на принципе биогенного карбонатогенеза в присутствии микроорганизмов из сообществ гиперсоленых сред, для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона.

Научная новизна работы

1. При оптимизации синтетической питательной среды для культивирования галоархей *Hbt. salinarum*, было показано стрессирующее действие продуктов окисления/фотоокисления ароматических кислот, что влияет на уровень накопления биомассы, а также на активность биосинтеза каротиноидов и БР.

2. Показано, что антиоксидантные свойства, химическая/фотохимическая трансформация компонентов питательной среды и метаболитов клеток *Hbt. salinarum*, а также режимы освещения растущей культуры находятся в тесной взаимосвязи и определяют биосинтетическую активность штаммов-продуцентов при высокоплотностном культивировании. На основании исследования этих связей впервые предложен алгоритм управления режимами высокоплотностного

культивирования *Hbt. salinarum*, обеспечивающий заданную направленность биосинтетических активностей клеток этих галоархей.

3. Для культур экстремальных галоархей показана возможность высокоплотного культивирования с удалением из ростовой среды или предотвращением образования ингибиторов биосинтеза целевых БАС. Для разных штаммов *Hbt. salinarum* показана возможность синтеза бактериородопсина или каротиноидов в высокоплотном режиме.

4. Впервые для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* использованы ферментолиты зерновых как источники аминокислотного питания и ростовых факторов.

5. Оптимизирован процесс распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum*, исследовано длительное хранение высушенной биомассы, изучен характер сопутствующих повреждений клеток экстремально галофильных архей.

6. Доказано, что при нестерильном культивировании экстремально галофильных архей и высокогалотолерантных бактерий возможна контаминация и быстрое замещение исходных культур микроорганизмов-продуцентов. Впервые показана возможность развития негалотолерантных бактерий рода *Bacillus* совместно с экстремально галофильными археями или высокогалотолерантными бактериями в условиях экстремально высокой солености среды. Показана возможность индукции галовирусов непосредственно в ходе культивирования экстремально галофильных архей.

7. Из микробных сообществ гиперсоленых сред выделены в чистом виде бактериальные культуры, обладающие высокой уреазной активностью и способностью к биокальцинированию.

Практическая значимость работы

1. Разработаны новые варианты синтетических сред для культивирования промышленных штаммов галоархей *Hbt. salinarum*, предложен состав комплексной питательной среды для экстремальных галофильных продуцентов каротиноидов и бактериородопсина.

2. Получены новые высокопродуктивные штаммы галоархей *Hbt. salinarum*: несколько штаммов-продуцентов фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина, отличающиеся сниженным уровнем спонтанных мутаций; штамм-продуцент C_{50} -каротиноидов, обладающий повышенной устойчивостью к поражению вирусами. Новые культуры депонированы в официальных Коллекциях микроорганизмов (Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НБЦ ВКПМ и коллекции уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения UNIQEM).

3. Подобраны оптимальные условия, обеспечивающие высокую эффективность процесса культивирования галоархей *Hbt. salinarum*, включающие способ подготовки посевного материала, внесение антиоксидантов, режимы и спектральные характеристики освещения культур. Оптимальные условия разработаны для непрерывного и высокоплотностного режимов культивирования штаммов-продуцентов каротиноидов и бактериородопсина промышленного уровня.

4. Создан высокоавтоматизированный комплекс для культивирования галофильных микроорганизмов, разработан опытно-промышленный регламент эксплуатации этого комплекса и программное обеспечение “ BioDrome 3.0” для управления биосинтетическими процессами, в которое интегрирована экспресс-методика определения содержания бактериородопсина. Управление комплексом обеспечивает поддержание оптимизированных режимов культивирования и разработанных вариантов автоматической регуляции биосинтеза серии целевых БАС, синтезируемых галофильными микроорганизмами.

5. Разработаны новые составы питательных сред для культивирования промышленных штаммов галоархей *Hbt. salinarum* на основе ферментоллизатов зерновых, полностью обеспечивающие потребности клеток в питании и ростовых факторах для высокоэффективного биосинтеза каротиноидов.

6. Определены режимы распылительной сушки биомассы галоархей *Hbt. salinarum* обеспечивающие оптимальные условия сохранения целостности и

самих клеток, и накопленных в них каротиноидов. Оптимизирован режим для получения высушенной биомассы галоархей с остаточной влажностью <5%.

7. При проведении модельных культивирований экстремальных галофилов в нестерильных условиях определены подходы, снижающие вероятность контаминации и её отрицательные эффекты: подавление роста и лизис целевых культур при развитии посторонней микрофлоры и вирусного заражения.

8. Разработан опытно-промышленный регламент производства биомассы экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum* и фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина.

9. Предложено использовать продукты лизиса галоархей *Hbt. salinarum* для создания новых медицинских препаратов комплексного действия. Мембран-ассоциированные протеазы галоархей долговременно стабильны при физиологической температуре, а каротиноиды галоархей являются прекрасными протекторами от активных форм кислорода для ферментов, ДНК и других биологически активных соединений. Стабилизированный (иммобилизованный) лизат клеток галоархей *Hbt. salinarum* может использоваться в ветеринарии и косметологии для лечения и профилактики различных заболеваний, в том числе и кожных.

10. Разработан лабораторный технологический регламент производства иммобилизованной формы биопрепарата, обладающего высокой биокальцинирующей активностью и устойчивостью к щелочной среде для использования в качестве технической добавки, улучшающей функциональные и защитные характеристики бетона. Основой биопрепарата являются чистые культуры бактерий *Lysinibacillus macroides*, выделенные из микробного сообщества гиперсоленого озера. Разработанный регламент обеспечивает биотехнологическое получение биопрепарата и его длительное хранение.

11. Автоматизированный комплекс для культивирования микроорганизмов и разработанное программное обеспечение “BioDrome 3.0” и его элементы используется в научных исследованиях, а также в учебном процессе в РХТУ им. Д.И. Менделеева на кафедре биотехнологии и кафедре процессов и аппаратов

химической технологии. Ранние версии ПО “BioDrome” использовались в научных исследованиях на стендах ГУП НПО “Астрофизика”, ВНИИ Молочной промышленности.

Разработаны новые способы культивирования микроорганизмов, защищенные патентами РФ.

Связь работы с научными программами

Исследования выполнены в 2001-2020 годах в рамках и при поддержке следующих научных программ, грантов, НИР, контрактов: грант РФФИ 16-19-10469 “Разработка технологии получения импортозамещающих пищевых ингредиентов и белковых кормовых продуктов, обогащенных функциональными компонентами, на основе возобновляемого растительного сырья” (2016-2020 гг.); госзадание Минобразования 4.5404.2011 “Разработка высокоэффективных методов биосинтеза и биологической очистки на основе контролируемого окислительного стресса как нового подхода к управляемому культивированию микроорганизмов” (2012-2013 гг.); грант “Темпус” 2010 – 3358/001-001 “Реформа высшего образования по биотехнологии: разработка и усовершенствование стандартов и учебных планов по подготовке бакалавров и магистров” (2010-2014 гг.); НИР в рамках ФЦП ГК № 02.740.11.0784 “Биоинженерия и биологическая основа новых высокоэффективных методов культивирования микроорганизмов и их применение в микробиологическом синтезе, при переработке отходов и биологической очистке” (2010-2012 гг.); НИР в рамках АВЦП 2.1.1/3817 “Физиолого-биохимические и генетические основы управления микробным синтезом в условиях контролируемого стресса” (2009-2010 гг.); НИР в рамках АВЦП РНП 2.1.1.6.177 “Изучение коммуникационных взаимодействий в сообществе микроорганизмов при их структурной организации” (2006 г.); АВП (направление 3907) “Разработка технологий высокоинтенсивного и ресурсосберегающего биокатализа и биосинтеза для получения продуктов кормового, пищевого и технического назначения” (2005 г.); НИР 529/15.3-01-04 “Оптимизация и разработка методик проведения процесса культивирования штаммов галобактерий с использованием лазеров и

светодиодов” (2004 г.); НИР 506/15.3-6-02ГБ “Разработка измерительных систем лазерного биореактора и их отработка в экспериментах” (2002 г.); НИР Минобразования РФ 2.6.2.(00.0)221.009 “Создание лабораторного биореактора и локальной системы программного обеспечения для комплекса практических занятий удаленного доступа для подготовки инженеров по специальности «Биотехнология»” (2001-2002 гг.).

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Разработаны композиции питательных сред для культивирования экстремальных галофилов, учитывающие химическую/фотохимическую трансформацию компонентов среды и метаболитов, синтезируемых в процессе культивирования.

2. Предложены высокоавтоматизированные способы и аппаратурное оформление для промышленного культивирования экстремальных галофилов в непрерывных и высокоплотностных режимах, нивелирующие образование ингибиторов биосинтеза целевых продуктов.

3. Разработано универсальное программное обеспечение (для управления биотехнологическими процессами, включая высокоплотностное культивирование экстремальных галофилов промышленного уровня), в которое интегрированы стратегии регуляции биосинтеза целевых БАС, синтезируемых галофилами.

4. Для снижения стоимости производства биомассы и различных БАС синтезируемых экстремальными галофилами, предложена замена традиционных полноценных ростовых сред на ферментоллизаты зерна как источники аминокислотного питания и ростовых факторов.

5. Оптимизированы режимы распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum*, исследованы процессы хранения и регидратации клеток.

6. Разработана технология высокоплотностного культивирования галоархей *Hbt. salinarum* для производства биомассы, бактериородопсина и каротиноидов галоархей.

7. Разработана иммобилизованная форма биопрепарата для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона на основе бактерий *Lysinibacillus macroides*, выделенных из гиперсоленого озера.

Апробация результатов работы

Основные результаты и положения диссертационной работы были представлены и доложены на следующих российских и международных научно-технических конференциях и конгрессах: Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003, 2005, 2007, 2009, 2011, 2013, 2015 гг.); Международная конференция «Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LabVIEW и технологии National Instruments» (Москва, 2003, 2004 гг.); Международный Форум «Высокие технологии XXI века» (Москва, 2004, 2006, 2012 гг.); European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004, Oostende, Belgium); International Scientific GeoConference SGEM (Albena, Vienna, 2017, 2018, 2019, 2020); Международная школа-конференция «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2006 г.); Международная конференция молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ» (Москва, 2002, 2015, 2016, 2020 гг.); X Московский международный салон инноваций и инвестиций (Москва, 2010); Международная конференция «Minds in Touch – IX Edition» (Неаполь, 2010); Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы химической технологии биологически активных веществ» (Москва, 2016); XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016); XVIII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2016); XVII Международная научная конференция «Математические методы в технике и технологиях – ММТТ-17» (Кострома, 2004 г.); VI Межвузовская учебно-методическая конференция «Многоуровневая подготовка и качество образования» (Москва, 2004).

Публикации по теме диссертации

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 42 работах, из них 19 в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ, в том числе 13 публикаций в журналах, индексируемых в международных информационно-аналитических системах научного цитирования (Web of Science и Scopus), получены 3 патента на изобретение РФ, 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ; подготовлены 2 монографии и 2 учебных пособия.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из 3-х глав, включая введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты экспериментальных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, библиографический список, включающий 1309 наименований и 6 приложений. Текст диссертации изложен на 588 страницах, иллюстрирован 67 рисунками и 22 таблицами.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика гиперсоленых сред обитания и их обитателей

1.1.1. Гиперсоленые среды

Можно с уверенностью сказать, что, за небольшим исключением, все водные экотопы на планете Земля являются солеными. Моря и океаны покрывают около 2/3 Земной поверхности и являются самыми обширными депозитами соленой воды на нашей планете, включая порядка 96,5% Земной гидросферы. Морская вода содержит 3,5% растворенных солей (0,6 М), большая часть которых приходится на долю хлорида натрия (NaCl) [1]. Однако, повсеместно можно обнаружить множество водоемов, как естественных, так и антропогенных, чьи воды характеризуются более высокими концентрациями растворенных солей [2-6]. Такие среды обитания принято называть гиперсолеными.

Гиперсоленые среды обитания, будь то водные или сухопутные геоценозы, возникают, как правило, в результате двух процессов: испарения водоемов и выщелачивания эвапоритов [4, 7-9]. Данные процессы тесно взаимосвязаны, несмотря на длительные промежутки времени (вплоть до геохронологических эпох), которые могут их разделять. Активное испарение водоемов способствует образованию рапы – водных высококонцентрированных растворов минеральных солей. Подобные раповые водоемы являются наиболее распространенными водными гиперсолеными объектами.

Многие современные гиперсоленые водоемы, такие как соленые озера и пруды, обнаруживают в обоих полушариях в зонах с умеренным, субтропическим и тропическим климатом. Данные климатические зоны, характеризующиеся наличием длительных периодов с высокой температурой воздуха и продолжительным световым днем, являются благоприятными для процессов активного испарения воды из изолированных или терминальных водоемов [4, 10-11]. Стоит отметить, что гиперсоленые водоемы характерны не только для перечисленных климатических зон. Несколько соленых прудов и озер были обнаружены в зоне полярного климата, в Антарктиде, а также за северным полярным кругом в северных регионах Канады, Норвегии и др. [11-13]. Своим

формированием эти гиперсоленые водоемы обязаны процессам «вымораживания» солей: в условиях постоянных низких температур происходит постепенное вымерзание воды, что способствует концентрированию солевых растворов [4]. Однако, несмотря на существенное отличие физической первопричины, данный процесс способствует формированию условий, аналогичных условиям, устанавливающимся в процессе постепенного испарения воды и ведущих к образованию рапы.

В зависимости от качественного и количественного состава минеральных солей, растворенных в их водах, гиперсоленые водные среды подразделяются на «талассовые» и «аталассовые» [3, 14].

Большинство гиперсоленых объектов имеют морское происхождение. Повсеместно в прибрежной зоне морей и океанов можно обнаружить изолированные заливы, бухты, многочисленные пруды и небольшие озера, питаемые морской водой. Образованные из подобных водных объектов путем их частичного испарения гиперсоленые водоемы сохраняют свойственные морским водам гидрохимические характеристики: высокие концентрации ионов Na^+ и Cl^- , значительно меньшие концентрации ионов Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Br^- , HCO_3^- и F^- , а

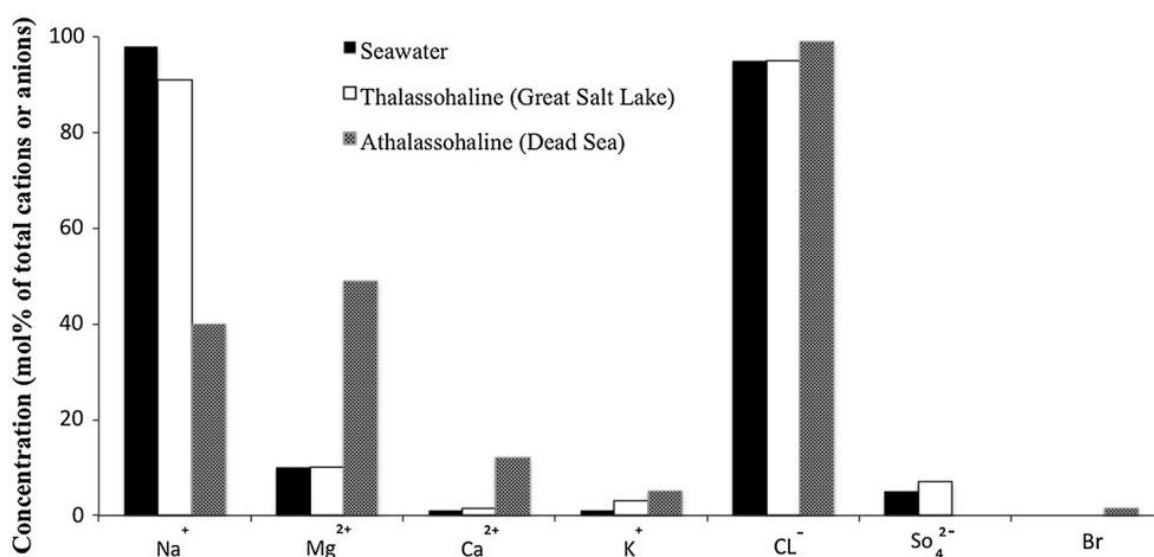


Рисунок 1.1. Ионный состав морской воды и вод талассовых и аталассовых гиперсоленых сред обитания [15]. Колонки обозначают мольную долю различных катионов и анионов в рапах разного типа.

также нейтральный или слегка щелочной pH. Такие объекты называются «талассовыми», или «талассогалинными» (от греческого слова «*thalassa*», море) [1, 3, 14-15]. Приморскими гиперсолеными водоемами являются, например, Гуэрра Негро (Нижняя Калифорния, Мексика) [16-17], озеро Сиваш и другие многочисленные соленые озера полуострова Крым (Россия) [5], Акуля бухта (Австралия) [18]. Талассогалинные водные объекты могут быть обнаружены не только в прибрежной зоне морей и океанов, но и в глубине континентов. Примером одного из самых крупных талассовых гиперсоленых водоемов континентального типа является Большое Соленое озеро (Юта, США) [19].

Дальнейшее концентрирование рапы в талассовых водоемах приводит к началу процессов преципитации различных минеральных солей и формированию эвапоритовых отложений. Согласно имеющимся геохимическим данным, подобные процессы на нашей планете начали происходить еще в Докембрийский период. Постепенная эволюция поверхности Земной коры и регулярное изменение уровня Мирового океана в разные моменты геохронологической шкалы способствовали временной изоляции некоторых внутренних морей и крупных заливов. Ярким примером такого процесса является Мессинский солевой кризис, произошедший в конце миоцена [20]. Это событие, в процессе которого Средиземное море претерпело порядка восьми циклов практически полного пересыхания, привело к образованию обширных депозитов эвапоритовых отложений. Объем эвапоритовых пород, образовавшихся в результате этого и аналогичных геологических событий, по разным оценкам составляет порядка 2% континентальных плит. Эвапориты в дальнейшем могут либо растворяться вновь прибывшей водой, либо укрываться осадочными породами и на длительное время захораниваться в глубине континентальных плит. Такие древние эвапоритовые породы под воздействием тектонических и сейсмических процессов могут перемещаться в поверхностные слои Земной коры и обнажаться, формируя различные гиперсоленые среды обитания [4].

Важной особенностью эвапоритов является их неоднородная структура, обусловленная последовательным выпадением различных минеральных солей в

процессе их образования. По мере постепенного испарения талассовых водоемов, происходит образование все более насыщенной рапы, основной минеральной составляющей которой является хлорид натрия. В процессе увеличения концентрации NaCl в растворе, минорные минеральные составляющие начинают последовательно осаждаться. В первую очередь выпадают плохо растворимые даже при низких концентрациях NaCl карбонат, сульфат и хлорид кальция, образуя нижние глубоко залегающие слои эвапоритовых пород. Дальнейшее насыщение рапы приводит к кристаллизации различных солей магния, натрия и в меньшей степени калия, образующих верхние наиболее доступные и легко растворимые слои эвапоритов [4]. Выщелачивание разных слоев эвапоритовых отложений приводит к формированию гиперсоленых сред с разными химическими свойствами: как талассовых, так и сред, чей качественный и количественный минеральный состав сильно отличается от состава морской воды. Подобные гиперсоленые водоемы называются «аталассовыми», или «аталассогалинными» [3, 14]. В отличие от талассовых водоемов, где обязательными доминирующими ионами являются Na^+ и Cl^- , в водах аталассового водоема основным катионом может являться как Na^+ , так и Mg^{2+} или Ca^{2+} . Анионная составляющая минеральной композиции аталассовых вод может быть представлена ионами Cl^- , SO_4^{2-} и $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ [3, 14-15]. Многие континентальные гиперсоленые водоемы являются аталассовыми. Примерами аталассовых водоемов являются Мертвое море (граница Израиля и Иордании) [21], Озера Вади-ан-Натрун (Египет) [22], озеро Моно (Калифорния, США) [23], озеро Магади (Кения) [24] и другие аналогичные озера Кении и Танганьики, а также Индии, Тибета, России [25-30].

Ярким примером гиперсоленых сред обитания, чьи гидрохимические свойства напрямую зависят от геохимических характеристик их локации, являются глубоководные гиперсоленые анаэробные бассейны (ГГАБ, DNABs, deep hypersaline anoxic basins), образующиеся в глубоководных морских впадинах [9, 31-40]. Постепенное обогащение морской воды растворенными минеральными солями способствует протеканию процессов гидротермического разделения фаз и

концентрированию гиперсоленых вод в различных физически изолированных геологических образованиях, как, например, впадины морского дна. Химическая природа эвапоритов, выщелачиваемых морской водой при образовании глубоководных гиперсоленых озер, сильно влияет на минеральный состав их вод. В большинстве случаев воды глубоководных соленых озер характеризуются как талассовые, однако существуют исключения [9, 33, 41].

Одна из известных групп глубоководных соленых озер находится в восточной части Средиземного моря. Несмотря на то, что средиземноморские глубоководные соленые озера находятся в непосредственной географической близости, их воды характеризуются большим разнообразием минерального состава: абсолютное содержание растворенных солей в водах наиболее соленого озера (36,5%) данного комплекса четырёхкратно превышает таковое для вод наименее соленого озера (9,5%); бассейн Тиро характеризуется самым высоким содержанием ионов Na^+ (5,3М) и самым низким содержанием ионов магния ($<0,1\text{М}$); бассейн Дискавери обладает рекордно высокими (5М) концентрациями ионов Mg^{2+} и крайне низкими концентрациями Na^+ ($<0,1\text{М}$). Такое разительное различие минерального состава вод связано, вероятно, с выщелачиванием отдельными озерами разных пластов мессинских эвапоритов [9, 33].

1.1.2. Галофильные и галотолерантные микроорганизмы

Несмотря на то, что минеральные соли являются одним из биогенных классов химических соединений, без которых невозможно существование и размножение ни одного из существующих живых организмов, их высокие концентрации в окружающей среде губительны для представителей многих видов. Исключение представляют галофильные организмы, способные существовать в гиперсоленых средах, соленость которых может в разы превышать соленость морской воды (3,5%). Минимальные, оптимальные и максимальные концентрации солей, необходимые для стабильной жизнедеятельности микроорганизмов, часто определяются не только их таксономической принадлежностью, но и физико-химическими характеристиками окружающей среды, а также особенностями ростовых субстратов. Подобная ситуативная

зависимость требований разных организмов к концентрациям солей значительно усложняет задачу четкой формулировки определения галофилизма и классификации галофильных организмов в соответствии с их отношением к солености окружающей среды. В простейшем случае галофил может быть определен как организм, оптимально растущий при концентрациях солей, равных или превышающих 50 г/л (0,85 М NaCl), и невосприимчивый к увеличению солености среды до, по меньшей мере, 100 г/л растворенных солей (1,7 М NaCl) [42].

Около 40 лет назад Донном Кушнером была предложена более подробная классификация галофильных организмов. В зависимости от оптимальных значений солености среды, необходимых для их активной жизнедеятельности, галофильные организмы делятся на слабо (30 – 50 г/л; 0,5 – 0,85 М NaCl), умеренно (50 – 150 г/л; 0,85 – 2,5 М NaCl) и экстремально галофильные (150 – 350 г/л; 2,5 – 5,2 М NaCl). Также выделяют группу галотолерантных организмов, не требующих для оптимального роста высоких концентраций минеральных солей, но способных существовать в широком спектре диапазонов солености [14-15, 42-43].

Галофильные организмы представлены во всех трех доменах жизни. Галофильные организмы бактериального домена относятся к типам *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*. Известные археи-галофилы принадлежат типу *Euryarchaeota* и относятся к классам *Halobacteria* и *Methanomicrobia*. Представители эукариотических галофильных организмов обнаружены в царствах животных, растений и грибов, а также в типах *Ciliates* (инфузории) и *Flagellates* (флагелляты) [3, 14-15, 44-46].

1.1.3. Высокая соленость

Гиперсоленые среды плохо адаптированы для жизни в них. Ввиду прекрасной водной проницаемости биологических мембран, высокая осмолярность окружающей среды приводит к активному оттоку внецитоплазматической воды сквозь клеточную стенку. Во избежание неминуемой гибели от осмотического шока в условиях высокой солености галофильными

организмами был выработан ряд адаптивных стратегий. Для живых клеток характерны следующие особенности: активность воды в цитоплазме чаще всего отличается от активности воды в окружающей среде; внутриклеточное осмотическое давление, равное или превышающее осмотическое давление окружающей среды. Разность активностей воды цитоплазмы и окружающей среды необходима для осуществления пассивного транспорта воды как в клетку, так и из нее. Изоосмотический баланс цитоплазмы и окружающей среды необходим для поддержания постоянной формы клетки. Большинство организмов, за исключением некоторых архей класса *Halobacteria* [47], стремятся создать положительную разницу осмотических давлений цитоплазмы и окружающей среды (положительный тургор), служащую движущей силой роста клеток [48].

Активный транспорт воды в клетку в условиях гиперсоленых сред обитания является крайне энергозатратным способом установления изоосмотического баланса, и на сегодняшний день не известно ни одного организма, применяющего данную стратегию на практике [42]. Для достижения высокого внутриклеточного давления галофильными организмами применяются две осмоадаптивные стратегии: “high-salt-in” и “low-salt-in”. Каждая из стратегий имеет как сильные, так и слабые стороны. Стратегия “high-salt-in” заключается в установлении изоосмотического баланса путем накопления внутри клетки концентраций неорганических ионов, эквивалентных концентрациям солей в окружающей среде. Ввиду того, что большинство гиперсоленых сред характеризуются как талассовые и содержат большие количества ионов Na^+ и Cl^- , стратегия “high-salt-in” состоит в активном накапливании высоких внутриклеточных концентраций ионов K^+ и Cl^- . Стратегия “low-salt-in” заключается в накоплении в цитоплазме клеток посредством биосинтеза *de novo* и/или управляемого забора из окружающей среды, так называемых, «совместимых» растворенных веществ, представленных низкомолекулярными органическими веществами разной природы [15, 42, 49-50].

1.1.3.1. Стратегия “high-salt-in”

Несмотря на то, что стратегия “high-salt-in” менее энергозатратна и не требует наличия особых метаболических путей, высокие концентрации неорганических ионов в цитоплазме подразумевают значительные адаптационные изменения протеома: большинство белков имеют отрицательный поверхностный заряд, денатурируют в водных растворах с соленостью ниже 1 – 2 М, проявляют повышенную активность в присутствии ионов K^+ [42, 50-53]. На сегодняшний день известны лишь некоторые организмы, принадлежащие к ограниченному числу таксономических групп, использующих данную осмоадаптивную стратегию. К ним относятся галоархеи семейства *Halobacteriaceae*, в частности *Halobacterium salinarum* и *Haloarcula marismortui* [42, 53], анаэробные бактерии семейства *Halanaerbiales (Firmicutes)* [54-55], а также экстремально галофильных аэробных бактерий *Salinibacter ruber* и *Salisaeta longa (Bacteroidetes)* [56-57].

Результаты первых попыток измерить концентрации ионов минеральных солей в цитоплазме экстремально галофильных архей показали, что их клетки содержат изомолярные во внеклеточной среде концентрации солей, а доминирующими ионами являются K^+ и Cl^- . Измерение реальных концентраций ионов Na^+ не представлялось возможным ввиду несовершенства доступных методов и его высоких концентраций во внеклеточной среде [58-60]. Последующие попытки верифицировать полученные результаты принесли неожиданные результаты. Эксперименты с применением сканирующей электронной микроскопии с рентгеновским спектрометром для измерения внутриклеточных концентраций ионов клеток *Halobacterium salinarum*, выращенных на среде, содержащей 4,28 М NaCl и 0,036 М K^+ , установили, что содержания ионов K^+ и Cl^- в цитоплазме в среднем составляли ~4,05 М и ~4,65 М, что в 110 и 1,1 раз соответственно превышало содержание этих ионов в минеральной среде. Концентрация ионов Na^+ составила треть (~1,25 М) от концентрации таковых в ростовой среде [61].

1.1.3.2. Стратегия “low-salt-in”

Стратегия “low-salt-in” заключается в накоплении больших внутриклеточных концентраций низкомолекулярных органических соединений,

называемых совместимыми растворенными веществами (также называемых осмолитами или осмопротекторами). Термин «совместимые растворенные вещества» был впервые введен в 1972 году Брауном и Симпсоном для обозначения соединений, присутствующих в цитоплазме клетки в высоких концентрациях, но не оказывающих влияния на активность действующих ферментов [62]. В последующем определение было расширено: совместимыми растворенными веществами стали называться вещества, не влияющие на протекание процессов клеточного метаболизма [63].

Данная стратегия является менее энергетически выгодной по сравнению со стратегией “high-salt-in”, однако отсутствие необходимости адаптации всех клеточных механизмов к работе в условиях высоких концентраций неорганических ионов делает ее более универсальной. Многие галофильные и галотолерантные организмы, обитающие в условиях с относительно низкой соленостью (5 – 15%), аккумулируют в цитоплазме большие количества различных низкомолекулярных органических соединений, что обеспечивает установление изоосмотического баланса и не сказывается на функционировании ферментов, не адаптированных к высоким концентрациям солей, но сохраняющих активность в широком диапазоне концентраций разнообразных совместимых растворенных веществ [15, 42, 49-50].

Среды обитания слабо, умеренно галофильных и галотолерантных организмов часто подвержены активной смене водных режимов. Регулярное пересыхание водоема вследствие испарения с последующим его наводнением после обильного дождя способствуют частому и резкому изменению концентраций минеральных солей во внеклеточной среде [64]. Стратегия “low-salt-in” обеспечивает приспособленность организмов, обитающих в подобных условиях, как к гиперосмотическому, так и к гипоосмотическому видам стресса. Быстрая активация путей биосинтеза и механизмов активного транспорта осмопротекторов извне в случае резкого увеличения солености окружающей среды способствует стремительному увеличению осмолярности цитоплазмы клеток и установлению изоосмотического равновесия. Обратный процесс

осуществляется при резком уменьшении концентраций растворенных солей во внеклеточной среде: концентрации осмолитов в цитоплазме клеток быстро снижаются путем их активного экспорта из клетки (что также способствует увеличению осмолярности окружающей среды) или посредством дериватизации в менее осмотически активные соединения [3].

Осмопротекторы должны соответствовать следующим требованиям: быть хорошо растворимыми при физиологических условиях клетки и, несмотря на высокие концентрации, не влиять на процессы клеточного метаболизма. Организмы разной филогенетической принадлежности синтезируют множество разнообразных осмолитов, чья природа диктуется метаболическими, физиологическими и экологическими особенностями их продуцентов. Известные совместимые растворимые вещества могут быть отнесены к одному из следующих классов химических соединений: аминокислоты и их производные, в частности, полиолы и их производные, сахара и их производные, метиламины, мочевины, сульфониевые соединения [3]. В соответствии с их физическими свойствами осмолиты можно разделить на три большие группы: цвиттер-ионы, незаряженные соединения и анионные соединения. Стоит отметить, что осмолиты негалофильных, галотолерантных, а также легко и умеренно галофильных бактерий в большинстве случаев являются полярными, не имеющими суммарного заряда, в то время как осмолиты архей при их внутриклеточном pH несут отрицательный заряд [49].

Продуцируемые в клетках всех живых организмов разнообразные аминокислоты (например, протеиногенные аминокислоты) являются хорошими претендентами на роль универсальных осмопротекторов. Однако, ввиду участия данного класса органических соединений во многих путях биосинтеза широкого спектра соединений, накопление больших количеств аминокислот в цитоплазме может негативно влиять на некоторые метаболические пути. Тем не менее, многие виды бактерий, архей, а также одноклеточных и многоклеточных эукариот используют аминокислоты и их деривативы в качестве совместимых

растворенных веществ. К осмопротекторам аминокислотного происхождения относятся:

- протеиногенные аминокислоты (α -аминокислоты): пролин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, аланин и др;
- производные протеиногенных аминокислот, в частности амиды глутаминовой кислоты: N- α -карбамоилглутаминамид, N- α -ацетилглутаминилглутаминамид;
- бетаины (N,N,N-триметиламинокислоты): глицин бетаин, пролин бетаин, β -аланин бетаин, β -глутамат бетаин и др.;
- непротеиногенные аминокислоты, в частности β - и γ -аминокислоты, диаминокислоты: β -глутаминовая кислота, β -глутамин, N ϵ -ацетил- β -лизин, γ -аминомасляная кислота;
- производные непротеиногенных аминокислот, в частности N-ацетилированные диаминокислоты: N δ -ацетилорнитин, N ϵ -ацетиллизин и др.;
- эктоин и его производные;
- серосодержащие аминокислоты: таурин и гипотаурин [49, 65-66].

Полиолы и сахара, а также их производные являются второй группой осмолитов, наиболее часто аккумулируемых клетками галофильных и галотолерантных бактерий и эукариот [49, 65-66]. К осмопротекторам группы полиолов и углеводов относятся:

- линейные и циклические полиолы ($C_3 - C_6$): глицерин, маннитол, сорбитол и др.;
- моно- и дисахариды и их производные: глюкоза, манноза, трегалоза, сульфотрегалоза, сахароза, манносахароза;
- гетерозиды: гликозилглицериды и др.

Мочевина в качестве осмопротектора используется исключительно животными [67].

Среды обитания галофильных микроорганизмов сильно отличаются степенью стрессирования обитателей. Глубина осмотического шока является

определяющим фактором выбора микроорганизмом соответствующего осмолита. Негалофильные и слабо галофильные микроорганизмы в подавляющем большинстве случаев осуществляют синтез и накопление дисахаридов в качестве совместимых растворенных веществ, в то время как более галофильные микроорганизмы аккумулируют гликозилированные полиспирты и азотсодержащие органические соединения. Так, негалофильные и легко галофильные микроорганизмы (например, *E.coli*, представители рода *Salmonella* и другие), обитающие в средах, концентрации солей в которых не превышают 0,5 М NaCl, накапливают трегалозу или сахарозу, а умеренные галофилы (цианобактерии или галофильные *Pseudomonas*), являющиеся типичными обитателями морских экосистем, накапливают гликозилглицериды. Галофильные бактерии, обитающие в условиях солености, эквивалентной 1,72 М раствору NaCl, предпочитают синтезировать и накапливать в качестве осмопротекторов различные аминокислоты или их производные, такие как глицин, бетаин и эктоины [68].

Регулярно меняющиеся условия гиперсоленых экосистем, выраженные в резком изменении осмолярности окружающей среды и смене типов питательных субстратов и, как следствие, соотношения биогенных элементов, требуют от их обитателей гибкости адаптивных механизмов. Многие галофильные организмы несмотря на предпочтение, отдаваемое азотсодержащим осмопротекторам, используют другие типы совместимых растворенных веществ одновременно, что позволяет поддерживать изосмотический баланс вне зависимости от текущих пищевых ограничений их среды обитания. *Corynebacterium glutamicum*, накапливающий пролин и трегалозу, при избытке источников азота в окружающей среде осуществляет биосинтез и аккумуляцию пролина как основного осмопротектора. В условиях азотного голодания метаболизм *C. glutamicum* переключается на активный биосинтез трегалозы [69]. Для *Halorhodospira halochloris* также характерно накопление азотсодержащего и углеводного совместимых растворенных веществ – глицина бетаина и трегалозы. В данном случае, основным осмопротектором вне зависимости от условий

является глицин бетаин, однако *H. halochloris* способны увеличивать содержание трегалозы в цитоплазме клеток в ответ на критическое уменьшение доступности азотсодержащего субстрата [70].

1.1.4. Природный цикл галофилов

Периодические изменения факторов окружающей среды характерны для подавляющего большинства экосистем, и гиперсоленые среды не исключение. Гиперсоленые геоценозы являются экосистемами со множественными экстремальными факторами. Помимо высокой солености и разнообразных индивидуальных характеристик отдельно взятых природных объектов, таких как повышенные или пониженные температуры, пиковые значения рН, отсутствие кислорода и т.д., многим наземным гиперсоленым средам обитания свойственны общие черты: они олиготрофны, подвергаются испарению, воздействию интенсивного солнечного излучения [3].

Многих наземным гиперсоленым экосистемам характерна периодическая смена режимов водного питания, как правило, сопряженная со сменой засушливых сезонов и сезонов, характеризующихся обильными атмосферными осадками. Экологическая динамика небольшого гиперсоленого биогеоценоза сильно связана со сменой его водного режима [3, 7, 22]. Для озер Вади ан-Натрун, а также иных многочисленных мелких озер и прудов, характерна кардинальная смена среды обитания в процессе их сезонного жизненного цикла: от пресноводной до гиперсоленой, иногда с последующим полным высыханием водоема. Наступление сезона с регулярными атмосферными осадками способствует наводнению озера. При этом его начальная соленость может быть ниже или эквивалентна солености морской воды. Активное облучение солнечным светом, а также отсутствие обильных атмосферных осадков, способствуют испарению водоема, сопровождающемуся постепенным увеличением солености, которая в конечном счете достигает максимальных значений (5,2 М NaCl) [22]. Дальнейшее испарение воды приводит к началу кристаллизации солей. Терминальным этапом жизненного цикла некоторых водоемов является их полное высыхание [4, 22].

Сезонность водного баланса не оказывает значительного влияния на глобальные гидрохимические характеристики крупных соленых ценозов, таких как Большое Соленое озеро или Мертвое море, и приводит лишь к легким флуктуациям солености и уровня воды [19, 21]. Однако, аналогичная хронология свойственна глобальным эволюционным процессам многочисленных древних соленых ценозов. Обнаружение следов галофильных организмов во многочисленных эвапоритах возрастом вплоть до 425 млн. лет, говорит о длительной коэволюции гиперсоленых сред и биоты их населявшей. Воздействие повышенных температур, регулярные флуктуации солености, нередко достигавшей экстремально высоких значений, перестройки молодой атмосферы и, как следствие, высокие дозы ультрафиолетового облучения, периодическое высыхание и низкая доступность источников биогенных элементов способствовали выработке галофильными организмами уникальных свойств ксерофильных олиготрофов, способных переносить интенсивное облучение [4, 20, 64].

Олиготрофы – организмы, способные жить в условиях экстремальной нехватки биогенных элементов и макроэлементов. Олиготрофным организмам свойственны медленный рост и низкая скорость метаболизма [64]. Естественными экологическими нишами олиготрофов являются пещеры, глубоководные области морей и океанов, ГГАБы, бедные почвы, ледниковые и полярные ценозы [71-78]. Несмотря на то, что многие гиперсоленые среды обитания характеризуются высокой плотностью микроорганизмов и развитыми сетями трофических взаимодействий, свойственные им резкие изменения осмолярности часто ведут к глобальным экосистемным перестройкам и выводу биогенных химических элементов из их круговорота в виде субстратов, не утилизируемых экологическим сообществом нового состава. В таких средах обитания концентрации органических соединений редко превышают нескольких миллиграмм в литре воды [79].

Одной из адаптивных стратегий олиготрофных микроорганизмов является замедление метаболизма и оптимизация соотношения площади поверхности

клетки и ее объема. Замедление метаболизма подтверждается многочисленными сообщениями о низких концентрациях АТФ в «спящих» или голодающих клетках и спорах. Большая площадь поверхности клетки способствует увеличению эффективности поглощения субстрата из среды, а её маленький объем не снижает эффективности внутриклеточных диффузионных процессов [64, 80-82]. Большинство олиготрофных микроорганизмов решают задачу максимизации соотношения площади клетки к её объему путем формирования сферических клеток с минимальным радиусом. Такая миниатюризация клеток достигается в первую очередь за счет уменьшения её содержимого: клетки олиготрофных организмов характеризуются минимальным необходимым числом рибосом, низким содержанием РНК и белков, а также геномом маленьких размеров [80]. Уникальными примерами оптимизации отношения клеточной поверхности к её объему являются *Haloquadratum walsbyi* и *Haloferax volcanii* [81-83]. Данные микроорганизмы имеют плоскую форму клеток: *Haloquadratum walsbyi* – квадратную, *Haloferax volcanii* – дисковидную. В то время как микроорганизмы со сферическими клетками вынуждены минимизировать клеточные размеры, плоские микроорганизмы такого ограничения не имеют, так как соотношение площадь-объем всецело определяется толщиной их клеток: толщина клеток *Haloquadratum walsbyi* составляет всего 0,1 – 0,5 мкм, в то время длина её ребра может достигать 40 мкм. Такая форма клетки *Haloquadratum walsbyi* также способствует повышению эффективности их фототрофного роста. Равномерное распределение плоских квадратных клеток на поверхности водоема обеспечивает рациональное использование доступного пространства и максимизирует поглощение энергии света, что, несомненно, является примером уникальной адаптационной стратегии микроорганизмов к существованию в условиях гиперсоленых сред [81-82].

Многие прокариоты накапливают в клетках различные запасные вещества. Ярким примером такого запасного вещества являются полигидроксibuтираты (ПГБ), синтезируемые микроорганизмами в условиях избытка углеродсодержащего субстрата и лимитирования по другим биогенным

элементам: азоту, кислороду, фосфору или сере. Ввиду плохой растворимости молекулярного кислорода при высоких температурах в концентрированных растворах солей, гиперсоленые экосистемы часто характеризуются как гипоаэробные, что делает ПГБ подходящим запасным полимером для галофильных микроорганизмов, потребляемым в случае отсутствия других углеродных субстратов. Иным запасным полимером непрямого назначения может являться ДНК. Многие галофильные организмы способны потреблять ДНК, находящуюся в окружающей среде, в качестве питательного субстрата. Некоторые галоархеи, в частности *Haloferax volcanii*, тоже способны деградировать внеклеточную ДНК, а также, будучи полиплоидами, в состоянии сильного голода по углероду, азоту, кислороду и фосфору, могут утилизировать часть своих собственных хромосом [64, 80].

При высыхании, как и в случае их обитания в гиперсоленых условиях, клетки микроорганизмов подвергаются сильному осмотическому стрессу. Но, в отличие от условий соленых вод, в которых активность воды понижена, но достаточно высока, высушиваемые клетки микроорганизмов находятся в сухой воздушной среде. В то время как чувствительные к высушиванию микроорганизмы не переносят снижения содержания воды в клетках до 0,3 г/г абсолютно сухой биомассы, ксерофильные организмы легко переносят потерю влаги вплоть до 0,1 г/г АСБ [84].

При такой экстремально низкой влажности биомассы невозможно обеспечить покрытия всех внутриклеточных макромолекул однородной мономолекулярной гидратной оболочкой. Плохая гидратация белков, способствующая их конформационным изменениям и снижению активности, ведет к частичной дисфункции метаболических путей, в частности электрон-транспортных путей. Невозможность утилизировать образующиеся при нормальном метаболизме клетки свободные радикалы приводит к их накоплению и, как следствие, активным процессам перекисного окисления липидов, денатурации белков и снижению стабильности ДНК. Отсутствие гидратирования фосфолипидов клеточной мембраны способствует усилению взаимодействий Ван-

дер-Ваальса, что приводит к увеличению температуры фазового перехода билипидного слоя. Увеличение температуры плавления клеточной мембраны ведет к ее гелированию: в первую очередь в состояние геля переходят участки с высокой температурой фазового перехода, чья температура плавления эквивалентна физиологической температуре клетки; последними гелируются наиболее низкоплавкие участки. Гелирование клеточной мембраны сопровождается утерей ее жидкокристаллических свойств и полупропускной способности. Агрегированные с клеточной мембраной белки также теряют свою функциональность в связи с мисфолдингом трансмембранных доменов. В нормальном состоянии клеток ДНК регулярно подвергается различным пагубным воздействиям, ведущим к возникновению различных мутаций, оперативно исправляемых системами репарации. Однако, будучи в дегидратированном состоянии, активность репарационных систем снижается, что способствует стремительному накоплению мутаций ДНК: спонтанных химических модификаций, одно- и двуцепочечных разрывов, перекрестных лигирований, димеризованных тиминов, потерянных азотистых оснований и т.д. [85-86].

Микроорганизмы обладают множеством разнообразных физических, физиологических и молекулярных механизмов адаптации к регулярной дегидратации и стратегий выживания в условиях длительного высушивания. Одним из первых адаптационных механизмов к ксерофильным условиям, обнаруженным у микроорганизмов, является синтез большого количества экзополисахаридов (ЭПС). Микроорганизмы, образующие разнообразные биопленки и бактериальные маты на дне мелких регулярно испаряющихся водоемов, в том числе и соленых, поверхностях скал, или населяющие иные экологически ниши, которым характерны длительные периоды отсутствия воды, продуцируют большие количества ЭПС с целью покрыть ими клетки, снизить интенсивность испарения воды и предотвратить улетучивание водяных паров в атмосферу [64, 87]. Многие микроорганизмы, в частности некоторые цианобактерии (например, *Methanosarcina barkeri* и *Chroococciopsis sp.*), образуют полисахаридные капсулы вокруг индивидуальных клеток или групп

клеток. Полисахаридные оболочки служат не только барьером, предотвращающим отвод воды от клеток микроорганизмов, но также способствуют ее локальной концентрации в области, прилегающей к клеточным мембранам, что позволяет поддерживать их гидратированное состояние и не допустить гелирования билипидного слоя [88-90]. Синтез ЭПС у многих микроорганизмов сопряжен с накоплением осмопротекторов, как правило, полиолов и сахаров. Большие количества трегалозы, накапливаемые многими ксерофильными организмами, способствуют стабилизации внутриклеточных макромолекул [91-92].

Еще одной уникальной особенностью *Haloquadratum walsbyi* является способность экспрессировать галомуцин – белок, родственный муцинам эукариотического происхождения. Это высокомолекулярный гликопротеин (>9000 аминокислотных остатков), который клетки животных продуцируют для защиты тканей и слизистых оболочек от пересыхания. Клетки *Haloquadratum walsbyi*, окруженные сильно гликозилированным и сульфатированным галомуцином, находятся в своего рода белковом капсиде с высокой локальной концентрацией воды, что позволяет им легко переносить высушивание и высокую осмолярность окружающей среды [80-81].

Природным кристаллам галита характерно наличие большого числа инклюзов, несущих жидкость. В 1988 Нортон и Грант предположили, что такие инклюзы могут быть еще одной экологической нишей, заселенной экстремально галофильными микроорганизмами [93]. Последующие микробиологические исследования образцов галита из эвапоритовых отложений разного возраста продемонстрировали, что жидкостные включения действительно заселены различными представителями галоархей, которые способны поддерживать жизнеспособное состояние, будучи инкапсулированными в соляные кристаллы на протяжении десятков и сотен тысяч лет. Дальнейшие исследования данной необычной способности галоархей позволили установить, что заключенные в жидкостные инклюзы микроорганизмы могут длительное время поддерживать

жизненные функции путем комбинации адаптивных стратегий ксерофилов и олиготрофов.

Выпаривание культуральных жидкостей, содержащих предварительно окрашенные по методу LIVE/DEAD клетки галоархеи *Halobacterium salinarum* NRC-1, позволило получить искусственные кристаллы галита и визуализировать галобактериальные клетки в их включениях – ярко-зеленые (зеленый цвет свидетельствует о их жизнеспособности) миниатюрные сферические клетки, чей диаметр не превышает 1 мкм. Сферическая форма и маленькие геометрические размеры клеток галоархей свидетельствуют о стремлении оптимизировать соотношение клеточных поверхности и объема, что, как обсуждалось ранее, является одной из наиболее распространенных стратегий адаптации микроорганизмов к олиготрофным условиям [64, 80]. Аналогичные сферические «карликовые клетки» позднее были обнаружены в образцах галита из Долины Смерти (США, Калифорния), чей возраст датировался 22 – 34 тыс. лет и более [94-95]. Основываясь на полученных данных, исследователи сделали предположение, что изначально палочковидные в нормальных условиях клетки галобактерий в процессе инкапсуляции в кристаллы соли приобретают сферическую форму [64, 80].

Исследования влияния понижения активности воды подтверждают данную гипотезу: понижение активности воды ниже 0,75 приводит к преобразованию палочковидных галобактериальных клеток к миниатюрным сферам, диаметр которых, как правило, не превышает 0,4 мкм.

Клетки многих галоархей имеют внешний слой (S-слой), состоящий из гликопротеинов, соединенных вместе посредством нековалентных связей. Удаление S-слоя при помощи, например, хелатирующих агентов, приводит к трансформации клеток в большие и хрупкие сферопалсты, легко меняющие свою геометрию [64, 80, 96]. Помещение клеток галобактерий в 4 М растворы LiCl или NaCl приводит к их немедленному преобразованию в сферы. Оставаясь в 4 М растворе соли, клетки галоархей способны сохраняться в таком состоянии годами. Преобразование галобактериальных клеток в миниатюрные сферы

сопровождается 50-кратным снижением содержания АТФ, что свидетельствует о процессах замедления метаболизма и перехода клетки в «спящее» состояние. Однако, стоит инокулировать такой «спящей» культурой богатую питательную среду, клетки претерпевают обратное преобразование в палочковидную форму и начинают активное деление [97]. Длительное сохранение жизнеспособности и готовности к размножению было доказано путем высева соляных кристаллов возрастом 280 млн. лет на питательные среды: в результате подобных экспериментов были изолированы разнообразные бактериальные и галоархеальные культуры [94-95, 98].

1.1.5. Излучения

Обитатели гиперсоленых сред часто подвергаются активному солнечному и радиационному облучению. Как уже было сказано, наземные соленые ценозы формируются посредством активного испарения водоемов под действием солнечного излучения, включающего биопатогенное ультрафиолетовое излучение. Верхние, наиболее облученные, слои гиперсоленых водоемов часто характеризуются высокой плотностью клеток фототрофных представителей галофильных микроорганизмов [99]. Более того, согласно проведенным исследованиям в данной области, высокая соленость воды способствует лучшему прониканию длинноволнового УФ-излучения в более глубокие водные слои [100]. Биота глубоководных бескислородных гиперсоленых водоемов, несмотря на свою недостижимость для солнечного ультрафиолетового излучения, подвергается стабильному воздействию радиации, излучаемой геотермальными источниками [101-103].

Различают три типа УФ-излучения, характеризующиеся разной длиной волны: ультрафиолет-А (УФ-А, 315 - 400 нм), ультрафиолет-В (УФ-В, 280 – 315 нм) и ультрафиолет-С (УФ-С, 100 – 280 нм). Через земную атмосферу совместно с солнечным светом проникают лишь УФ-А и УФ-В; коротковолновый УФ-С полностью поглощается в верхних слоях атмосферы кислородом. Все типы ультрафиолетового излучения, а также ионизирующее излучение, прямым или косвенным образом способствуют изменению пространственных структур и

частичному разрушению клеточных макромолекул, таких как ДНК, белки и липиды, что ведет к потере их свойств и, как следствие, функционала [104-106].

Непосредственное воздействие УФ-В (а также УФ-С) и ионизирующего излучения на молекулы ДНК приводит к множественной неправильной гибридизации пар азотистых оснований, что способствует стремительному накоплению мутаций в геномах быстро реплицирующихся организмов, а также их многочисленным химическим изменениям. Разные типы электромагнитного излучения индуцируют широкий спектр гидролитических реакций с участием молекул нуклеиновых кислот, приводящих к образованию одно- или двухцепочечных разрывов, депуризации и депиримидизации, и дезаминированию азотистых оснований. Под воздействием ультрафиолетового излучения также происходят ковалентные перестройки азотистых оснований нуклеотидов, в результате которых образуются различные димеры. Наиболее частым событием (до 75% случаев УФ-индуцируемой димеризации) является образование циклобутановых пиримидиновых димеров (ЦПД, CPDs, cyclobutane pyrimidine dimers). Реже (оставшиеся 25% случаев димеризации) между определенными парами пиримидиновых оснований ($5' \rightarrow 3'$: ТТ, ТС, СТ и СС) образуются (6-4)-аддукты (пиримидин-(6-4)-пиримидон соединения, (6-4)-PPs) [104-105].

Ультрафиолет-А, составляющий порядка 95% солнечного ультрафиолетового излучения, плохо поглощается молекулами ДНК и белков и не оказывает на них прямого воздействия. Однако синтез свободных радикалов и активных форм кислорода, индуцируемый УФ-А и γ -составляющей ионизирующего излучения, способствует масштабному окислительному повреждению всех клеточных компонентов. Окислительное повреждение молекул ДНК происходит по одному из двух возможных механизмов. Повреждения первого типа являются результатом перестройки азотистых оснований (чаще всего гуанина, обладающего наименьшим окислительным потенциалом), получивших лишний электрон от возбужденных ультрафиолетом внутриклеточных фоточувствительных соединений, таких как флавин или

порфирин. Повреждения нуклеиновых кислот второго типа опосредствуются различными активными и радикальными формами кислорода, образующимися также под воздействием ультрафиолета-А и γ -излучения. Синглетный кислород, супероксид-анионы, пероксид водорода и гидроксильные радикалы приводят к неспецифичной модификации азотистых оснований, одно- и двуцепочечным разрывам молекул ДНК [104-105].

Воздействие свободных радикалов и активных форм кислорода на белковые молекулы способствуют как многочисленным окислительным модификациям индивидуальных аминокислот, так и глобальным перестройкам белка, таким как перекрестное ковалентное сшивание боковых цепей аминокислот, находящихся в разных белковых доменах, или фрагментация белковой молекулы в результате частичного разрушения его полипептидной последовательности. Серосодержащие и ароматические аминокислоты являются наиболее чувствительными к воздействию радикальных форм кислорода. Алифатические и кислые аминокислоты в результате контакта с активными формами кислорода формируют различные продукты окисления карбонильной природы, которые остаются ковалентно связанными с молекулой белка [106]. Разрушению активными формами кислорода подвергается также клеточная мембрана, в частности фосфолипидный бислой [107-108].

Анализ генома и ферментативных систем галофильных микроорганизмов демонстрирует наличие множественных и разнообразных репарационных и защитных механизмов, предназначенных для исправления и предотвращения индуцируемых излучением повреждений. Например, галоархеальные системы репарации ДНК включают фотореактивационные и эксцизионные механизмы. Высокая продукция каротиноидов умеренными и экстремальными галофильными микроорганизмами также является механизмом защиты от окислительного стресса. Каротиноиды – биоактивные соединения с ярко выраженными антиоксидантными свойствами. Высокие концентрации каротиноидов в клеточных мембранах, благодаря которым они и, как следствие, среды обитания галофилов окрашиваются в яркие красные, оранжевые или розовые цвета,

необходимы для инактивации активных форм кислорода и иных сильных окислителей, неизбежно образующихся в условиях регулярного облучения большими дозами ультрафиолета. Помимо каротиноидов биомасса галофилов содержит большие количества других антиоксидантов, в том числе органических и неорганических комплексов магния, характерных для радиотолерантных бактерий и архей [3, 109-110].

1.2. Полиэкстремофилы

1.2.1. Психрофилы, термофилы и галофильные психро- и термофилы

Три четверти земной биосферы характеризуются как среда обитания, подверженная регулярному воздействию низких температур. Порядка 70% поверхности Земли, глубоководные области морей и океанов, полярные области, некоторые области земной атмосферы практически никогда или очень редко прогреваются до температур, превышающих 1 – 5 °С. Однако, на Земле существуют разнообразные экологические ниши, для которых характерны экстремально высокие температуры. Примером таких сред обитания являются термальные источники, пустыни, черные курильщики и т.д. Несмотря на экстремальные температуры, зачастую достигающие 80 – 100 °С, данные места обитания заселены процветающими бактериальными и эукариотическими сообществами. Таким образом, становится очевидно, что в природе существует огромное множество организмов, способных переносить или регулярно подвергающихся воздействиям экстремальных температур. Исходя из температурных характеристик сред обитания, подобные организмы могут быть разделены на психрофильные, мезофильные и термофильные [111-113].

Оптимальные температуры для существования и активного размножения мезофильных организмов лежат в диапазоне 20 – 45 °С [111].

К психрофилам относятся организмы, оптимальными для жизнедеятельности и размножения которых являются значения температуры, не превышающие 15 °С. Психрофильные организмы, также можно разделить на стенопсихрофильные и эврипсихрофильные. Стенопсихрофильные организмы являются облигатными психрофилами и способны существовать лишь при

пониженных температурах, в то время как эврипсихрофильные организмы, или мезотолерантные организмы, нормально функционируют при пониженных температурах, но способны без особого ущерба для своей жизнедеятельности существовать при более высоких температурах. Известно множество представителей всех доменов жизни, способных сохранять метаболическую активность при температурах ниже точки замерзания воды [111-113]. Однако длительное воздействие температур ниже 0 °С для большинства многоклеточных животных, как правило, губительно. Тем не менее, некоторые представители микроорганизмов, такие как психрофильные бактерия *Psychromonas ingrahamii* [114], архея *Methanosarcina baltica* [115] и гриб *Humicola marvinii* [116], способны длительное время выживать и функционировать при температурах вплоть до -20 °С.

Активная жизнедеятельность в условиях пониженных температур требует многочисленных и разнообразных адаптаций молекулярных механизмов клетки. Понижение температуры окружающей среды для неприспособленных микроорганизмов губительно ввиду изменения термодинамических условий клетки, что приводит к нарушению функций большинства клеточных компонентов и процессов. Снижение температуры окружающей среды приводит к значительному замедлению метаболизма клетки, вызванному снижением скоростей биохимических реакций и диффузионных процессов. Температура является мерой кинетической энергии атомов и молекул и, как следствие, ее низкие значения свидетельствуют о низкой подвижности и высокой стабильности молекул. Все организмы стремятся обеспечить большую стабильность компонентов клеток в их физиологических условиях, однако увеличение стабильности вследствие понижения температуры обладает в основном негативными эффектами для клетки. Например, уменьшение подвижности фосфолипидов при понижении температуры ведет к фазовому переходу билипидного слоя в гелеобразное состояние. Утрата клеточной мембраной жидкокристаллических свойств негативно сказывается на ее функции полупроницаемого барьера, а также ведет к снижению активности мембранных

белков. Увеличение стабильности молекул белков означает снижение их конформационной мобильности, что в свою очередь влечет частые случаи неправильного фолдинга, снижение их ферментационной активности и замедление клеточного метаболизма в целом. Повышенная стабильность двойной спирали ДНК, а также различных вторичных структур ДНК и РНК, принимающих непосредственное участие в процессах транскрипции, трансляции и регуляции экспрессии генов, негативно сказывается на протекании данных процессов [117-119].

Основной адаптационной стратегией психрофильных организмов является увеличение энтропии макромолекул и, в результате этого, обеспечение большей их подвижности в условиях низких температур. Так, повышение текучести билипидного слоя клеточной мембраны психрофильными микроорганизмами достигается путем увеличения содержания ненасыщенных фосфолипидов, а также уменьшения длины и ветвления алифатических цепей остатков жирных кислот. Надлежащая конформационная мобильность холодоустойчивых белков обеспечивается уменьшением числа водородных и ионных связей, гидрофильных-гидрофобных взаимодействий в молекулах, и увеличением числа обращенных к сольвенту неполярных аминокислотных радикалов, уменьшением числа остатков пролина и агренина, а также кластеризацией глицина. Правильный фолдинг белков психрофилов контролируется многочисленными белками холодового шока и шаперонами. Белки холодового шока, а также специфичные ДНК- и РНК-зависимые хеликазы, продуцируемые психрофильными микроорганизмами, способствуют стабильному протеканию процессов транскрипции и трансляции в условиях пониженной температуры, обеспечивая стабильное расплетение двойной спирали ДНК, сверхспирализованной при низких температурах, и устраняя нежелательные вторичные структуры молекул мРНК. Конформационная гибкость функциональных молекул РНК, таких как тРНК и рРНК, чья вторичная структура играет решающую роль в процессах трансляции, достигается путем снижения GC-состава и увеличения содержания дигидроуридина в их молекулах [117-119].

Особый интерес представляет группа психрофильных микроорганизмов, называемых криофилами. Это микроорганизмы населяющие среды, характеризующиеся субнулевыми температурами. Вода при субнулевых температурах может оставаться в жидком состоянии только при условии пониженной точки фазового перехода, что обычно наблюдается при высоких концентрациях веществ в ней растворенных. Так, многие арктические подледные озера и ручьи, а также жидкостные инклюзы во льдах сохраняют свое фазовое состояние при субнулевых температурах окружающей среды, благодаря своей высокой солености, и, как условия обитания, характеризуются не только экстремально низкими температурами, высоким давлением, частичным замерзанием, олиготрофными условиями роста, но и высокой осмолярностью среды [12, 120-123]. Стоит отметить, что большинство культивируемых психрофильных микроорганизмов, изолированных из различных мест обитания, в том числе не характеризующихся высокой соленостью, являются галотолерантными и обладают набором адаптаций к высокой осмолярности среды, используемых ими для выживания как в условиях низкой активности, так и при экстремально низких температурах. Так, штамм *Planococcus halocryophilus* OR1, изолированный из образцов, отобранных в Канадской Арктике, способен расти при рекордно низких температурах в -15 °С на минеральных средах с содержанием NaCl достигающем 190 г/л [124-125].

Генетический анализ различных психрофильных микроорганизмов позволил выявить у многих из них наличие множественных адаптаций, отвечающих за синтез экзополисахаридов (ЭПС). ЭПС, продуцируемые галофильными организмами с целью создать прилегающую к клеточной стенке область с большей, относительно окружающей среды, активностью воды, также синтезируются психрофилами для предотвращения кристаллизации воды в околосмембранных областях [126]. Также у психрофилов присутствуют разнообразные механизмы активного транспорта осмопротекторов из окружающей среды. Различные осмопротекторы, такие как глицин бетаин, глицерин, холины, трегалоза и др., помимо функции установления

изоосмотического баланса с окружающей средой, проявляют криопротекторные свойства и в молярных концентрациях значительно снижают температуру замерзания цитоплазмы клеток [127].

Холодные соленые ручьи встречаются в зонах как антарктического, так и арктического климатов. Примером такого антарктического геоценоза являются Кровавые водопады, текущие в Сухих долинах Мак-Мердо в Восточной Антарктиде. Данные ручьи берут свое начало в древнем талассовом соленом озере, находящимся под ледником Тейлора, характеризующимся не только высокой соленостью, но и высоким содержанием сульфатов и оксидов железа, благодаря которым воды вытекающих из него ручьев приобретают красный цвет при контакте с кислородом воздуха [120-121]. Аналогичной арктической экосистемой являются холодные ручьи архипелага Свальбард (Норвегия), а также ручьи острова Аксель-Хейберг (Канадский Арктический архипелаг). Примером антарктического соленого озера является талассовое меромиктическое озеро Ас с соленостью 4,3% [111].

Прямой противоположностью психрофилам являются термофильные организмы, способные жить и размножаться при температурах, превышающих 60 °С. Среди термофилов можно выделить особую группу гипертермофильных организмов, характеризующихся экстремально высокими оптимальными температурами существования (более 80 °С). Некоторые представители гипертермофильных организмов, в частности *Pyrolobus fumarii*, способны жить и делиться при температурах, достигающих 113 °С. В отличие от психрофильных организмов, представители которых отличаются большим разнообразием форм жизни, типичными представителями термофилов являются прокариоты, как правило, бактерии и археи [111].

Высокие температуры оказывают негативное воздействие на большинство компонентов клетки. Экстремальные температуры приводят к снижению стабильности их пространственных структур, неправильному фолдингу вновь синтезируемых белков, обнажению гидрофобных белковых ядер и, как следствие, агрегации белковых молекул [128]. Нагревание нуклеиновых кислот способствует

разрушению их пространственных структур и химической деградации мономеров. Двойная спираль ДНК, благодаря своим физико-химическим свойствам и дополнительной стабилизации, обеспечиваемой разнообразными нуклеопротеиновыми комплексами, является крайне инертной структурой, слабо подверженной воздействию температуры и иных экстремальных факторов. Однако повышение температуры способствует денатурации нуклеопротеидов и самой двойной спирали ДНК, приводящих к длительному экспонированию одноцепочечных фрагментов молекулы ДНК, которые в свою очередь легко подвергаются депуринизации и депиримидизации, дезаминированию и иным химическим преобразованиям азотистых оснований, образованию ников с последующим спонтанным 3'→5' гидролизом нуклеотидной цепи. Молекулы РНК менее восприимчивы к гидролизу N-гликозидных связей, но лучше подвергаются 3'→5' гидролизу, а также, благодаря наличию гидроксильной группы в 2'-положении глюкозы, легко подвергаются интрамолекулярному гидролизу, скорость которого увеличивается пропорционально увеличению температуры окружающей среды. Также наличие у функциональных молекул РНК (например, тРНК) особых нуклеотидов, типа термолабильного дигидроуридина, способствует их дисфункции при значительном нагревании [129]. Повышенные температуры способствуют увеличению подвижности и, в результате этого, повышенной текучести билипидного слоя клеточной мембраны, что приводит к большей её проницаемости для различных ионов, в том числе протонов. Неконтролируемый двусторонний транспорт ионов через клеточную мембрану негативно сказывается на изоосмотическом балансе клеточной цитоплазмы и окружающей среды, а также влияет на все клеточные процессы, сопряженные с образованием трансмембранного электрохимического потенциала и зависящие от него [130].

Многие термостабильные белки отличаются от их мезофильных аналогов повышенным содержанием аминокислот с гидрофобными боковыми радикалами, а также увеличенным числом белковых субъединиц. Подобные изменения состава и строения направлены на увеличение стабильности каждой отдельной

субъединицы и на более плотную упаковку гидрофобного ядра субъединиц, препятствующую контакту гидрофобных боковых цепей с сольвентом. Увеличение числа дисульфидных связей и ион-ионных взаимодействий также способствует большей стабильности третичных и четвертичных белковых структур, снижая вероятность образования альтернативных структур в условиях повышенных температур. Наличие на поверхности белковой молекулы большого числа аминокислотных остатков, несущих заряженные радикалы, обеспечивает лучшую стабилизацию и предотвращают агрегацию белковых молекул посредством электростатических взаимодействий [128]. Также, термофильные микроорганизмы обладают большим набором разнообразных белков теплового шока, в большинстве случаев действующих как шапероны и обеспечивающих правильный фолдинг и стабилизацию синтезируемых, а также рефолдинг денатурировавших белков [131].

В ходе эволюции термофильными организмами были выработаны разнообразные стратегии термоадаптации нуклеиновых кислот. Так, обогащение молекул функциональных РНК гуанинами и цитозинами способствует лучшей стабилизации и поддержанию их пространственных структур. Частое использование GC-богатых кодонов в мРНК увеличивает точность процесса трансляции. Термофильные микроорганизмы имеют свойство накапливать в цитоплазме клеток повышенные концентрации (до 1/5 таковой в клетках экстремально галофильных архей) ионов калия, стабилизирующих молекулы нуклеиновых кислот и предотвращающих их гидролиз. Аналогичными стабилизирующим и защитными свойствами, выражающимися в предотвращении гидролиза N-гликозидных связей нуклеотидов одноцепочечных нуклеиновых кислот, обладают длинноцепочечные и разветвленные полиамиды, продуцируемые исключительно термофильными и экстремально термофильными микроорганизмами. Также, генетический анализ множества термофильных организмов позволил выявить большое разнообразие механизмов, обеспечивающих своевременное обнаружение и репарацию повреждений

нуклеотидных молекул, свойственных представителям данного класса экстремофилов [129, 132].

Клеточные мембраны термофильных организмов способны сохранять избирательную проницаемость и жидкокристаллические свойства и обеспечивать выполнение своих биологических функций в широком спектре температур. Например, мембраны термофильных архей способны поддерживать свои свойства без значительного изменения липидного состава в диапазоне температур от -10 до 100 °С. Эта универсальность обеспечивается наличием фосфолипидов с цепями изопреноидной природы. Фосфолипиды подобного строения сохраняют функциональность во всем указанном температурном диапазоне и не требуют регуляторных механизмов, варьирующих липидный состав мембран в зависимости от температуры окружающей среды. Такие регуляторные механизмы используются термофильными бактериями. Ввиду того, что в состав бактериальных мембран входят в основном фосфолипиды, чьи алифатические хвосты представлены радикалами различных жирных кислот, свойства мембран бактерий-термофилов сильно зависят от температуры и регулируются путем биосинтеза фосфолипидов с разными алифатическими радикалами и, как следствие, разными структурой и физико-химическими свойствами [130, 133-134].

Многие гиперсоленые среды обитания классифицируются как среды с высокими и экстремальными температурными воздействиями. Большинство наземных гиперсоленых ценозов, к которым относятся Великое Соленое озеро, озеро Моно, озера Вади ан-Натрун и др., образуются в результате высокой геотермальной активности. Некоторые гиперсоленые глубоководные бассейны сочетают в себе свойства сред с экстремальными осмолярностью и температурами. Ярким примером такой глубоководной гиперсоленой экосистемы является геотермально активная впадина Красного моря Атлантис II. Такие экстремальные среды обитания населяют полиэкстремофильные микроорганизмы, классифицируемые как галотермофилы [135].

1.2.2. Алкалифилы, ацидофилы и галоалкалифилы

Организмы, населяющие различные среды с экстремальными значениями рН, классифицируются как ацидофильные, либо как алкалофильные. Для ацидофильных организмов оптимальными являются кислые среды, характеризующиеся показателями рН, не превышающими значения 3. Алкалофильные организмы, напротив, предпочитают щелочные среды с рН не ниже 9. Помимо ацидофильных и алкалофильных принято выделять нейтрофильные организмы, для которых оптимальным является нейтральный рН. Однако большинство нейтрофилов обладают адаптивными стратегиями, аналогичными таковым у алкало- и ацидофилов, что позволяет им проявлять ацидотолерантные и/или алкалолитолерантные свойства и существовать в слабощелочных или слабокислых средах. Среда обитания ацидофильных и алкалофильных организмов распространены по всему миру. Кислые термальные источники, fumaroles и sulfataras широко распространены во множестве регионов Земли, характеризующихся высокой вулканической и геотермальной активностями, а также различные антропогенные среды, такие как кислые стоки горнодобывающих шахт, отвалы отработанных горных пород и шлаков, являются типичным местом обитания ацидофильных организмов. Различные щелочные гидротермальные источники, содовые озера, щелочные промышленные стоки заселены алкалофильными организмами. Стоит отметить, что помимо экстремальных значений рН, типичные среды обитания ацидо- и алкалофилов отличаются наличием иных экстремальных воздействий. Низкий рН сред ацидофильных микроорганизмов часто комбинируется с температурами, варьирующимися от 25 до 90 °С, высокими давлениями, наличием больших количеств тяжелых металлов, низкой соленостью, аэробными или анаэробными условиями. Характерные для алкалофилов среды также зачастую являются гиперсолеными, подвержены влиянию высоких температур и интенсивного солнечного излучения [111].

Содовые (богатые карбонатом натрия) и щелочные соленые озера являются широко распространенным видом гиперсоленых экосистем и характеризуются не только экстремальной соленостью вод, но и экстремально высокими (щелочными)

значениями pH. Организмы, населяющие подобные экологические ниши, классифицируются как галоалкалифилы. Типичные галоалкалифилы растут в средах с минимальной концентрацией ионов Na^+ 0,5 М и щелочным $\text{pH} > 8,5$ – химическими параметрами, характерными для щелочных озер и почв. Живущие в таких условиях экстремофилы (преимущественно это бактерии и археи), должны обладать уникальными адаптациями, позволяющими их клеткам не только достигать осмотического баланса с окружающей средой, жизненно необходимого для галофилов, но также регулировать pH цитоплазмы и реализовывать ассоциированные с мембраной энергетические процессы в условиях низких концентраций протонов в окружающей среде [136].

Для поддержания энергозависимых клеточных процессов микроорганизмы генерируют трансмембранный электрохимический градиент, который является движущей силой процессов биосинтеза АТФ, трансмембранного транспорта веществ и клеточного движения. Основной компонентой трансмембранного электрохимического градиента, подавляющего большинство микроорганизмов, является протонный градиент. Протонный градиент создается клетками микроорганизмов посредством транспорта протонов из клетки во внешнюю среду, тем самым устанавливая разницу pH между щелочной цитоплазмой и кислой окружающей средой. Создание требуемого трансмембранного протонного градиента в значительной степени усложняется сильнощелочной окружающей средой. Многие алкалифилы имеют отрицательно заряженную поверхность клеток, что опосредуется анионными компонентами клеточной стенки или отрицательно заряженными ионными группами мембранных липидов [136-137]. Отрицательный поверхностный заряд клеток посредством электростатических взаимодействий способствует созданию микроокружения клетки с высокими концентрациями катионов (H^+ , Na^+ , K^+ и др.) и низкими концентрациями анионов (NO_3^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} и др.), что позволяет генерировать и поддерживать трансмембранный протонный градиент. Также отрицательно заряженная поверхность играет важную роль в «привлечении» к клеткам алкалифилов важных для ряда метаболических процессов ионов металлов, в частности Mg^{2+} ,

Ca^{2+} и др., которые ввиду плохой растворимости при высоких рН являются дефицитными в щелочных средах. Галоалкалифильные археи также обладают уникальными мембранными белками, осуществляющими связывание двухвалентных ионов металлов из окружающей среды [136, 139-140].

Второй компонентой трансмембранного электрохимического потенциала клеток большинства микроорганизмов является натриевый градиент, который наравне с протонным градиентом может быть использован в качестве движущей силы для осуществления энергозависимых процессов клетки, таких как вторичный транспорт ионов и вращение жгутиков [137-138]. Как и у галофилов, у галоалкалифилов процессы создания трансмембранных потенциалов и установления изоосмотического равновесия с окружающей средой тесно связаны и осуществляются при помощи разнообразных ион-транспортных систем клетки. У алкалифилов трансмембранные переносчики ионов также принимают непосредственное участие в установлении и поддержании требуемого рН цитоплазмы, который у алкалифилов ниже рН окружающей среды [136]. Для установления и поддержания определенного рН цитоплазмы алкалифилы используют белки Nha-семейства, которые являются Na^+/H^+ -антипортерами и опосредуют транспорт протонов в клетку и ионов Na^+ из клетки, тем самым снижая их концентрацию в цитоплазме и генерируя трансмембранный натриевый градиент [141]. Уникальной особенностью алкалифильных бактерий является то, что транспорт ионов Na^+ из их клеток для создания натриевого градиента может осуществляться рядом компонентов их дыхательной цепи. Некоторые галоалкалитолерантные гетеротрофные γ -протеобактерии имеют НАДН-СoQ-редуктазу, которая функционирует как натриевая помпа [142]. У умеренно галофильной экстремально алкалифильной бактерии *Thioalkalivibrio versutus* была обнаружена Na^+ -зависимая цитохром-с-оксидаза, осуществляющая восстановление молекулы кислорода и параллельный транспорт ионов натрия через мембрану, тем самым внося вклад в создание трансмембранного натриевого градиента [143]. Культивирование алкалифильных бактерий при высоких рН демонстрировало увеличение содержания цитохром-с-оксидазы, что

свидетельствует о важности данного фермента для создания трансмембранного электрохимического потенциала в гиперщелочных условиях [144]. Бактерии, обладающие натрий-зависимыми компонентами дыхательной цепи, также содержат традиционные протон-зависимые НАДН-СoQ-редуктазу и цитохром-с-оксидазу, которые, по всей видимости, функционируют при нейтральных или слабощелочных рН [145-146].

Галоалкалифильные археи и бактерии используют “high-salt-in” и “low-salt-in” стратегии установления и поддержания осмотического равновесия. Несмотря на то, что подавляющее большинство галоархей реализуют “high-salt-in” стратегию и накапливают большие количества ионов K^+ в клетках, алкалифильные галоархеи родов *Natronomonas*, *Natronococcus* и *Natrialba* также могут аккумулировать 2-сульфотрегалозу в качестве осмопротектора [139, 147]. Также, несмотря на то что большинству галофильных бактерий характерна стратегия “low-salt-in”, галоалкалитермофильные бактерии рода *Natranaerobiales* реализуют “high-salt-in” стратегию. Другие галоалкалифильные бактерии для установления осмотического баланса накапливают различные осмолиты, в частности глицин бетаин, эктоин, глутаминовую кислоту, сахарозу и др. [147]. Эктоин и глицин бетаин являются двумя основными осмопротекторами галоалкалифилов. Слабо, умеренно галофильные и галотолерантные бактерии-алкалифилы родов *Methylomicrobium*, *Methylophaga* [148], *Thioalkalimicrobium* [149] и *Thioalkalibacter* [150] используют эктоин в качестве основного осмопротектора, в то время как экстремально галофильные и галотолерантные алкалифилы родов *Halorhodospira* [151], *Thioalkalivibrio* [149] и *Desulfonatronospira* [152] накапливают глицин бетаин.

1.2.3. Пьезофилы

Давление в одну стандартную атмосферу (0,1 МПа) характерно лишь 1% всей известной биосферы. Подавляющее число организмов, населяющих Землю, подвержены воздействию высоких давлений, в ряде случаев тысячекратно превышающих атмосферное. Организмы, населяющие среды обитания, характеризующиеся высокими давлениями, называются пьезофильными и

подразделяются на облигатных и факультативных пьезофилов. Облигатные пьезофилы проявляют метаболическую активность и способны размножаться только в условиях воздействия высоких давлений, в то время как факультативные пьезофилы менее требовательны к высоким давлениям и могут существовать при стандартном атмосферном давлении. Большинство пьезофильных организмов были обнаружены в глубоководных морских регионах. Гидростатическое давление толщи воды в таких областях составляет в среднем 38 МПа и может достигать рекордных 110 МПа (Марианская впадина). Глубоководные морские бассейны характеризуются не только высокими давлениями, но и отсутствием кислорода, а также, в зависимости от типа глубоководного геоеценоза, высокими или низкими температурами, экстремальными соленостями (подводные гиперсоленые озера), высокими концентрациями тяжелых металлов и, в ряде случаев, наличием радиоактивного излучения (глубоководные термальные источники) [111].

Экстремально высокое давление оказывает негативное влияние на клеточные структуры и макромолекулы. Клеточные мембраны, пространственные структуры молекул белков и нуклеиновых кислот, а также всевозможные гетеромолекулярные комплексы клеток формируются и стабилизируются посредством слабых взаимодействий, которые легко разрушаются в результате изменений какого-либо из физико-химических параметров окружающей среды, в том числе давления. Другой чувствительной к изменению давления системой является любая биохимическая реакция, осуществляемая в клетке. Давление, как один из основных физико-химических параметров реакционной системы, оказывает непосредственное влияние на свойства компонентов и характеристики химической реакции. Изменение давления способствует изменению химического равновесия, скорости химической реакции, растворимости, вязкости и диэлектрических свойств веществ, свойств воды, диффузионных свойств сред, условий фазового перехода, а также конформационных состояний сложных молекул. Также, ввиду обратной зависимости объема системы от величины давления, некоторые реакции, протекающие при атмосферном давлении и

сопровождающиеся увеличением объема реакционной смеси, могут стать термодинамически невыгодными при экстремально высоких давлениях [153].

Клетки пьезофилов обладают рядом адаптаций к воздействию экстремально высокого давления. Цитоплазматические мембраны пьезофилов сохраняют текучесть вне зависимости от температуры окружающей среды и величины гидравлического давления. Качественный жирнокислотный состав мембран пьезофильных микроорганизмов аналогичен составу мембран бактерий, обитающих в средах с нормальным давлением. Липиды цитоплазматических мембран могут иметь гидрофобные радикалы, образованные остатками C_{14} - C_{19} насыщенных и мононенасыщенных, метилразветвленных, гидроксильированных и циклопропановых жирных кислот. Основной особенностью мембран пьезофилов является высокое содержание ненасыщенных жирных кислот, составляющее порядка 70% жирнокислотного состава липидной фракции. Содержание радикалов ненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах пьезофилов может увеличиваться с увеличением давления окружающей среды [154].

Белки пьезофильных микроорганизмов отличаются компактным гидрофобным ядром и высоким содержанием аминокислот с маленькими боковыми радикалами, образующими водородные связи. Также большинство белков пьезофилов являются мультимерными. Небольшие гидрофобные аминокислоты способствуют большей компактизации гидрофобных ядер белков, что обеспечивает большую стабильность белковой молекулы в условиях высокого давления. Эксперименты, в процессе которых осуществлялся мутагенез белков пьезофильных микроорганизмов, свидетельствуют о том, что любое изменение аминокислотной последовательности белков этих микроорганизмов приводит к изменению конформации белковой молекулы или разрушению гидрофобного ее ядра, что негативно сказывается на стабильности и ферментативной активности белка. Мультимеризация белковых молекул способствует компактизации отдельных мономеров. Большая компактность и более плотная упаковка белковой молекулы препятствует случайному проникновению молекул воды под воздействием высокого давления внутрь белка, что может его дестабилизировать.

Мультимеризация также способствует стабилизации водородных связей, образующихся между белковыми мономерами. Ионные связи в таких условиях значительно менее стабильны, что нивелируется повышенной стабильностью водородных связей, которые менее подвержены воздействию высокого давления [128].

1.2.4. Галофильные аэробы и анаэробы

Химический состав Земной атмосферы претерпевал регулярные и значительные изменения в процессе эволюции Земной биоты. Считается, что ранняя атмосфера Земли состояла в основном из углекислого газа и азота. Появление литотрофных метаногенов, окисляющих минеральные сульфиды с сопутствующим восстановлением углекислого газа до метана, способствовало обогащению атмосферы метаном. Появление в результате эволюции кислородного фотосинтеза и постепенное его распространение среди представителей древней биоты способствовало насыщению Земной атмосферы, что в результате привело к Великому кислородному событию, которое произошло около 2,45 млрд лет назад. Результатом Великого кислородного события стала смена восстановительного потенциала атмосферы на окислительный. Обогащение Земной атмосферы кислородом также способствовало смене некоторых геохимических характеристик поверхностных, напрямую сообщающихся с атмосферой геосфер, в частности, окисление сульфидной серы до сульфатной. Однако ценозы, изолированные от атмосферы водной толщей или горной породой, не претерпели значительных химических изменений и способствовали сохранению и дальнейшей эволюции облигатно анаэробной жизни [111, 155-157].

Необходимость адаптации организмов, населяющих Земную поверхность, к новой богатой кислородом атмосфере привела к появлению механизма кислородного дыхания, в котором конечным акцептором электронов являлся молекулярный кислород. Кислородное дыхание является значительно более энергоэффективным процессом в сравнении с анаэробными процессами. Однако, высокий окислительный потенциал молекулярного кислорода, а также еще более высокая окислительная способность его активных форм, образующихся в

результате фотохимических реакций в условиях облучения УФ солнечного света, способствовало выработке и развитию многочисленных небелковых и белковых систем защиты клетки от оксидативного стресса. Эволюция антиоксидантных систем способствовала формированию нескольких групп, в соответствии с их отношением к молекулярному кислороду: облигатные аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы, аэротолерантные анаэробы, умеренные анаэробы и строгие анаэробы [111].

Изменение химического состава атмосферы Земли не привело к полному исчезновению экологических ниш анаэробных организмов, тем не менее в значительной степени повлияло на их некоторые геохимические характеристики. Благодаря обогащению Земной атмосферы кислородом, типичными для многих сред обитания стали высокие концентрации ионов неметаллов в высшей степени окисления – сульфатов (SO_4^{2-}) и нитратов (NO_3^-), что послужило стимулом для развития анаэробами процессов бескислородного дыхания, в которых S^{+6} и N^{+5} использовались как конечные акцепторы электронов. Сульфат- и нитратредукция являются более энергоэффективными процессами по сравнению с субстратным фосфорилированием, однако менее эффективны в сравнении с кислородным дыханием [111, 158-160].

Биота гиперсоленых экосистем часто включает представителей всех возможных групп анаэробных и аэробных организмов. Молекулярный кислород плохо растворим в средах с высоким содержанием минеральных солей. Интенсивное прогревание наземных гиперсоленых водоемов солнечной радиацией способствует поддержанию высоких температур воды, что также в значительной степени снижает растворимость кислорода [3]. Крупные гиперсоленые водоемы часто являются меромиктическими и характеризуются наличием одного или нескольких хемоклинов, что также препятствует проникновению кислорода в глубокие водные слои. Таким образом, в подавляющем большинстве гиперсоленых наземных водоемов могут быть обнаружены зоны, характеризующиеся аэробными, микроаэробными и анаэробными условиями [19, 21, 24, 27]. Также известны анаэробные

гиперсоленые экосистемы, примерами которых являются глубоководные гиперсоленые бескислородные бассейны Красного и Средиземного морей и Мексиканского залива [33-34].

1.3. Таксономия

1.3.1. Галофильные археи

Галофильные представители домена архей принадлежат двум семействам *Methanosarcinaceae*, *Methanospirillaceae* и классу *Halobacteria*, принадлежащих типу *Euryarchaeota* [161].

Семейство *Methanosarcinaceae* включает 8 родов архей-метаногенов, галофильные микроорганизмы обнаружены среди представителей трех родов: *Methanohalophilus*, *Methanosalsum* и *Methanohalobium* [161].

Клетки архей рода *Methanohalophilus* характеризуются как иррегулярные кокки ~1 мкм в диаметре, одиночные или объединенные в небольшие группы, неподвижные, грамотрицательные. При росте на агаризованных средах формируют круглые с внутренними гранями колонии от кремового до бледно-желтого цветов. Растут на C_1 -субстратах (метиламины и метанол) с образованием метана и углекислого газа. Археи рода *Methanohalophilus* являются строгими анаэробами и облигатными умеренными галофилами. Оптимальные условия роста: концентрация NaCl в ростовой среде 1 – 2,5 М, нейтральный pH, температуры 35 – 40°C. Представители данного вида обитают в бескислородных донных осадках гиперсоленых водоемов [162]. На данный момент род *Methanohalophilus* включает 4 вида (июнь 2020 года) [163].

Клетки архей рода *Methanosalsum* одиночные или объединенные в небольшие группы, имеют угловатую кокковидную форму, неподвижные или подвижные, оснащенные одним или двумя жгутиками. Грамотрицательные. Являются облигатными метилотрофными метаногенами и утилизируют C_1 -субстраты. Являются умеренно натронофильными (для оптимального роста требуют карбонат натрия) и умеренно алкалофильными облигатными анаэробами. Галотолерантны в широком диапазоне Na^+ (0,2 – 3,5 М), алкалолитолерантны (pH 8 – 10,2). Оптимальные условия роста: содержание ионов Na^+ в ростовой среде 0,4 –

1,5 М, рН 8,7 – 9,5, температура 33 - 45°C. Представители данного вида могут быть обнаружены в щелочных гиперсоленых озерах аталассового типа [164]. На данный момент род *Methanosalsum* включает 2 вида (июнь 2020 года) [165].

Археи рода *Methanohalobium* имеют неподвижные клетки плоской полигональной или иррегулярной сферической формы, одиночные или агрегированные в маленькие группы. Грамвариабельные. Являются облигатно метилотрофными метаногенами, утилизируют C₁-субстраты, предпочтительно метиламины. Являются экстремально галофильными (2,6 – 5,1 М NaCl) умеренно термофильными (35 - 58°C) строгими анаэробами. Оптимальные условия роста: концентрация NaCl в ростовой среде 4,3 М, рН 7 – 7,5, температура 40 - 50°C [166]. На данный момент род *Methanohalobium* включает 1 вид (июнь 2020 года), который обычно может быть обнаружен в воде или донных осадках гиперсоленых, хорошо прогреваемых лагун [166-167].

Семейство *Methanospirillaceae* включает единственный род архей-метаногенов *Methanospirillum* [168]. Эти археи имеют клетки спиральной формы длиной от 7,4 мкм и более. Большинство видов являются подвижными, благодаря наличию жгутиков, но также встречаются виды с неподвижными клетками. Клетки имеют S-слой, а также оболочку, образованную филаментами, длиной до нескольких сотен микрометров. Данные микроорганизмы являются водород-утилизирующими археями и растут на газовых смесях состава H₂/CO₂, а также могут утилизировать формиаты и вторичные спирты. Являются строгими анаэробами. Оптимально растут при мезофильных температурах и нейтральном рН, однако некоторые представители являются психрофилами. Представители данного рода были изолированы из влажной почвы, ила и донных осадков пресных и соленых водоемов (морской шельф) [169]. На сегодняшний день род *Methanospirillum* включает 4 вида (июнь 2020 года) [170].

Археальный класс *Halobacteria* включает три порядка и шесть семейств: порядок *Halobacteriales*, включающий семейства *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* и *Halococcaceae*; порядок *Haloferacales*, включающий семейства *Haloferacaceae* и *Halorubraceae*; порядок *Natrialbales*, включающий единственное семейство

Natrialbaceae. Изначально данный класс включал единственное семейство *Halobacteriaceae*, однако в 2015 году на основе филогенетического анализа 129 полногеномных последовательностей галоархей был разделен на 3 порядка и 6 семейств [171].

Представители семейства *Halobacteriaceae* (порядок *Halobacteriales*) являются нейтрофильными или алкалифильными (pH 4 – 10,5) экстремальными галофилами (NaCl 0,8 – 5,1 М). Эти галоархеи являются типичными обитателями соленых озер, солнечных солеварен, также могут быть обнаружены в пищевых продуктах, например, пищевой соли, ферментированной рыбе и т. д. Представители данного семейства формируют колонии с характерной красной или розовой окраской, однако колонии отдельных видов могут иметь светло-красную, оранжевую или кремовую окраску или быть не пигментированными. Клетки подавляющего большинства представителей данного семейства имеют форму палочек или кокков, или плеоморфны. Оптимальная концентрация NaCl в ростовой среде этих галоархей составляет 2,5 М. Все представители данного семейства являются аэробными хемоорганотрофами, однако некоторые из них способны расти анаэробно, посредством нитратредукции, ферментации L-аргинина и/или фотогетеротрофно, благодаря наличию бактериородопсина. Семейство *Halobacteriaceae* включает 11 родов: *Halobacterium*, *Haladaptatus*, *Halalkalicoccus*, *Halarchaeum*, *Haloarchaeobius*, *Halomarina*, *Halorubellus*, *Halorussus*, *Halovenus*, *Natronoarchaeum* и *Salarchaeum* [172].

Представители семейства *Haloarculaceae* (порядок *Halobacteriales*) являются нейтрофильными или алкалифильными экстремальными галофилами (NaCl 0,9 - 5,1 М). Галоархеи этого семейства могут быть обнаружены в донных осадках гиперсоленых озер, солнечных солеварнях, содовых озерах. Подавляющее большинство архей этого семейства формируют колонии, имеющие красную или розовую окраску, но также встречаются представители с оранжевыми, кремовыми или бесцветными колониями. Клетки микроорганизмов этой группы плеоморфны, преимущественно палочковидной или кокковидной формы, но также могут встречаться виды с клетками овальной, треугольной или

другой нетривиальной формы. Оптимальная концентрация NaCl в ростовой среде этих галоархей составляет 2,5 М. Предпочитают нейтральный pH среды, однако среди представителей рода *Natronomonas* имеются галоалкалифилы. В своем большинстве являются аэробными хемогетеротрофами, однако среди представителей рода *Halorhabdus* имеются анаэробы. Семейство *Haloarculaceae* включает 8 родов: *Haloarcularia*, *Halapricum*, *Halomicroarcularia*, *Halomicrobium*, *Halorhabdus*, *Halorientalis*, *Halosimplex* и *Natronomonas* [173].

Семейство *Halococcaceae* (порядок *Halobacteriales*) включает единственный род – *Halococcus*. Клетки архей рода *Halococcus* являются кокками, агрегированными попарно, по 4 клетки, в сарцина-подобные кубические или иррегулярные кластеры. Колонии имеют красно-розовую окраску. Все представители данного семейства являются нейтрофильными экстремальными галофилами, демонстрируют оптимальный при нейтральном pH и концентрациях NaCl 3 – 4,5 М. Некоторые микроорганизмы данного семейства являются ацидо- и алкалитолерантными и демонстрируют рост в широком диапазоне pH (4 – 10). Археи данного семейства могут быть обнаружены в гиперсоленых водоемах, морской воде, а также изолированы из поваренной и каменной соли, ферментированной рыбы. Все представители данной группы микроорганизмов являются строго аэробными хемогетеротрофами [174].

Археи семейства *Haloferacaceae* (порядок *Haloferacales*) являются нейтрофильными экстремально галофильными микроорганизмами. Клетки большинства архей данного семейства характеризуются как плеоморфные, однако клетки отдельных представителей могут иметь кокковидную, палочковидную, плоскую дискообразную, плоскую куполовидную, плоскую четырехугольную формы. Большинству видов характерна красно-розовая окраска колоний, однако некоторые представители формируют колонии оранжевого, белого или серого цвета. Оптимальная рост наблюдается при нейтральных pH в средах с содержанием NaCl 1,7 – 5,1 М. Археи семейства *Haloferacaceae* являются аэробными хемоорганострофами, однако некоторые представители родов *Haloferax*, *Halobellus*, *Halogeometricum* и *Haloplanus* способны расти анаэробно

посредством нитратредукции. Семейство *Haloferacaceae* включает 7 родов: *Haloferax*, *Halobellus*, *Halogeometricum*, *Halogranum*, *Halopelagius*, *Haloplanus* и *Haloquadratum* [175].

Семейство *Halorubraceae* (порядок *Haloferacales*) включает нейтрофильных и алкалифильных экстремально галофильных архей. Микроорганизмы данного семейства могут быть обнаружены в гиперсоленых озерах и солнечных солеварнях. Клетки большинства микроорганизмов данного семейства имеют палочковидную форму, однако встречаются также представители с плеоморфными клетками или клетками нетривиальной формы типа плоских палочек и дисков. Концентрации NaCl, оптимальные для роста этих галоархей, варьируются в диапазоне от 1 до 5,2 М. Большинство микроорганизмов этой группы являются нейтрофилами, толерантными к широкому диапазону pH (5 – 9,5), однако среди представителей рода *Halorubrum* имеются галоалкалифилы, демонстрирующие оптимальные рост при pH 9 – 10. Археи семейства *Halorubraceae* являются аэробными хемоорганотрофами, однако некоторые представители родов *Halorubrum* и *Halopenitus* способны расти анаэробно, посредством нитратредукции и ферментирования аргинина и ДМСО. На агаризованной среде организмы данной группы формируют колонии характерной красной или розовой окраски, однако отдельные виды образуют колонии красно-оранжевого или кремового цвета. Семейство *Halorubraceae* включает 7 родов: *Halorubrum*, *Halobaculum*, *Halohasta*, *Halolamina*, *Halonotius*, *Halopenitus* и *Salinigranum* [176].

Семейство *Natrialbaceae* (порядок *Natrialbales*) включает в основном алкалифильных экстремально галофильных архей. Представители данного семейства являются типичными обитателями содовых озер, также могут быть обнаружены в гиперсоленых озерах с нейтральным pH и солнечных солеварнях. Клетки микроорганизмов данной группы плеоморфны, могут иметь кокковидную, палочковидную, овальную или плоскую форму. Колонии, образуемые археями семейства *Natrialbaceae* на твердых средах, могут иметь окраску от светло-красной до красной, розовую, оранжевую, кремовую, коричневую, или быть

бесцветными. Оптимальные концентрации NaCl для роста этой группы микроорганизмов составляют 3 – 4 М. Подавляющее большинство галоархей семейства *Natrialbaceae* являются алкалифилами и оптимально растут на средах с рН, превышающим 8. Данные галоархеи являются аэробными хемоорганиотрофами, однако отдельные представители родов *Halobiforma*, *Haloterrigena* и *Halovivax* способны расти анаэробно посредством нитратредукции. Некоторые представители родов *Halovivax* и *Natrinema* также способны ферментировать аргинин и ДМСО. Семейство *Natrialbaceae* включает 12 родов: *Natrialba*, *Halobiforma*, *Halopiger*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Halovivax*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronolimnobius*, *Natronorubrum* и *Salinarchaeum* [177].

1.3.2. Галофильные бактерии

Умеренно и экстремально галофильные бактерии обнаружены среди представителей 8 из 30 филумов бактерий: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae*, *Cyanobacteria* и *Tenericutes* [161].

1.3.2.1. *Proteobacteria*

Филум *Proteobacteria* включает пять классов граммотрицательных бактерий: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* и *Epsilonproteobacteria*, из которых лишь класс *Betaproteobacteria* не содержит бактерий-галофилов. Бактерий-представителей филума *Proteobacteria* можно встретить повсеместно, в том числе в гиперсоленых геоценозах. Данная группа микроорганизмов весьма разнородна и объединяет бактерий с разнообразными физиологией и метаболическими возможностями [161].

Класс *Alphaproteobacteria* включает три порядка бактерий: *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* и *Rhodobacterales*, в составе которых есть галофильные представители.

Порядок *Rhizobiales* включает два рода, среди представителей которых присутствуют галофильные микроорганизмы: *Dichotomicrobium* (семейство *Huphomicrobiaceae*) [178] и *Rhodobium* (семейство *Rhodobiaceae*) [179].

Порядок *Rhodospirillales* включает семейство *Rhodospirillaceae*, в составе которого имеются 4 рода: *Tistlia* [180], *Marispirillum* [181], *Rhodovibrio* [182] и *Roseospira* [183], некоторые представители которых характеризуются как галофильные.

Порядок *Rhodobacterales* включает два семейства с галофильными представителями: *Hyphomonadaceae* (рода *Hyphomonas* [184], *Henriciella* [185] и *Woodsholea* [186]) и *Rhodobacteraceae*. Семейство *Rhodobacteraceae* включает 23 рода, представленных в том числе галофильными микроорганизмами. Данное бактериальное семейство весьма разнородно в плане фенотипических, метаболических и экологических характеристик своих членов. Среди бактерий этого семейства есть фотогетеротрофы, способные расти фотоавтотрофно или хемотрофно, строго аэробные и факультативно анаэробные хемоорганотрофы, ферментирующие микроорганизмы, факультативные метилотрофы. Некоторые из представителей этого семейства являются денитрификаторами. Галофильные микроорганизмы известны среди представителей родов *Rhodovulum* [187], *Antarctobacter* [188], *Citreimonas* [189], *Maribius* [190], *Gaetbulicola* [191], *Methylarcula* [192], *Sulfitobacter* [193], *Oceanicola* [194], *Palleronia* [195], *Paracoccus* [196], *Ponticoccus* [197], *Rhodothalassium* [198], *Roseinatronobacter* [199], *Roseisalinus* [200], *Roseovarius* [201], *Salinihabitans* [202], *Salipiger* [203], *Sediminimonas* [204], *Shimia* [205], *Sulfitobacter* [206], *Jannaschia* [207], *Tropicibacter* [208] и *Yangia* [209].

Класс *Gammaproteobacteria* включает 51 бактериальный род, известный наличием галофильных представителей [161].

Среди порядков класса *Gammaproteobacteria* особый интерес представляет порядок *Oceanospirillales*, поскольку практически все его представители являются галофильными или галотолерантными микроорганизмами [210].

Семейство *Halomonadaceae*, за исключением рода *Zymobacter*, представлено галофильными или галотолерантными бактериями. Все представители данного семейства подвижны благодаря наличию жгутиков, являются аэробными или факультативно анаэробными хемоорганотрофами [211]. Включает 14 родов:

Halomonas [212], *Aidingimonas* [213], *Carnimonas* [214], *Chromohalobacter* [215], *Cobetia* [216], *Halotalea* [217], *Halovibrio* [218], *Kushneria* [219], *Larsenimonas* [220], *Modicisalibacter* [221], *Pistricoccus* [222], *Salinicola* [223] и *Terasakiispira* [224].

Бактерии рода *Halomonas* заслуживают отдельного внимания, поскольку многие представители данной группы микроорганизмов являются перспективными продуцентами широкого спектра технологически значимых продуктов. Бактерии рода *Halomonas* могут быть обнаружены повсеместно в соленых экосистемах, типа естественных и искусственных соленых водоемов, морских ценозов, гиперсоленых озер. Представители данного рода являются галотолерантными, легко и умеренно галофильными бактериями, способными расти на средах с содержанием NaCl от 0 до 5,2 М. Клетки бактерий рода *Halomonas* имеют палочковидную, прямую или изогнутую форму и размеры 0,6 – 0,8 × 1,6 – 1,9 мкм, подвижны благодаря наличию жгутиков. Исключение оставляет *H. halodenitrificans*, клетки которого имеют кокковидную форму и неподвижны. Грамотрицательные. Формируют колонии белого или желтого цвета, становятся коричневыми в процессе старения культуры. В подавляющем большинстве являются аэробами. Некоторые представители способны расти анаэробно посредством восстановления NO_3^- до NO_2^- . Утилизируют сахара, аминокислоты, полиолы и углеводороды в качестве источника углерода и энергии, способны утилизировать сульфат аммония как источник неорганического азота [212]. На данный момент род *Halomonas* включает 107 подтвержденных видов [225].

Семейство *Alteromonadaceae* порядка *Alteromonadales* также включает галофильные микроорганизмы. Бактерии рода *Marinobacter* являются галотолерантными и способны расти на средах с концентрациями NaCl от 0,08 до 3,5 М. Мезофильны, растут в температурном диапазоне 10 – 45 °С. Клетки бактерий рода *Marinobacter* имеют палочковидную форму и размеры 0,6 – 0,8 × 1,6 – 2,0 мкм. Подвижные, благодаря единственному жгутику. Грамотрицательные. На твердых средах образуют неокрашенные колонии.

Аэробные хемогетеротрофы, на способны к анаэробному росту посредством денитрификации. Утилизируют органические кислоты, аминокислоты, спирты и углеводороды, не потребляют углеводы [226]. На данный момент род *Marinobacter* включает 53 подтвержденных вида [227].

К другим родам семейства *Alteromonadaceae*, включающим галофильные и галотолерантные микроорганизмы, относятся *Idiomarina* [228], *Spongiibacter* [229], *Aestuariibacter* [230], *Alteromonas* [231], *Glaciescola* [232], *Haliea* [233], *Marinobacterium* [234], *Microbulbifer* [235], *Pseudidiomarina* [236], *Pseudoalteromonas* [237] и *Psychromonas* [238].

Порядок *Chromatiales* объединяет аноксигенные фототрофные бактерии, также известные как пурпурные бактерии, осуществляющие бескислородный фотосинтез в анаэробных условиях. Данный порядок также включает нефототрофные виды близкородственных бактерий. Клетки данной группы микроорганизмов имеют сферические, вибрионные, спиральные или палочковидные формы; подвижные и неподвижные. Суспензии клеток этих бактерий могут иметь пурпурно-фиолетовый, пурпурно-красный, красный, оранжево-коричневый, желтовато-коричневый, коричнево-красный, коричневый или зеленый цвет. Фототрофные бактерии этого порядка способны к фотолитоавтотрофному или фотоорганогетеротрофному росту в анаэробных условиях [239].

Семейство *Ectothiorhodospiraceae* включает пурпурных бактерий, которые осуществляют окисление сульфидной серы до элементарной серы. В составе данного семейства имеются несколько родов, представители которых характеризуются как алкалофильные и нейтрофильные умеренные и экстремальные галофилы [240]. Некоторые представители родов *Alkalilimnicola* [241], *Ectothiorhodosinus* [242], *Ectothiorhodospira* [243], *Thioalkalivibrio* [244] и *Thiohalospira* [245] являются алкалофилами и оптимально растут в условиях умеренной и экстремальной солености. Представители родов *Aquisalimonas* [246] и *Arhodomonas* [247] являются нейтрофильными умеренными галофилами, а некоторые бактерии рода *Halorhodospira* [248] характеризуются как

нейтрофильные экстремальные галофилы. К другим бактериальным родам порядка *Chromatiales*, представители которых известны как галофильные микроорганизмы, относятся *Halochromatium* [249], *Halothiobacillus* [250], *Marichromatium* [251], *Thiohalocapsa* [252] и *Thioalkalibacter* [253].

Галофильные бактерии класса *Deltaproteobacteria* являются строго анаэробными хемоорганотрофными, хемолитогетеротрофными или хемолитоавтотрофными сульфатредуцирующими бактериями. Конечным акцептором электронов у этих микроорганизмов служит сульфат, однако, многие из них также способны восстанавливать сульфит, тиосульфат, и элементарную серу до сульфида [161]. Умеренно галофильные бактерии данной группы микроорганизмов принадлежат родам *Desulfocella* [254], *Desulfohalobium* [255], *Desulfonatronospira* [256], *Desulfovermiculus* [257], *Desulfovibrio* [258] и *Desulfurivibrio* [259].

Среди представителей класса *Epsilonproteobacteria* известно лишь три галофильных бактерии, принадлежащие родам *Arcobacter* [250], *Sulfurimonas* [261] и *Sulfurovum* [262]. Все являются обитателями гидротермальных источников.

1.3.2.2. *Firmicutes*

Филум *Firmicutes* включает 6 подтвержденных классов: *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrihia*, *Limnochordia*, *Negativicutes* и *Thermolithobacteria*. Это весьма разнородная группа бактерий, представители которой могут быть обнаружены повсеместно в разнообразных условиях, в том числе в гиперсоленых ценозах. Галофильные представители филума *Firmicutes* принадлежат классам *Bacilli* и *Clostridia* [161].

Класс *Bacilli* включает два порядка: *Bacillales* и *Lactobacillales*, представлен в основном грамположительными бактериями. Бактерии этого класса в большинстве своем аэробы или микроаэрофилы, некоторые являются факультативными анаэробами. Галофильные бактерии класса *Bacilli* принадлежат трем семействам порядка *Bacillales*: *Bacillaceae*, *Planococcaceae* и *Staphylococcaceae* [263].

Семейство *Bacillaceae* на сегодняшний день включает 85 подтвержденных родов. Бактерии данного семейства могут быть обнаружены повсеместно, являются типичными обитателями соленых экосистем. Клетки бактерий этого класса преимущественно палочковидной формы, однако встречаются представители, клетки которых имеют форму кокков. В основном грамположительные, однако встречаются грамотрицательные и грамвариабельные. Среди представителей многих родов встречаются галотолерантные (0 – 3,4 М NaCl), ацидо- и алкалитолерантные (pH 5 – 10) и термотолерантные (10 – 60°C) микроорганизмы. В большинстве своем спорообразующие, формируют эндоспores эллиптической, цилиндрической и сферической формы. В основном аэробы, однако встречаются факультативно анаэробные и строго анаэробные (род *Bacillus*) виды [264]. Умеренно и экстремально галофильные бактерии известны среди представителей родов *Bacillus* [265], *Alkalibacillus* [266], *Aquisalibacillus* [267], *Filobacillus* [268], *Gracilibacillus* [269], *Halalkalibacillus* [270], *Halolactibacillus* [271], *Halobacillus* [272], *Lentibacillus* [273], *Oceanobacillus* [274], *Ornithinibacillus* [275], *Paraliobacillus* [276], *Pontibacillus* [277], *Salimicrobium* [278], *Salinibacillus* [279], *Salirhabdus* [280], *Salsuginibacillus* [281], *Sediminibacillus* [282], *Tenuibacillus* [283], *Thalassobacillus* [284], *Virgibacillus* [285] и др.

Семейство *Planococcaceae* включает род *Jeotgalibacillus*, некоторые из представителей которого являются галотолерантами бактериями и растут в средах с концентрациями NaCl 0,5 – 3,6 М [286]. Родовое название было присвоено в соответствии с источником изоляции первого представителя рода – чоткаль (jeotgal), традиционное блюдо корейской кухни, представляющее собой ферментированные соленые морепродукты [287]. Бактерии рода *Jeotgalibacillus* имеют палочковидные подвижные клетки, грамвариабельные, образуют эндоспores, факультативные анаэробы, нейтрофилы [286]. На сегодняшний день род *Jeotgalibacillus* включает 9 подтвержденных видов бактерий [288].

Семейство *Staphylococcaceae* включает 9 родов, двум из которых принадлежат галофильные бактерии [161].

Род *Jeotigalicoccus* включает умеренно галофильные и галотолерантные бактерии. Представители этого бактериального рода имеют кокковидные неподвижные клетки, грамположительные, не образуют спор. Являются факультативными анаэробами, нейтрофилы [289]. На сегодняшний день род *Jeotigalicoccus* включает 10 подтвержденных видов, 8 из которых являются слабо и умеренно галофильными и галотолерантными микроорганизмами [290].

Бактерии рода *Salinicoccus* являются умеренными галофилами и демонстрируют оптимальный рост в среде с содержанием NaCl 0,7 – 1,7 М, но также способны расти на средах с содержанием NaCl 0 – 4,3 М. Представители этой группы микроорганизмов имеют сферические неподвижные клетки, одиночные или агрегированные попарно, по четыре или в небольшие группы. Грамположительные. На агаризованных средах формируют круглые гладкие колонии красно-розового или оранжевого цвета. Являются строгими аэробами. Оптимально растут при pH 7 – 9,5 и температуре 30 - 37°C, хотя толерантны к pH в диапазоне 6 – 11,5 и температурам в диапазоне 4 – 49°C. Представители данного рода могут быть обнаружены в соленых почвах и водоема, солнечных солеварнях, содовых озерах, а также изолированы из соленых ферментированных пищевых продуктов [291]. На сегодняшний день род *Salinicoccus* включает 18 подтвержденных видов [292].

Класс *Clostridia* включает порядок *Halanaerobiales*, в состав которого входят два семейства галофильных анаэробных бактерий: *Halanaerobiaceae* и *Halobacteroidaceae*.

Семейство *Halanaerobiaceae* представлено строго анаэробными умеренно галофильными бактериями. Представители данной группы микроорганизмов оптимально растут в средах с концентрацией NaCl 1,7 – 2,6 М. В зависимости от вида бактерии минимальная необходимая для роста концентрация NaCl может составлять от 0,3 до 1,7 М. Подавляющее большинство бактерий этого семейства являются нейтрофилами, однако встречаются галоалкалифилы. Все бактерии семейства *Halanaerobiaceae* являются грамотрицательными. Клетки имеют палочковидную форму. Не формируют спор. Все известные виды данного

семейства продуцируют энергию посредством ферментации сахаров. Конечным продуктом ферментации являются уксусная кислота, водород и углекислый газ, реже масляная, молочная, пропионовая или муравьиная кислота [293]. Семейство *Halanaerobiaceae* включает 4 рода: *Halanaerobium*, *Halarsenatibacter*, *Halocella* и *Halothermothrix* [294].

Семейство *Halobacteroidaceae* представлено строго анаэробными умеренно галофильными бактериями. Представители данной группы микроорганизмов оптимально растут в средах с концентрацией NaCl 1,7 – 2,5 М. В зависимости от вида бактерии, минимальная необходимая для роста концентрация NaCl может составлять от 0,3 до 1,7 М. Бактерии данной группы являются нейтрофилами, однако также присутствуют облигатные алкалифилы, который оптимально растут при pH 8,7 – 10 [295]. Все представители семейства *Halobacteroidaceae* имеют палочковидные клетки. Грамотрицательные. Некоторые представители формируют эндоспоры. Большинство видов бактерий данного семейства осуществляют ферментацию сахаров с образованием водорода, углекислого газа и уксусной, реже масляной, молочной, пропионовой или муравьиной кислоты. Помимо сахаров некоторые виды способны ферментировать аминокислоты. Отдельные виды (*Natroniella acetigena*) являются гомоацетогенами и растут хемогетеротрофно [296]. Отдельные виды (*Acetohalobium arabaticum*) являются хемоавтотрофами и утилизируют водород и углекислый газ с образованием уксусной кислоты, также способны расти метилотрофно на триметилаmine с образованием уксусной кислоты и аммиака [297]. Некоторые виды способны использовать разные соединения серы в качестве доноров или акцепторов электронов [295]. Семейство *Halobacteroidaceae* включает 10 родов: *Acetohalobium*, *Fuchsiella*, *Halanaerobacter*, *Halanaerobaculum*, *Halobacteroides*, *Halonatronum*, *Natroniella*, *Orenia*, *Selenihalanaerobacter* и *Sporohalobacter* [298].

1.3.2.3. *Actinobacteria*

Филум *Actinobacteria* в своем составе имеет несколько порядков, включающих галофильные микроорганизмы.

Семейство *Actinopolysporaceae*, являющееся единственным семейством порядка *Actinopolysporales*, длительное время включало один род – *Actinopolyspora*. Данная группа микроорганизмов объединяет аэробных, грамположительных актиномицетов, образующих интенсивно ветвящийся мицелий. Микроорганизмы этой группы являются хемоорганотрофными галофилами. Оптимальные для роста концентрации NaCl составляют 1,7 – 3,4 М. Спорофоры актиномицетов рода *Actinopolyspora* несут 10 и более кокковидных гладких спор [299]. На данный момент род *Actinopolyspora* включает 12 подтвержденных видов [300]. Недавно в семейство *Actinopolysporaceae* было включено два рода: *Haloactinomyces* и *Halopolyspora*, включающие по одному виду бактерий. Обе бактерии были выделены из образцов донных осадков Мертвого моря. *Haloactinomyces albus* растет на средах с содержанием NaCl 10 – 35% [301]. *Halopolyspora alba* растет на средах с соленостью 10 – 35%, основой минеральной композиции которых являются NaCl и MgCl₂ [302].

Порядок *Micrococcales* включает несколько родов, представители которых известны как галофильные или галотолерантные бактерии. Бактерии рода *Nesterenkonia* семейства *Micrococcaceae* являются умеренно галофильными и галотолерантными микроорганизмами. Некоторые из них также демонстрируют свойства алкалофильных и алкалитолерантных микроорганизмов, мезофильны. Клетки бактерий этого рода имеют форму палочек или кокков, палочковидные клетки могут ветвиться. Грамположительные. Не формируют эндоспор. Строго аэробные хемоорганотрофы [303]. На данный момент род *Nesterenkonia* включает 24 подтвержденных вида [304]. К другим родам порядка *Micrococcales*, имеющим по меньшей мере одного галофильного представителя, относятся *Georgenia* (семейство *Bogoriellaceae*) [305], *Isoptericola* (семейство *Promicromonosporaceae*) [306] и *Haloactinobacterium* (семейство *Ruaniaceae*) [307].

Порядок *Pseudonocardiales* включает род *Prauserella* семейства *Pseudonocardiaceae*, представленный в основном легко и умеренно галофильными микроорганизмами. За исключением нескольких видов, представители данного рода демонстрируют оптимальный рост на средах с содержанием NaCl 10 – 15%.

Некоторые представители способны расти в диапазоне соленостей 0 – 25%. Нейтрофилы, оптимально растут при температуре 28°C. Неподвижные актинобактерии, формируют разветвленный мицелий, которые распадается на неоднородные фрагменты палочковидной формы спустя 24 – 48 часов культивирования. Грамположительные. Аэробы [308]. На данный момент род *Prauserella* включает 15 подтвержденных видов [309]. К другим родам порядка *Pseudonocardiales* (единственное семейство *Pseudonocardiaceae*), включающим галофильные и галотолерантные виды, относятся *Amycolatopsis* [310], *Saccharomonospora* [311] и *Saccharopolyspora* [312].

Представители семейства *Nocardiopsaceae* порядка *Streptosporangiales* являются типичными обитателями почв. Некоторые из актиномицетов данной группы являются умеренными галофилами и могут быть часто обнаружены в соленых почвах. Это аэробные, грамположительные актиномицеты, формирующие интенсивно ветвящийся мицелий, споры которых могут быть одиночными или агрегированными в кластеры или цепочки [313]. Галофильные и галотолерантные представители имеются среди актиномицетов, принадлежащих родам *Allosalinactinospora* [314], *Marinactinospora* [315], *Marinitenerispora* [316], *Haloactinospora* [317], *Nocardiopsis* [318], *Salinactinospora* [319] и *Streptomonospora* [320].

Галофильные актинобактерии также встречаются среди представителей рода *Corynebacterium* [321] (семейство *Corynebacteriaceae*, порядок *Mycobacteriales*) и родов *Haloglycomyces* [322], *Salilacibacter* [323] и *Salininema* [324] (семейство *Glycomycetaceae*, порядок *Glycomycetales*).

1.3.2.4. *Rhodothermaeota*, *Balneolaeota* и *Bacteroidetes*

В начале 2016 года было предложено выделить филум *Rhodothermaeota* из филума *Bacteroidetes* как отдельный таксон. Разделение таксонов было предложено в соответствии с результатами филогенетического анализа последовательностей 16S и 23S рРНК и мультилокусного анализа последовательностей 29 белков-ортологов микроорганизмов, принадлежащих филуму *Bacteroidetes*. Новый филум *Rhodothermaeota* включал два класса:

Rhodothermia и *Balneolia*, представители которых характеризуются как палочковидные, грамотрицательные бактерии, аэробы или факультативные анаэробы, обитающие в морских или талассовых ценозах, часто экстремальные гало-, термо- и/или алкалифилы [325]. Позднее, в конце 2016 года, класс *Balneolia* был выведен из состава филума *Rhodothermaeota*. Был создан новый филум *Balneolaeta*, включающий единственный класс *Balneolia* [326].

Среди таксономических подгрупп филума *Rhodothermaeota* особый интерес представляет порядок *Rhodothermales* – единственный порядок класса *Rhodothermia*. Порядок *Rhodothermales* включает 4 семейства: *Rhodothermaceae*, *Ruricoccaceae*, *Salinibacteraceae* и *Salisaetaceae*.

Семейство *Rhodothermaceae* включает два рода: *Rhodothermus* (2 подтвержденных вида [327]) и новый род *Natronotalea* (1 подтвержденный вид [328]). Представители рода *Rhodothermus* характеризуются как бактерии с прямыми или изогнутыми палочковидными, подвижными или неподвижными клетками. Грамотрицательные. Аэробные хемогетеротрофы, потребляющие сахара и аминокислоты. Формируют красные или оранжевые колонии. Умеренно или экстремально галофильные, термофилы (растут при температурах 54 - 77°C) [329]. Представитель нового рода *Natronotalea* является облигатно алкалифильным (оптимум pH 9,5 – 9,8) экстремальным галофилом – оптимальные концентрации Na⁺ в ростовой среде составляют 2,5 – 3 М, однако способен расти при 2 – 4,5 М Na⁺ [330].

Семейство *Ruricoccaceae* включает два рода морских бактерий: *Ruricoccus* и *Rurivirga*, изолированных из образцов воды, отобранных в разных локациях Тихого океана, а том числе глубоководных [161].

Семейство *Salinibacteraceae* представлено галофильными и экстремально галофильными бактериями, способными расти в средах с содержанием NaCl от 5 до 35%. Также бактерии этого семейства характеризуются как мезофильные или легко термофильные, растут при температурах 27 - 47°C. Клетки бактерий семейства *Salinibacteraceae* имеют форму длинных палочек. Формируют колонии красного или оранжевого цвета. Грамотрицательные. Не образуют эндоспор.

Являются аэробными хемогетеротрофами [331]. На данный момент семейство *Salinibacteraceae* включает 4 рода умеренно и экстремально галофильных бактерий: *Longibacter*, *Longimonas*, *Salinibacter* и *Salinivenus* [332].

Род *Salisaeta* раньше принадлежал семейству *Salinibacteraceae*, однако недавно был выделен в отдельное семейство *Salisaetaceae* [325]. Род *Salisaeta* включает единственный бактериальный вид - *Salisaeta longa*. Эти бактерии имеют одиночные неподвижные очень длинные (до 30 мкм) палочковидные клетки. Формируют красные колонии. Грамотрицательные. Являются мезофильными галофилами, оптимально растут на средах с концентрациями 1,7М NaCl и 0,25М MgCl₂ при нейтральном pH. Являются аэробными хемоорганотрофами [333]. В 2019 году Парк и его коллеги изолировали новую морскую термофильную бактерию, которая является на данный момент единственным представителем нового бактериального рода *Roseithermus* семейства *Salisaetaceae* [334].

Филум *Balneolaeota* включает единственный класс *Balneolia* с порядком *Balneolales* и семейством *Balneolaceae*. Представители семейства *Balneolaceae* имеют палочковидные клетки. Грамотрицательные. Не образуют спор. Формируют колонии розового или оранжевого цвета. Являются аэробами или факультативными анаэробами. Легко алкалофильные, растут при pH среды от 6 до 10. Являются легко и умеренно галофильными, демонстрируют оптимальный рост при содержании 5 – 10% NaCl в ростовой среде. Являются обитателями морских экосистем, где могут быть обнаружены в толще воды или донных осадках, однако, некоторые представители данной группы бактерий также могут быть обнаружены в осадках гиперсоленых талассовых водоемов [325]. Семейство *Balneolaceae* включает 5 родов: *Balneola*, *Gracilimonas*, *Fodinibius*, *Aliifodinibius* и *Rhodohalobacter*, каждый из которых имеет по крайней мере одного умеренно или экстремально галофильного или галотолерантного представителя [335-340].

Филум *Bacteroidetes*, из которого были выделены филумы *Rhodothermaeota* и *Balneolaeota*, также включает группы микроорганизмов, представители которых известны как легко или умеренно галофильные [161]. Семейство

Flavobacteriaceae, принадлежащее порядку *Flavobacteriales* (класс *Flavobacteria*), на сегодняшний день включает 145 подтвержденных родов [341], некоторые из которых в своем составе имеют галофильных бактерий [342-346]. Также, галотермофильный микроорганизм является единственным представителем рода *Anaerophaga* семейства *Marinilabiaceae* (порядок *Bacteroidales*, класс *Bacteroidia*) [347].

1.3.2.5. *Thermotogae*

Филум *Thermotogae* объединяет микроорганизмов, являющихся типичными обитателями глубоко залегающих горячих нефтяных резервуаров, расположенных как на суше, так и в море. Это анаэробные, палочковидные бактерии, клетки которых окружены «тогой» – похожей на футляр структурой [161]. На сегодняшний день класс *Thermotogae*, являющийся единственным классом филума *Thermotogae*, включает 4 порядка: *Kosmotogales*, *Mesoacidotogales*, *Petrotogales* и *Thermotogales*, среди представителей которых известны галотолерантные и легко галофильные микроорганизмы [348-350].

1.3.2.6. *Cyanobacteria*

Представители филума *Cyanobacteria*, также известные как сине-зеленые водоросли, или сине-зеленые бактерии, являются типичными обитателями водных ценозов, в том числе морских и соленых [351]. Умеренно галофильные цианобактерии известны среди представителей родов *Halothece* [352], *Cyanothece* [353], *Aphanothece* [354] и *Halomicronema* [355]. Морские и легко галофильные цианобактерии известны среди представителей родов *Rubidibacter* [356], *Prochlorococcus* [357] и *Halospirulina* [358].

1.3.2.7. *Tenericutes*

Среди микроорганизмов филума *Tenericutes* известна единственная бактерия, характеризующаяся как умеренно галофильная (1,5 – 1,8 М NaCl). Бактерия *Haloplasma contractile* была изолирована из образца донных осадков глубоководного гиперсоленого бескислородного бассейна. Данная бактерия является единственным представителем рода *Haloplasma* семейства *Haloplasmataceae* (порядок *Haloplasmatales*, класс *Mollicutes*) [359-360].

1.3.3. Эукариоты

Помимо галофильных архей и бактерий, частыми, хоть и менее представленными, обитателями гиперсоленых сред являются эукариоты. Галофильные представители известны среди водорослей, грибов, простейших и многоклеточных эукариот [3, 14].

Водоросли-галофилы, наряду с галофильными цианобактериями, являются единственными первичными продуцентами в большинстве гиперсоленых экосистем. Одноклеточные зеленые водоросли рода *Dunaliella* являются типичными представителями флоры гиперсоленых водоемов [361]. На сегодняшний день род *Dunaliella* включает 26 видов водорослей, большинство из которых являются галофильными [362]. *D. salina* и *D. viridis* являются двумя наиболее часто встречаемыми в гиперсоленых водоемах представителями рода *Dunaliella*. Обе водоросли являются умеренными галофилами: *D. salina* оптимально растет на средах с содержанием NaCl 100 – 150 г/л, оптимальное содержание NaCl для *D. viridis* составляет 60 – 90 г/л, однако оба микроорганизма способны выживать и расти в широком спектре соленостей: от 0,9% до 33%. Для установления и поддержания осмотического баланса в качестве основного осмопротектора эти микроводоросли накапливают глицерин (до 50% АСБ) [361]. Диатомовые водоросли также являются типичными, но менее распространенными представителями флоры гиперсоленых ценозов. Диатомовые водоросли могут быть обнаружены в средах с концентрациями NaCl до 2 М, максимальная концентрация NaCl, не ингибирующая рост этих микроводорослей, составляет 3 М. Диатомовые водоросли гиперсоленых сред в своем большинстве принадлежат к родам *Amphora*, *Nitzschia* и *Navicula* [3, 362-365].

Микобиота гиперсоленых экосистем довольно многочисленна и разнообразна. На сегодняшний день известно около 10 порядков грибов, в составе которых имеются галофильные и галотолерантные виды. Порядки отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota* представляют особый интерес. Галофильные грибы отдела *Ascomycota* известны среди представителей порядков *Capnodiales*, *Dothideales*, *Eurotiales* и *Saccharomycetales*. Порядки *Capnodiales* и *Dothideales*

включают большое число экстремотолерантных видов. Представители рода *Cladosporium* порядка *Capnodiales* являются типичными деструкторами лигноцеллюлозы и широко представлены в разнообразных экосистемах. Некоторые виды рода *Cladosporium* были изолированы из гиперсоленых экосистем. Некоторые представители порядка *Eurotiales* демонстрируют свойства галотолерантных организмов и относятся к родам *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium* и *Penicillium*. Галофильные дрожжи порядка *Saccharomycetales* принадлежат в основном родам *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia* и *Pichia*. Среди грибов отдела *Basidiomycota* галофильные представители имеются в порядках *Trichonosporales* (галофильные дрожжи рода *Trichosporon*), *Sporidiales* (галофильные дрожжи родов *Rhodosporeidium* и *Rhodotorula*) и *Wallemiales* (род *Wallemia*) [3, 366 -367].

Простейшие-галофилы представлены среди организмов трех разных групп. Филум *Heterolobosea* включает флагеллят, амёб и амёбофлагеллят, некоторые из которых являются экстремофильными, в том числе галофильными микроорганизмами. Экстремально галофильные простейшие филума *Heterolobosea*, обитающие в средах с соленостью вплоть до 30%, известны среди представителей родов *Pharyngomonas*, *Pleurostomum*, *Euplaesiobystra* и *Tulamoeba*. Порядок *Bicosoecida* (*Stramenopiles*) представляет собой группу маленьких флагеллят (бикосоецид), включающую хорошо известные рода морских и галофильных простейших. К морским бикосоецидам относятся представители родов *Cafeteria* и *Caecitellus*. Некоторые из микроорганизмов этих родов являются умеренными галофилами. Бикосоециды рода *Halocafeteria* являются широко распространенным экстремально галофильными простейшими и могут быть обнаружены повсеместно в гиперсоленых водоемах. Представители филума *Ciliophora* (*Alveolata*) являются типичными представителями простейших гиперсоленых экосистем. Несмотря на разнообразие данной группы микроорганизмов, галофильные инфузории известны лишь среди небольшого числа родов. Экстремально галофильные инфузории известны среди представителей родов *Trimyeta* и *Platynematum*. Некоторые инфузории родов

Euplotes и *Schmidingerothrix* являются умеренно галофильными. Активное применение техник секвенирования тотальной ДНК, выделенной из различных образцов вод и седиментов гиперсоленых экосистем, и анализ полученных последовательностей демонстрируют существование большого разнообразия протистов, не описанных ранее [3,14, 368-369].

Многочлеточные эукариоты, такие как беспозвоночные и позвоночные животные, также являются представителями биоты гиперсоленых экосистем. К беспозвоночным обитателям гиперсоленых сред относятся насекомые (мухи *Ephydra cinerea*), ракообразные (креветки *Artemia franciscana*), коловратки (*Keratella quadrata*, *Brachionus plicatilis*), плоские черви (черви рода *Macrostomum*), веслоногие ракообразные (*Robertsonia salsa*, *Arctodiapto muscalinus*, *Cletocamptu retrogressus*) и ракушковые (*Cyprideis torosa*). Беспозвоночные галофилы часто являются пищей для позвоночных животных, населяющих гиперсоленые ценозы. Некоторые виды рыб рода *Tilapia* способны выдерживать умеренные солености. Соленые озера часто являются местом обитания разнообразных птиц, например, розового фламинго и черношейной поганки [3, 14].

Флора соленых экосистем также может быть представлена высшими растениями. Соленые ценозы являются нишей многих облигатных и факультативных галофитов. Облигатными галофитами являются *Plantago maritima* [370], *Glaux maritima*, *Salicornia europaea* [371-372] и *Spergularia marina* [373]. Факультативными галофитами, способными расти в почвах с умеренной соленостью, являются *Salicornia europaea* [374], *Atriplex halimus* [375], *Mesembryanthemum crystallinum* [376] и мангровое дерево *Laguncularia racemose* [377].

1.3.4. Галовирусы

Большинство галовирусов являются паразитами архей. Все археальные вирусы являются ДНК-вирусами с одноцепочечными или двуцепочечными линейными или кольцевыми геномами. Археальные РНК-вирусы на данный момент не известны. Среди археальных галовирусов наиболее представлены

вирусы порядка *Caudovirales* (каудовирусы) – икосаэдральные вирусы с линейным двуцепочечным ДНК-геномом и сократительным (миовирусы, семейство *Myoviridae*) или несократительным (сифовирусы, семейство *Siphoviridae*, и подовирусы, семейство *Podoviridae*) хвостом. Миовирусы являются наиболее распространенными галовирусами. Помимо морфологии, свойственной представителям порядка *Caudovirales*, галовирусы архей могут быть икосаэдрическими с внутренней мембраной, плеоморфными и лимоновидными. Бактериальных галовирусов на данный момент известно мало. Подавляющее большинство известных галовирусов являются каудовирусами. Также описан один бактериальный икосаэдрический галовирус с внутренней мембраной [378].

Среди галовирусов порядка *Caudovirales* известны как вирулентные, так и умеренные вирусы. Также известны несколько провирусов, интегрированных в геном некоторых галоархей, принадлежащих данному порядку. Миовирус HSTV-2, сифовирус HVTV-1 и подовирус HSTV-1 являются наиболее изученными галоархеальными каудовирусами. Эти вирусы являются вирулентными, их жизненный цикл характеризуется как литический: вирус HSTV-2 лизирует клетку-хозяина спустя 10 часов после заражения, HVTV-1 – 12 часов, HVTV-1 – 21 час [379-381]. Среди умеренных каудовирусов известны вирусы, реплицирующиеся в клетках хозяина посредством интеграции в хромосому (миовирус ФCh1), и вирусы, реплицирующиеся как плаزمиды (ФН). Разные галоархеальные каудовирусы в значительной степени различаются спектром хозяев [382]. Миовирусы способны заражать представителей разных археальных родов, в частности *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halobellus*, *Haloterrigena* и *Halogramma*, в то время как подовирусы и сифовирусы отличаются значительно большей избирательностью по отношению к хозяевам [383].

Несмотря на то, что каудовирусы наиболее представлены среди галовирусов, плеоморфные вирусы галоархей являются наиболее распространенными в гиперсоленых средах обитания. Плеоморфные вирусы представляют собой мембранные везикулы, оснащенные белковыми шипами. На внутренней стороне мембраны вирусов располагаются крупные мембранные

белки. Вирионы плеоморфных вирусов несут дву- или одноцепочечную кольцевую или линейную молекулу ДНК, не образующую нуклеопротеиновых комплексов. Геномы данных вирусов несут одинаковый набор генов: ко́ровые гены, кодирующие белок, формирующий шипы, и внутренний мембранный белок, ген упаковочной АТФазы и гены двух сборочных факторов. Мембрана плеоморфных вирусов формируется из липидов мембраны клетки микроорганизма-хозяина, которые неизбежно забираются в процессе высвобождения вирусных частиц. Плеоморфные галовирусы имеют нелитический жизненный цикл. Некоторые плеоморфные вирусы, например His2 и HRPV-6, оказывают влияние на рост клетки и в значительной степени его замедляют, однако репликация других вирусов, например HGPV-1, никак не сказывается на процессе роста клеток хозяина [384-385].

Лимоновидные археальные галовирусы также широко распространены в гиперсоленых экосистемах и были обнаружены во многих образцах из разнообразных природных объектов. Лимоновидные вирусы описаны для многих гипертермофильных кренархеот, однако на данный момент известен лишь один галовирус подобной морфологии – His1, хозяином которого является *Haloarcula hispanica*. Данный вирус имеет короткий хвост с шестью шипами. Оболочка His1 способна изменять свои геометрические параметры, благодаря чему вирионы часто меняют форму и утрачивают симметрию. Вирус His1 имеет нелитический жизненный цикл, механизм высвобождения вирионов из клетки хозяина да сегодняшний день не описан [386-387].

Икосаэдрические галовирусы с внутренней мембраной известны среди вирусов галофильных архей, бактерий и эукариотов. Это ДНК-вирусы с двуцепочечным линейным или кольцевым геномом [378]. Структура галовирусов этой группы во многом аналогична структуре бактериофага PRD1. Эти вирусы содержат внутреннюю мембрану, полученную в процессе высвобождения вирионов из предыдущего хозяина и используемую для инъекции генетического материала в клетку нового хозяина. Внутренняя мембрана этих вирусов богата белками. Качественный липидный состав внутренней мембраны вируса зависит от

состава мембраны организма-хозяина, но при этом сильно отличается от него количественно, что говорит об избирательном отборе липидов в процессе сборки новых вирионов [388]. Вирусы данной группы имеют литический жизненный цикл. Большинство икосаэдрических галовирусов с внутренней мембраной, например SH1, PH1, HHV-2, являются вирулентными [389-390]. Вирус SNJ1 галоархеи *Natrinema sp.* J7-1 является умеренным [391]. Вирус SSIP-1 на данный момент является единственным бактериальным икосаэдрическим галовирусом с внутренней мембраной. Это вирулентный вирус бактерии *Salisaeta sp.* SP9-1, однако его интересной особенностью является наличие в геноме гена потенциальной интегразы, что позволяет предположить, что в определенных условиях данный вирус может вести себя как умеренный бактериофаг [392]. Пять известных эукариотических галовирусов также относятся к икосаэдрическим галовирусам с внутренней мембраной. Эти галовирусы являются мимивирус-подобными и марселевирус-подобными паразитами галотолерантной амебы *A. polyphaga* [393].

Инфективность, эффективность сборки вирионов и жизненный цикл некоторых галовирусов зависит от солености окружающей среды. Способность каудовирусов HSTV-2 и HVTV-1 инфицировать новых хозяев практически полностью инактивируется в условиях низкой солености, однако полностью реактивируется при установлении оптимальной концентрации солей в окружающей среде [379]. Бактериальный вирус SSIP-1 нуждается в высокой солености окружающей среды для проникновения в клетки хозяина и эффективной репликации новых вирусных частиц [392]. Максимальное число частиц лимоновидных вирусов наблюдается в средах с высокой соленостью [394]. Галовирус SNJ1 также лучше инфицирует клетки хозяина *Natrinema sp.* J7-1 при солености окружающей среды 30%. Жизненный цикл SNJ1 при такой солености характеризуется как литический. Однако, при понижении солености среды до 18%, оптимальных для роста *Natrinema sp.* J7-1, цикл SNJ1 становится лизогенным [395].

1.4. Гиперсоленые экосистемы

1.4.1. Солнечные солеварни

Наиболее распространенным и изученным примером антропогенной гиперсоленой экосистемы являются солнечные солеварни, повсеместно создаваемые в тропической и субтропической климатических зонах для производства поваренной соли, представляющие собой системы многочисленных последовательно связанных мелководных водоемов. Принцип функционирования солнечных солеварен заключается в том, что морская вода последовательно переносится из прудов с более низкой концентрацией растворенных солей в пруды с более высокой, что позволяет наблюдать широкий спектр гиперсоленых сред разной солености и состава, от морской воды до насыщенных растворов NaCl. Другой привлекательной особенностью подобных сооружений является то, что в каждом отдельно взятом пруду соленость воды искусственно поддерживается на определенном уровне, что лишает солнечные солеварни «недостатка», свойственного многочисленным мелким приморским соленым прудам и озерам – сильной зависимости от сезонной смены погодных условий. Постепенное насыщение растворов солей, вследствие испарения воды в солеварнях, способствует последовательному осаждению различных солей: карбонатов, гипса и галита; что позволяет разделить многочисленные пруды системы на группы. Воды прудов карбонатной группы характеризуются концентрациями NaCl 70 – 140 г/л. В данных условиях происходит активное осаждение различных карбонатов, в основном карбоната кальция. Растворы NaCl с концентрацией 220 – 290 г/л попадают в пруды гипсовой группы, где происходит осаждение сульфата кальция. Вышедшая из гипсовых прудов рапа выпаривается до концентраций NaCl превышающих 290 г/л и переносится в галитные пруды, где происходит кристаллизация галита. Помимо близких к насыщению концентраций NaCl (290 – 320 г/л), воды галитных прудов характеризуются высоким содержанием ионов Mg^{2+} и K^+ . После осаждения галита концентрированные растворы солей магния и калия подвергаются дальнейшей концентрации и осаждению, либо возвращаются обратно в море [3, 396-399].

Солеварня Брас дел Порт, расположенная в Санта Поло на испанском побережье Средиземного моря, изучается уже около 40 лет и является классическим модельным объектом для исследования гиперсоленых экосистем. Находясь в зоне засушливого Средиземноморского климата, характеризующегося низким годовым количеством осадков (200 мм в год) и небольшим сезонным изменением температур (средняя температура самого теплого месяца в году составляет 26°C, самого холодного - 12°C), солеварня Брас дел Порт круглый год сохраняет стабильные условия среды обитания и является идеальным объектом для исследования экологии и гидрохимии гиперсоленых сред [398].

Характеристики этой солеварни могут быть экстраполированы для описания многочисленных аналогичных промышленных объектов. Соленость каждого отдельного пруда солнечных солеварен постоянно поддерживается на одном уровне путем регуляции входящих и выходящих потоков рапы. Пруды с разной концентрацией солей имеют различающиеся физико-химические характеристики. Пруды с насыщенными растворами NaCl имеют температуру и pH, значительно отличающиеся от температуры и pH прудов, чья соленость не превышает 15%. Так более соленые воды имеют более кислую среду (разница может достигать единицы значений pH) и более высокую, с разницей до 10°C, температуру. Ввиду активно протекающих процессов фотосинтеза в прудах с низкой соленостью, их воды характеризуются пониженным содержанием растворенного CO₂, что также является причиной повышения pH среды. С увеличением солености наблюдается увеличение концентраций соединений азота и фосфора. Содержание растворенного в среде кислорода с увеличением концентрации солей понижается [397-398].

Ранние микробиологические исследования солеварен, основанные на изоляции и описании чистых культур микроорганизмов, послужили основой для изучения экосистем солнечных солеварен в частности и различных гиперсоленых экосистем в целом. В 1980-х годах Родригесом-Валерой и его коллегами было произведено масштабное микробиологическое исследование разных выпарных и кристаллизационных прудов солеварни Брас дел Порт с соленостью воды от 10%

вплоть до насыщенного раствора NaCl. В результате их исследования было установлено, что количественный и таксономический состав микробных популяций соленых экосистем определяется соленостью окружающей среды. Подавляющее большинство микроорганизмов, изолированных из прудов с соленостью >15%, являлись галофилами. Доминирующими гетеротрофными микроорганизмами прудов, соленость которых составляла от 15% до 30%, являлись умеренно галофильные бактерии, в соответствии с современной систематикой относящиеся к роду *Vibrio* и родам семейства *Halomonadaceae*, а также некоторые быстрорастущие галоархеи. Оксигенные и аноксигенные фотосинтезирующие бактерии, преимущественно являющиеся представителями родов *Halochromatium* и *Rhodospirillum*, также были обнаружены в этом диапазоне соленостей. При солености окружающей среды 25% и выше, бактерии были представлены в основном грамположительными кокками. Микробиологический анализ образцов, отобранных в прудах с соленостью более 30% демонстрировал значительное снижение разнообразия бактериальной биоты и увеличение численности и разнообразия галоархеальных популяций. Помимо разнообразных прокариотов, группа Родригеса-Валеры отметила присутствие многочисленных эукариотических представителей биоты, в частности микроводоросли рода *Dunaliella*, популяции которой наблюдались в прудах с соленостью более 15% и достигали пика численности при солености 20 – 30%, разнообразных простейших, зеленых и диатомовых водорослей в прудах с соленостью <15%, личинок москитов, водяных насекомых и больших популяций солоноводной креветки *Artemia salina* в весеннее время года [400-401].

Развитие молекулярно-биологических методов анализа состава и идентификации отдельных представителей биоты экосистем без необходимости их изоляции в чистые культуры способствовало более подробному изучению состава микробных сообществ прудов солеварни Брас дел Порт. В 2002 году Бенлloch и коллеги произвели исследование микробного состава прудов с разной соленостью посредством молекулярных (секвенирование гена 16S рРНК) и культуральных методов. Состав микробиоты прудов с соленостью 4‰ (морская

вода) и 8% был во многом эквивалентен – бактерии были представлены разнообразными микроорганизмами, принадлежащими *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria*, *Epsilonaproteobacteria*, СФВ-группе (бактерии родов *Cytophaga*, *Flavobacterium* и *Bacteroides*), *Firmicutes* и *Cyanobacteria*. Археальная составляющая прудов с низкой соленостью была представлена морскими археями II группы (MG II *Archaea*), археями семейства *Halobacteriaceae* и неидентифицированными микроорганизмами типа *Euryarchaeota*. Пруд с соленостью 22% характеризовался значительно меньшим бактериальным разнообразием. Бактерии этого пруда относились к известным галофильным представителям *Alphaproteobacteria*, *Gammaaproteobacteria*, *Cyanobacteria* и СФВ-группы. Бактериальная составляющая микробиоты пруда с соленостью 32% включала исключительно микроорганизмы СФВ-группы и была представлена в основном *Salinibacter ruber*. Археи прудов с соленостью 22% и 32% были идентифицированы как представители семейства *Halobacteriaceae*, родов *Halorubrum* и *Haloarcula*. Галоархеями с наиболее многочисленной популяцией в кристаллизационном пруду с соленостью 32% являлись представители вида *Haloquadratum walsbyi* [402].

Дальнейшее развитие высокоэффективных технологий секвенирования способствовали с 2010 года началу активных метагеномных исследований микробных сообществ солнечных солевых прудов. Это позволило установить точный таксономический состав и плотности микробных популяций микробиоты разных прудов солнечных солевых прудов. Вентоза и его коллеги обобщили результаты нескольких независимых метагеномных исследований, что позволило сопоставить и сравнить микробиологический состав выпарных и кристаллизационных прудов с разной соленостью солевой Брас дел Порт. Микробиота морской воды, забираемой для последующего выпаривания, на 95% представлена бактериями, 5% приходится на долю архей типа *Euryarchaeota*. Наиболее представленной группой бактерий являются различные протеобактерии (*Alphaproteobacteria* – 41%, *Betaproteobacteria* – 1%, *Gammaaproteobacteria* – 13%, другие протеобактерии – 4%). К минорным бактериальным группам морской воды относятся

Actinobacteria (2%), *Verrucomicrobia* (2%), *Cyanobacteria* (11%), *Bacteroidetes* (9%), а также другие (1%) и неклассифицированные (12%) бактериальные группы. Увеличение солености воды в прудах способствует снижению доли и таксономического разнообразия бактериальной компоненты микробного сообщества и увеличению доли галофильных архей типа *Euryarchaeota*. Микробное сообщества пруда с соленостью 13% на 73% представлено бактериями и на 27% археями типа *Euryarchaeota*. Бактериальная составляющая включает микроорганизмы следующих таксономических групп: *Alphaproteobacteria* (20%), *Betaproteobacteria* (1%), *Gammaproteobacteria* (22%), *Actinobacteria* (12%), *Verrucomicrobia* (3%), *Bacteroidetes* (7%), другие (1%) и неклассифицированные (7%) бактериальные группы. В пруду с соленостью 19% на долю *Euryarchaeota* приходится 46% микробиоты, а на долю бактерий – 54%, которые включают представителей *Alphaproteobacteria* (7%), *Gammaproteobacteria* (18%), *Deltaproteobacteria* (1%), *Actinobacteria* (6%), *Verrucomicrobia* (3%), *Firmicutes* (1%), *Bacteroidetes* (15%), другие (1%) и неклассифицированные (2%) бактериальные группы. В прудах с соленостью 33% и 37% основной микробной группой являются галоархеи типа *Euryarchaeota* (89% и 88%) и неклассифицированные археи (1% и 2%). Бактерии являются минорным компонентом сообщества данных прудов и практически полностью представлены микроорганизмами филума *Bacteroidetes*. Микробиота пруда с соленостью 33% включает 9% бактерий филума *Bacteroidetes* и 1% бактерий других групп. На долю бактерий филума *Bacteroidetes* приходится 10% микробиоты пруда с соленостью 37% [398].

1.4.2. Большое Соленое озеро

Большое Соленое озеро (США, Юта) является крупным внутриконтинентальным гиперсоленным талассовым озером. Большое соленое озеро происходит от плейстоценового соленого озера Бонневилль, обмелевшего и частично высохшего после окончания последнего ледникового периода 13 тысяч лет назад, и является самым большим озером в западных штатах США и вторым



Рисунок 1.2. Большое Соленое озеро, Юта, США. На данной фотографии Большого Соленого озера видны последствия создание дамбы в 1959 году: воды гиперсоленной северной части озера имеют красную окраску благодаря популяциям экстремально галофильных микроорганизмов, в то время как воды южной части озера с умеренной соленостью остаются неокрашенными.

по степени солености озером в мире после Мертвого моря [403, 404].

Большое Соленое озеро сильно подвержено сезонным погодным изменениям. Его размеры варьируются в соответствии с сезонным изменением количества осадков и циклами пересыхания и в среднем составляют 122 км в длину и 50 км в ширину. Средняя глубина составляет 4,3 метра и в самом глубоком месте достигает 9 метров. Для Большого Соленого озера свойственны значительные сезонные изменения температуры воды, которая варьируется от 0,5°C в январе до 26,7°C в июле. Мелководные участки озера могут нагреваться вплоть до температуры 45°C. Большое Соленое озеро является озером терминального типа: оно не имеет выходящих крупных водных артерий, однако питается несколькими реками, в числе которых реки Бэр, Вебер и Джордан. Его соленость сильно зависит от циклов высыхания и разлива, температуры и количества сезонных осадков. Локальная концентрация растворенных в воде солей также сильно зависит от рельефа дна озера и может варьироваться от 30 г/л до 340 г/л в зависимости от точки отбора проб. Большое Соленое озеро является одним из крупнейших меромиктических озер и имеет несколько галоклинов – хемоклинов, разделяющих несмешивающиеся слои большой разницей в концентрациях растворенных солей. Помимо естественных причин, существуют антропогенные причины большой разницы локальных концентраций растворенных солей в различных точках озера. В 1959 году было окончено строительство дамбы для железной дороги, пересекающей Большое Соленое озеро, что привело к его разделению на южную и северную части. Спустя 7 лет обнаружилось, что концентрации солей в водах северной части озера приблизились к концентрациям насыщения, в то время как питаемая реками южная часть озера остается менее солоноводной. На сегодняшний день концентрации растворенных солей для северной части озера в зависимости от температуры варьируют в диапазоне 280 – 350 г/л, а для южной составляют 110 – 150 г/л. Такие абсолютные концентрации растворенных солей способствуют активным процессам кристаллизации карбоната кальция, осаждение которого наблюдается на всей площади Большого Соленого озера. В северной части озера,

ввиду концентраций NaCl близких к насыщенному раствору, происходит постоянная кристаллизация гипса, чьи кристаллы регулярно обнаруживаются в донных осадках и глине. Юта – штат с активно развивающейся и функционирующей горной промышленностью, что способствует обогащению вод Большого Соленого озера ионами различных металлов и неметаллов. Кобальт, медь, свинец, цинк, ртуть, селен и др. регулярно привносятся в акваторию Большого Соленого озера как естественными путями, так и посредством антропогенной активности [3, 19, 405].

Тот факт, что Большое Соленое озеро не является безжизненным, известен давно. Первые микробиологические исследования, демонстрирующие наличие в водах озера микроорганизмов бактериальной и археальной природы, датируются 1937 годом. Смит и Зобель помещали стеклянные пластинки в воду озера, где выдерживали их на протяжении 24 часов. Микроскопия пластинок после извлечения демонстрировала наличие от 40 до 1100 микроколоний на 1 см², образованных клетками с разной морфологией. Соленость воды Большого Соленого озера в тот год составляла около 33,6%. Дальнейшая работа исследователей с накопительными культурами, полученными на основе образцов воды, демонстрировала, что порядка 96% микробной популяции не способно расти при соленостях среды ниже 7%. Около трети изолятов были оснащены капсулами, некоторые образовывали структуры типа эндоспор, и лишь 10% являлись грамположительными [406]. Первые сообщения о наличии эукариотических организмов – сообществ одноклеточных водорослей в Большом Соленом озере датируются концом XIX века [3, 19, 405]. Простейшие, такие как инфузории и амёбы, были обнаружены в водах озера в 1920-х годах [405]. Активные микробиологические исследования озера начались в 1970-х годах, уже после его разделения на южную и северную часть железнодорожной дамбой [408-410].

Основными первичными продуцентами Большого Соленого озера являются одноклеточные зеленые водоросли рода *Dunaliella*, в частности виды *D. salina* и *D. viridis*. *D. salina* является доминирующим первичным продуцентом в более

соленой северной части озера, в то время *D. viridis* образует популяции с высокой плотностью клеток в менее соленом южном бассейне. Помимо зеленых водорослей рода *Dunaliella* минорными первичными продуцентами озера являются цианобактерии родов *Aphanothese* и *Oscillatoria*. В периоды длительного сохранения стабильной солености воды озера (в 1900 – 1959 годах соленость составляла 20 – 26%) наблюдались и другие первичные продуценты – другие виды зеленых и диатомовых водорослей [3, 19, 405, 409]. В 1977 – 1980 годах Феликс и Рашфорд описали 7 видов зеленых водорослей, 4 вида цианобактерий, 17 видов диатомовых водорослей и 1 вид динофлагеллят, населяющих воды Большого Соленого озера [411-413]. Дальнейшее постепенное снижение солености воды южного бассейна способствовало появлению многоклеточных водорослей, таких как *Ulva marginata* и *Polycystis parckardii* [414].

Гетеротрофные эукариоты являются минорными компонентами биоты Большого Соленого Озера. В периоды, когда соленость не превышает критических 20%, в водах озера могут наблюдаться простейшие, такие как флагелляты, амёбы и инфузории [3, 19, 405]. Гриб рода *Cladosporium*, способный расти на средах с содержанием солей 290 г/л, был изолирован из образцов, отобранных с поверхности деревянных конструкций, регулярно контактирующих с водой озера [415]. Животными-хищниками Большого Соленого озера являются солоноводная креветка *Artemia salina* и два вида мух рода *Ephydra*. Популяции этих животных имеют большую плотность в южном бассейне озера, однако также присутствуют в гиперсоленой северной части [3, 19].

Типичными представителями прокариотов северной части озера являются экстремально галофильные археи, благодаря чему северный бассейн регулярно приобретает характерную красную окраску. В 1970-х годах Пост произвел примерный подсчет клеток архей в миллилитре воды северного бассейна озера в разное время года. В теплое время года число археальных клеток в среднем составляло порядка $7 \cdot 10^7$ на мл воды и могло достигать $2,4 \cdot 10^8$ на мл воды после скачков плотности популяций микроводорослей. В зимнее время года численность популяции архей сокращалась до 10% от летних значений [409]. В

1988 году Фендрих произвел подсчет клеток культивируемых аэробных бактерий в северном и южном бассейнах озера посредством высева образцов на различные среды (комплексная, ацетат, глюкоза, глицерин) с разной соленостью (5%, 13% и 20%). Высевы образцов, отобранных в северной части озера, демонстрировали $2,4 \cdot 10^3 - 4,6 \cdot 10^5$ КОЕ/мл при солености среды 5% на всех субстратах и $7,5 - 9,3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл и $2,4 - 4,6 \cdot 10^6$ КОЕ/мл для соленостей 13% и 20% для всех субстратов, за исключением глюкозы, при росте на которой наблюдалось образование крайне редких единичных колоний. Высевы образцов, отобранных в южной части озера, демонстрировали $2,4 \cdot 10^3 - 7,3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл при солености среды 5% на разных субстратах, $2,4 \cdot 10^2 - 1,5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл при солености 13% и $2,4 \cdot 10^2 - 1,5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл для солености 20% для всех субстратов, за исключением глюкозы [416].

В 2014 году коллективом Тази было осуществлено исследование археального и бактериального сообществ южного и северного бассейна Большого Соленого озера посредством секвенирования последовательностей 16S рРНК микробиоты и их последующего филогенетического анализа. В результате проделанной работы исследователями было выделено 175 археальных и 212 бактериальных операционных таксономических единиц (ОТЕ, operational taxonomic unit, OTU), 45 и 18 из которых было невозможно отнести к какому-либо из известных таксонов, что свидетельствует о присутствии среди биоты Великого Соленого озера новых, ранее не описанных видов бактерий и архей. Все выделенные археальные ОТЕ были отнесены к представителям филума *Euryarchaeota*. Около 57% археальных ОТЕ имели низкое сходство (60 – 90%) последовательностей с последовательностями известных архей, что сделало невозможным их отнесение к какой-либо из известных групп филума *Euryarchaeota*. 32% ОТЕ были отнесены к представителям следующих археальных родов: *Natronomonas*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Haloquadratum*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Haloarcula* и *Halobacterium*. Все, за исключением единственного представителя филума *Firmicutes*, бактериальные ОТЕ являлись представителями филума *Proteobacteria*. Среди выделенных бактериальных ОТЕ

62% были определены как представители родов *Shewanella*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Alcanivorax*, *Pseudomonas* и *Marinobacter* [417].

1.4.3. Мертвое море

К водным объектам со средой аталассового типа относится Мертвое море - самый соленый водоем на Земле. Это озеро площадью 630 кв. км. и глубиной 300 метров, располагающееся на границе Израиля и Иордании. Ионный состав вод Мертвого моря значительно отличается от состава морской воды: двухвалентные катионы Mg^{2+} (~2 М) и Ca^{2+} (~0,5 М) превалируют над катионами Na^+ (~1,5 М) и K^+ (~0,2 М). Наиболее представленным анионом является Cl^- (~6,5 М), на чью долю приходится 99% от общей массы анионов. Оставшийся 1% представлен ионами Br^- (~0,1 М), ионы SO_4^{2-} присутствуют в следовых количествах. Кислотность воды соответствует значению рН 6. Ионный состав Мертвого моря регулярно меняется ввиду того, что начиная с 60-х годов 20 века уровень воды в нем начал понижаться. На сегодняшний день водный баланс мертвого моря отрицателен и падение уровня воды составляет порядка одного метра в год. Это связано с постоянным забором вод Мертвого моря на сельскохозяйственные и коммунальные нужды, а также эксплуатацией его ресурсов минеральной промышленностью Израиля и Иордании. Постоянный отбор пресной воды, а также стоки, возвращаемые солеварнями после производства галита и карналлита ($KMgCl_3 \cdot 6H_2O$), представляющие в основном растворы хлоридов кальция и магния, способствуют увеличению абсолютных концентраций растворенных солей в воде Мертвого моря, которая на сегодняшний день составляет порядка 350 г/л, а также изменению соотношения концентраций одновалентных (Na^+ , K^+) и двухвалентных (Mg^{2+} , Ca^{2+}) катионов в пользу последних. Осаждение галита на дно Мертвого моря, вследствие перенасыщения вод $NaCl$, также интенсифицируют процессы изменения ионного состава воды [3, 21].

Ранние микробиологические исследования Мертвого моря демонстрировали наличие разнообразных представителей доменов бактерий, архей и эукариот. В конце 1930-х годов Бенджамин Волкани изолировал и описал множество микроорганизмов из воды и осадков Мертвого моря. Исследования Волкани демонстрировали наличие разнообразных красных архей семейства *Halobacteriaceae*, различных галофильных бактерий, амёб и инфузорий, одноклеточных зеленых водорослей рода *Dunaliella*. Во время работ Волкани соленость Мертвого моря составляла порядка 80% от современного уровня.



Рисунок 1.3. Мертвое море. В южной части Мертвого моря можно наблюдать многочисленные выпарительные пруды.

Последующие микробиологические исследования, произведенные в 80х и в 90х годах, свидетельствовали об исчезновении протистов. Популяции микроводорослей рода *Dunaliella*, которые являются единственным первичным продуцентом в экосистеме Мертвого моря, в настоящее время присутствуют в верхних водных слоях [418-422]. Мертвое море стало источником выделения множества галофильных архей и бактерий, некоторые из которых стали классическими модельными организмами для изучения экстремальных галофилов. Примером таких микроорганизмов являются галоархеи *Haloarcula marismortui* [423], *Haloferax volcanii* [424], *Halorubrum sodomense* [425], *Halobaculum gomorrense* [426], *Haloplanus natans* [427], и бактерий *Halomonas halophila* [428], *Chromohalobacter marismortui* [428], *Chromohalobacter israelensis* [429] и *Salibacillus marismortui* [430].

Постепенное изменение солености воды Мертвого моря способствовало возникновению в 1979 году хемоклина на глубине 40 метров. При этом нижний водный слой характеризовался как анаэробный, с высоким содержанием сульфид-ионов. Это событие спровоцировало начало активных исследований с целью изоляции сульфатредуцирующих бактерий из донных отложений Мертвого моря [3, 21]. Хотя эти исследования не увенчались успехом, они способствовали изоляции и описанию множества анаэробных галофильных микроорганизмов, в частности бактерий порядка *Halanaerobiales*, семейства *Halobacteroidaceae*, например, *Halobacteroides halobius* [431], *Orenia marismortui* [432] и *Selenihalanaerobacter shriftii* [433].

Плотности микробных популяций мертвого моря сильно зависят от солености его воды и наличия питательных субстратов. Как говорилось ранее, зеленые водоросли рода *Dunaliella* являются единственным первичным продуцентом. Однако, воды Мертвого моря содержат концентрации минеральных солей, превышающие оптимальные необходимые для достижения высоких плотностей клеток этих водорослей. Резкое увеличение численности популяции *Dunaliella spp.* наблюдалось в 1980 и 1992 годах, когда большое количество осадков способствовало повышению уровня воды в Мертвом море, разбавлению

и, как следствие, снижению солености верхнего водного слоя. Резкое увеличение плотностей популяций водорослей способствовало последующему, наблюдаемому через несколько недель увеличению численности красных галоархей. Галоархеальные популяции с высокой плотностью также наблюдались в поверхностном разбавленном слое воды. Интенсивная красная окраска клеточных мембран галоархей и высокие плотности их популяций способствовали окраске воды Мертвого моря в красный цвет осенью 1980 и летом 1992 годов [21].

В 2007 году было произведено метагеномное исследование биомассы микробиоты Мертвого моря, полученной посредством проточного центрифугирования порядка 800 литров озерной воды. В результате этого исследования было определено несколько галоархеальных 16S рРНК флотипов. Подавляющее большинство последовательностей, полученных в результате секвенирования образцов, имели низкую идентичность (<93%) 16S рРНК последовательностям культивируемых и некультивируемых микроорганизмов, размещенных в базе данных GenBank. Многие флотипы демонстрировали отдаленное родство представителям галоархеальных родов *Halorhabdus*, *Haloplanus*, *Natronomonas* и др., что свидетельствует о наличии среди биоты Мертвого моря групп новых, ранее неизвестных архей. Галофильные бактерии являются минорным компонентом микробного сообщества Мертвого моря. Анализ последовательностей бактериальных генов 16S рРНК демонстрировал наличие небольшого числа микроорганизмов, родственных представителям филумов *Firmicutes* (идентичность 93 – 99%) и *Fusobacteria* (идентичность 89%) [434-435].

1.4.4. Озеро Вади ан-Натрун

Другим примером аталассовых сред обитания являются содовые озера. Воды содовых озер характеризуются высоким рН (10-11 и выше) и, как следствие, очень низким содержанием плохо растворимых при таких условиях двухвалентных ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} . Анионы в водах содовых озер, помимо высоких концентраций Cl^- и SO_4^{2-} , представлены HCO_3^- и CO_3^{2-} . Содовые озера

широко распространены по всему миру. Одними из наиболее изученных и популярных объектов для исследования экологии содовых озер являются озера Вади ан-Натрун, располагающиеся в одноименной долине в 100 километрах к северо-западу от Каира (Египет) [3, 436]. Согласно описанию 1892 года в долине Вади ан-Натрун насчитывалось 16 мелководных озер [437]. Однако на данный момент, в зависимости от времени, за исключением некоторого числа мелких водоемов, можно наблюдать от 6 до 8 крупных озер [436].

Озера Вади ан-Натрун питаются грунтовыми водами, источником которых является Нил. Максимальный уровень воды наблюдается в середине января. Интересной особенностью озер Вади ан-Натрун является то, что каждое из них обладает индивидуальными характеристиками и гидродинамическим режимом. Гиперсолеными данные озера становятся летом в связи с активным испарением воды. На протяжении всего лета их глубина редко превышает полметра, небольшие водоемы могут полностью пересыхать. Вода в разных озерах значительно отличается абсолютными концентрациями растворенных солей, которые могут варьироваться от 92 до 350 г/л. Несмотря на схожий качественный ионный состав вод (Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- и CO_3^{2-}), массовые доли растворенных солей в разных озерах могут варьироваться: NaCl – 36-78%, Na_2SO_4 – 9-27%, Na_2CO_3 – 3-37%. Температура воды также сильно изменяется и, согласно разным наблюдениям, может достигать 40-60°C днем и понижаться до 28°C ночью [3-4, 436].

Месбах и ее коллеги исследовали таксономическое разнообразие микробных сообществ вод и седиментов трех самых больших озер Вади ан-Натрун: Фазда (30% NaCl ; pH 9,3; растворенный кислород - 0,12 млн⁻¹) УмРиша (29,1% NaCl ; pH 9,8; растворенный кислород - 0,2 млн⁻¹) и Хамра (10% NaCl ; pH 8,5; растворенный кислород 4 млн⁻¹), посредством секвенирования генов 16S рРНК с использованием библиотек клонов. Бактериальная компонента микробных сообществ озер являлась довольно разнообразной – секвенирование около 1100 клонов позволило получить 769 высококачественных последовательностей 16S рРНК и выделить 345 OTU, которые были

идентифицированы как близкородственные организмы или непосредственные представители таких бактериальных групп, как грамположительные бактерии с низким GC-составом (от 11% до 39% бактериальной биоты воды и седиментов), *Alphaproteobacteria* (от 11% до 30%) и *Bacteroidetes* (от 10% до 37%). Археальная составляющая микробиоты озер Вади ан-Натрун отличалась меньшим разнообразием - в результате секвенирования 589 клонов было выделено 198 OTU близкородственных или идентичных различным представителям групп архей филума *Euryarchaeota* [438].

Наиболее многочисленными представителями бактериальной микробиоты седиментов и воды всех трех озер являлись альфапротеобактерии порядка *Rhodobacterales*, а также другие протеобактерии классов *Gammaproteobacteria* и *Deltaproteobacteria*. Альфапротеобактерии составляли от 22% до 27% бактериальных OTU седиментов и от 11% до 30% бактериальных OTU вод исследуемых озер. Анализ последовательностей генов 16S рРНК демонстрировал присутствие большого разнообразия бактерий, родственных представителям класса *Gammaproteobacteria* порядка *Chromatiales* (4 – 17% OTU седиментов и 8 – 30% OTU вод), в частности микроорганизмам родов *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira* и *Thiackalivibrio*, что соответствует результатам ранних микробиологических исследований этих озер, основанных на культивационных методах. OTU, родственные сульфатредуцирующим дельтапротеобактериям порядков *Desulfobacterales* и *Desulfovibrionales*, присутствовали в седиментах всех трех озер (3 – 10% OTU), а также воде озера Фазда (8%). OTU, идентичные или родственные представителям филума *Firmicutes*, также были широко представлены среди бактериальной микробиоты озер Вади ан-Натрун и составляли от 34% до 39% OTU седиментов и от 11% до 25% OTU вод озер Фазда, УмРиша и Хамра. Многие OTU филума *Firmicutes* были отнесены к порядкам *Halanaerobiales* и *Clostridiales*, представители которых характеризуются как анаэробные микроорганизмы. Около 15% OTU воды озера Хамра были отнесены к представителям филума *Firmicutes*, однако ни один из них не был классифицирован как представитель порядков *Halanaerobiales* и *Clostridiales*. Это

связано с тем фактом, что воды озера Хамра характеризуются значительно большим содержанием растворенного кислорода в сравнении с водами озер Фазда и УмРиша. Бактерии филума *Firmicutes* озера Хамра включали большое количество OTU, отнесенных к представителям порядка *Bacillales*, в частности рода *Bacillus*. OTU порядка *Bacillales* встречались также среди фирмикут двух других озер, однако представляли минорную группу бактерий этого филума. Бактерии филума *Bacteroidetes* представляли другую мажорную бактериальную группу микробиоты озер Вади ан-Натрун. На долю OTU, отнесенных к данному филуму, приходится от 10% до 23% OTU седиментов и от 15% до 37% OTU вод озер. Минорные бактериальные группы озер были представлены OTU, отнесенными к таким бактериальным филумам, как *Spirochaetes*, *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* и *Verrucomicrobia* [438].

Археальная биота озер Вади ан-Натрун была представлена большим многообразием родственных, но ранее неизвестных групп архей филума *Euryarchaeota*. 153 из 198 археальных OTU характеризовались крайне отдаленной связью с известными на тот момент культивируемыми и некультивируемыми археями. Последовательности 16S рНК 45 OTU были на 93 – 97% идентичны последовательностям культивируемых архей порядков *Halobacteriales* и *Methanosarcinales*. Образцы озера Хамра, как наименее соленого из исследуемых озер, демонстрировали полное отсутствие галоархеальных OTU [438].

1.4.5. Глубоководные гиперсоленые анаэробные бассейны

Несколько глубоководных гиперсоленых анаэробных бассейнов (ГГАБ) были обнаружены в Красном, Черном и Средиземном морях, а также в Мексиканском заливе [31-34, 36-38, 40, 439]. Образуются глубоководные гиперсоленые озера, как правило, вследствие контакта морской воды с выходами различных пород, например, эвапоритов, несущих большие количества растворимых минералов [9, 33, 41].

Низкое содержание растворенного кислорода обуславливается глубоководным залеганием гиперсоленых подводных озер, а также его плохой растворимостью в растворах с высоким содержанием минеральных солей.

Единственным путем поступления кислорода в глубоководные соленые бассейны является диффузия через границу раздела гиперсоленых пластов и пластов морской воды. Интересной особенностью гиперсоленых глубоководных озер является наличие нескольких несмешивающихся однородных водных пластов, обладающих уникальными комбинациями физико-химических характеристик: соленостью, плотностью, температурой, рН и содержанием растворенного кислорода. Химическая природа минералов, вымываемых морской водой в местах подобных контактов, сильно влияет на минеральный состав вод глубоководных гиперсоленых озер. В большинстве случаев воды глубоководных соленых озер характеризуются высоким содержанием NaCl, однако существуют исключения [31-33].

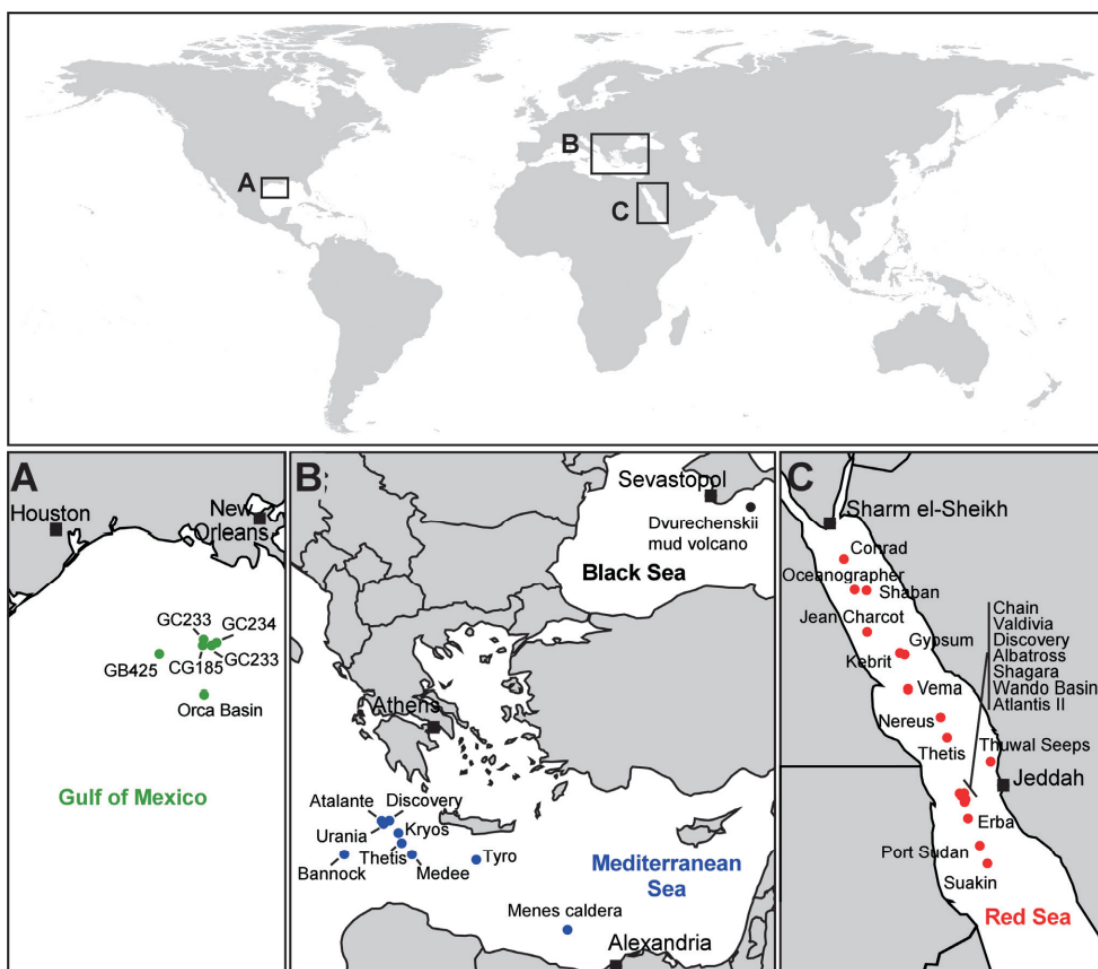


Рисунок 1.4. Локации наиболее изученных ГГАБов [33]. А) Мексиканский залив (зеленые точки); В) Средиземное море (синие точки) и Черное море (черные точки); С) Красное море (красные точки).

Ранние микробиологические исследования ГГАБов демонстрировали отсутствие живых организмов в таких экологических нишах, благодаря чему они длительное время считались стерильными. Однако дальнейшие исследования с применением химических и молекулярно-биологических методов свидетельствовали о том, что экосистемы ГГАБов весьма развиты и включают большое число видов бактерий, архей и эукариот. Результаты многочисленных геохимических исследований свидетельствовали о вероятном участии микроорганизмов в геохимических циклах ГГАБов, в частности, в процессах сульфат-редукции и окисления метана [441-442]. Химический анализ донных осадков ГГАБов демонстрировал наличие биогенных органических соединений – изопреноидных C_{40} -липидов, которые являются археальными биомаркерами, и хопаноидов, синтезируемых некоторыми бактериями. Исследование образцов вод и осадков ГГАБов посредством молекулярно-биологических методов способствовало открытию новых групп галофильных бактерий и архей [443-445]. Помимо многочисленных и разнообразных бактерий и архей, другими типичными представителями биоты ГГАБов являются многоклеточные эукариоты. Кишечнополостные, губки, круглые и многощетинковые черви, моллюски и членистоногие являются типичными представителями макрофауны ГГАБов и ассоциированных экосистем [446-450].

1.4.5.1. ГГАБы Красного моря

Самое большое скопление талассовых подводных гиперсоленых бескислородных бассейнов обнаружено в Красном море. Образованное в результате расхождения Африканской и Арабской тектонических плит, произошедшем в позднем олигоцене (28 – 32 млн. лет назад), Красное море обладает большим количеством глубоководных впадин. Постепенное выщелачивание ангидрит-галитовых эвапоритов эпохи миоцена, локальные взаимодействия вод с вулканическими породами и активные геотермальные процессы способствовали формированию в некоторых впадинах соленых бескислородных озер. Контакт слабощелочных вод Красного моря с пластами гиперсоленых вод подводных озер способствует постоянным процессам

локального осаждения солей тяжелых металлов, отложению обширных депозитов рудоносных седиментов на дне соленых бассейнов и обогащению их вод ионами различных металлов [31].

В соответствии с сейсмическим происхождением и геохимическим составом вод, бескислородные гиперсолёные бассейны Красного моря можно разделить на два типа. Бассейны I-го типа характеризуются высокой солёностью воды, низкими значениями pH (5,5 – 5,6) и умеренными значениями температуры (23,4 – 24,9°C), в воде содержатся концентрации растворенного сероводорода порядка 15 – 24 мл/л и следовые концентрации ионов тяжелых металлов. Геохимические характеристики бассейнов I-го типа полностью определяются процессами выщелачивания пород эвапоритов и седиментации донных отложений. Примерами глубоководных соленых бассейнов I-го типа являются впадина Океанографа и впадина Кебрит. Впадина Кебрит является самой маленькой из глубоководных впадин Красного моря с максимальной глубиной 1549 метров. Ее гиперсолёные воды характеризуются полным отсутствием кислорода, высокими кислотностью (pH 5,5) и солёностью (26%), а также температурой 23,3°C. Растворенные газы представлены экстремально большими количествами углекислого газа и сероводорода, в значительно меньших концентрациях присутствуют метан, этан и азот. Высокие концентрации растворенного в воде сероводорода способствуют накоплению массивных донных отложений различных сульфидов, представленных в основном пиритом и сфалеритом [41].

Гиперсолёные глубоководные бассейны II-го типа характеризуются высоким содержанием ионов Mg^{2+} (7 – 90 г/л) и ионов других металлов, что, вероятно, является следствием процессов выщелачивания эвапоритов и вулканических пород, а также активных геотермальных процессов, влияющих на химический состав их вод. Примерами гиперсолёных озер II-го типа являются впадины Конрад, Шабан и Нереус, располагающиеся в северном регионе Красного моря, а также другие многочисленные впадины центрального региона, к числу которых относятся Атлантис II, Дискавери, Чеин, Суакин и др. Впадина

Атлантис II - самый крупный подводный глубоководный бескислородный бассейн Красного моря. Впадина состоит из двух бассейнов: большого главного и маленького северного, соединенного посредством узкого канала с впадинами Дискавери и Чеин. Максимальная глубина впадины составляет 2194 метра. Главной особенностью впадины Атлантис II являются активные геотермальные процессы и, как следствие, высокая температура и регулярно изменяющиеся физико-химические характеристики среды. Толщина слоя гиперсоленых вод составляет порядка 200 метров. Гиперсоленый слой в свою очередь разделяется на несколько подслоев, характеризующихся скачкообразным увеличением солёности и температуры в направлении от верхнего подслоя к нижнему. Самый нижний придонный слой характеризуется солёностью 25,7%, значением pH 5,3 и температурами, вследствие высокой геотермальной активности, варьирующимися в диапазоне от 55,9 до 68,2°C. Основными компонентами газовой композиции данной впадины являются азот и метан, также присутствуют углекислый газ, этан и сероводород, но в значительно меньших количествах. На дне впадины Атлантис II обнаружены большие количества осадочных пород, богатых железом, медью, цинком и другими тяжелыми металлами. Впадина Суакин, сама южная из известных гиперсоленых бассейнов Красного моря, характеризуется температурой 23,5°C, солёностью 14,9% и значением pH 7,6 в нижнем слое. Значение кислотности воды, близкое к нейтральному, и довольно низкая солёность, вероятно, говорят о возможных процессах частичного смешения гиперсоленых слоев впадины с морской водой. Впадина Шабан имеет максимальную глубину 1540 метров, в то время как граница раздела гиперсоленых слоев и морской воды располагается на глубине 1325 метров. Воды впадины имеют значение pH 6,0 и температуру 23°C, а также характеризуются полным отсутствием кислорода и сероводорода. Абсолютная концентрация растворенных солей, в зависимости от местоположения, варьируется в диапазоне 25,6 - 26,1%. На дне имеются отложения сульфидов, представленные главным образом пиритом и марказитом [33, 41].

В большинстве ГГАБов Красного моря доминирующим компонентом микробных сообществ разных пластов воды являются бактерии. Исключение составляют впадины Атлантис II и Кебрит, характеризующиеся бóльшим содержанием растворенного кислорода, в 4 – 9 раз превышающим другие ГГАБы Красного моря. Относительно высокое содержание кислорода в воде этих впадин может способствовать активному росту популяций аммоний-окисляющих архей. Секвенирование 16S рРНК последовательностей микроорганизмов различных ГГАБов Красного моря способствовало выявлению ОТЕ, от 64% (впадина Эрба) до 99% (впадины Атлантис II и Дискавери) которых были отнесены к представителям археального филума *Thaumarchaeota*. Порядка 98% археальных популяций границы раздела слоев морской воды и рапы приходится на долю единственного филотипа галофильной аммоний-окисляющей археи рода *Nitrosopumilus*. Примечательно, что данный филотип не наблюдался при анализе образцов, отобранных в других морских экосистемах; это свидетельствует об узкой приспособленности данного микроорганизма к условиям ГГАБов [31-33, 451].

Бактериальные OTU разных ГГАБов Красного моря в большинстве своем были отнесены к филумам *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Deferribacteres* и *Chloroflexi*. Типичными представителями бактериальной компоненты микробных сообществ впадин Атлантис II и Дискавери являются бактерии, принадлежащие родам *Moritella* и *Marinomonas* (класс *Gammaproteobacteria*), роду *Sulfurimonas* (класс *Epsilonproteobacteria*), классу *Nitrospina* (филум *Nitrospinae*, клада *Nitrospinae/Tectomicrobia*), роду *Planctomyces* (филум *Planctomycetes*, клада PVC), филуму *Deferribacteres* и кладе KB1. Во впадинах Кебрит, Эрба и Нерееус на границе раздела слоев морской воды и рапы доминирующими микроорганизмами являются дельтапротеобактерии семейств *Desulfohalobiaceae* и *Desulfobacteraceae*. Типичными представителями биоты глубинных слоев рапы и осадков ГГАБов Красного моря являются бактерии клады KB1 [31-33, 451].

1.4.5.2. ГГАБы Средиземного моря

Наиболее глубоко залегающие подводные гиперсолёные бескислородные бассейны располагаются на глубине более трех километров в Средиземном море. Комплекс средиземноморских глубоководных озёр, состоящих из бассейнов Баннок, Медея, Тиро, Криос, Тетис, Урания, Дискавери и Л'Аталанте, базируется на аккреционном клине Средиземноморского хребта [33, 451]. Данная группа озёр сформировалась в результате выщелачивания морской водой эвапоритов, образованных в период Мессинского пика солёности, произошедшего в миоцене 5,96 – 5,33 млн. Мессинский пик солёности – геологическое событие, произошедшее в результате изоляции Средиземного моря от Атлантического океана, что привело к его частичному испарению. Увеличение солёности Средиземного моря и, как следствие, последовательное выпадение ряда минеральных солей, способствовало формированию на дне Средиземного моря обширных (1,5 – 3 км толщиной) пластов эвапоритовых пород. В связи с поднятием уровня мирового океана, произошедшим в плиоцене, связь Средиземного моря с Атлантическим океаном была восстановлена, что привело к частичному растворению образовавшихся эвапоритовых отложений вновь прибывшей водой. Верхние слои мессинских отложений образованы галитом, карналитом, бишофитом, гипсом и ангидритом, а также иными солями магния и калия, что способствовало их первоочередному растворению. Различные карбонаты, такие как доломит и кальцит, плохо растворимые в условиях высокой солёности и выпавшие в самом начале Мессинского пика солёности, остались заключены в недоступных нижних слоях эвапоритовых отложений [4, 20, 451-452].

Абсолютное содержание растворённых солей в водах данных озёр может варьироваться от 9,5%, характерных для бассейна Дискавери, до 36,5%, наблюдаемых у вод бассейна л'Аталанте. Концентрации ионов Na^+ также значительно различаются у вод разных озёр: от самой низкой в бассейне Дискавери (0,068 М) до самой высокой в бассейне Тиро (5,3 М). Измерение содержания ионов Mg^{2+} демонстрирует кардинально противоположную картину: воды бассейна Дискавери имеют самые высокие концентрации ионов магния (5

М), в то время как воды бассейна Тиро содержат количество магния (0,071 М), минимальное среди всех известных средиземноморских гиперсоленых глубоководных озер. Концентрации растворенного в воде сероводорода варьируются в диапазоне от 0,007 до 0,015 М (бассейны Дискавери и Урания соответственно). Среди средиземноморских глубоководных гиперсоленых бескислородных озер имеются примеры как талассовых, так и аталассовых сред обитания. Бассейны Баннок, Урания, Тетис, Тиро и Медея характеризуются соотношением неорганических ионов, аналогичным морской воде, что говорит об их талассовой природе. Воды бассейнов Дискавери и Криос имеют высокие концентрации ионов магния и кальция и низкие концентрации ионов натрия, калия и сульфат-ионов, чем значительно отличаются от морской воды и являются аталассовыми [20, 31, 34, 38, 451].

Микробное сообщество впадины Тетис, являющейся талассовым ГГАБ, представлено галоархеями семейства *Halobacteriaceae*, а также бактериями филумов *Planctomycetes*, *Bacteroidetes*, класса *Deltaproteobacteria* и клады КВ1. Максимальная плотность галоархей семейства *Halobacteriaceae* наблюдается в верхних слоях границы раздела морской воды и рапы ГГАБ с соленостью 11%. Поскольку эти археи являются аэробными гетеротрофами, они не способны расти в более высоких слоях морской воды с низкой соленостью и в более глубоких бескислородных слоях рапы. Эти слои воды также населены популяциями умеренно галофильных бактерий филумов *Planctomycetes* и *Bacteroidetes*. Бактерии клады КВ1 населяют все водные слои впадины Тетис, вплоть до слоя донных осадков. Другими типичными представителями микробиоты впадины Тетис являются сульфатредуцирующие дельтапротеобактерии, о чем свидетельствует высокое содержание сульфид-ионов в воде этого ГГАБ [453].

Микробные популяции талассовых ГГАБов Баннок и л'Аталанте включают аммоний-окисляющих архей филума *Thaumarchaeota*, сульфатредуцирующих бактерий класса *Deltaproteobacteria* и сероокисляющих бактерий классов *Gamma*proteobacteria и *Epsilon*proteobacteria. Бактерии клады КВ1 также

являются типичными и многочисленными представителями микробиоты этих ГГАБов [454-455].

Мажорной составляющей биоты впадины Урания помимо сульфатредуцирующих и сероокисляющих бактерий являются археи-метаногены, о чем свидетельствуют активные процессы метаногенеза и окисления и восстановления различных соединений серы [456-457].

Доминирующими представителями бактериальной составляющей биоты аталассовых ГГАБов Средиземного моря – впадин Дискавери и Криос - являются бактерии клады КВ1, населяющие все слои водного тела этих глубоководных бассейнов. Помимо доминирующих групп бактерий клады КВ1 и класса *Deltaproteobacteria*, биота впадины Дискавери включает минорные популяции бактерий классов *Gammaroteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Sphingobacteria* и архей класса *Halobacteria*. Дельтапротеобактерии родов *Desulfotignum* и *Desulfosalsimonas* являются доминирующими микроорганизмами в слоях с низкой соленостью впадины Криос. Гиперсоленые слои этой впадины населены неклассифицированными на данный момент представителями класса *Deltaproteobacteria*. Типичными археальными представителями биоты водных слоев, находящихся на границе раздела фаз морской воды и рапы ГГАБ, являются археи филумов *Thaumarcheota* и *Euryarcheota* [452, 458-459].

1.5. Морфология, специфика строения, компоненты и уникальные БАВ клеток галофилов

Клетки галофильных микроорганизмов характеризуются большим разнообразием форм и размеров. Клетки разных видов галоархей могут быть палочковидными или кокковидными, или обладать нетривиальными формами, такими как плоские дискообразные, треугольные, ромбовидные, квадратные и прямоугольные, объемные многогранные разной геометрии [3, 172]. Многим галоархеям характерно изменение геометрии клеток в процессе их жизненного цикла или в зависимости от условий окружающей среды. Археи рода *Halococcus* начинают свой жизненный цикл в виде аморфного многоклеточного образования, которое в результате многократных делений структурируется, а клетки

приобретают кубовидную форму. На следующем этапе жизненного цикла многоклеточное образование распадается, клетки *Halococcus* удлиняются и приобретают подвижность [460]. Клетки галоархеи *Halorubrum distributum* могут быть обнаружены в одном из четырех морфологических состояний: одиночные палочковидные клетки с тонкой клеточной стенкой (~10 нм), одиночные палочковидные клетки с толстыми клеточными стенками (до 50 нм), круглые одиночные клетки с многослойной клеточной стенкой, общая толщина слоев которой может достигать 200 нм, а также клеточные агрегаты, покрытые общей оболочкой [461]. Галофильные бактерии обладают тем же многообразием морфологических характеристик, свойственным мезофильным бактериям (см. раздел 1.3.2).

Геометрия клетки в первую очередь определяется свойствами ее клеточной стенки. Основным формообразующим фактором галобактериальных клеток является S-слой – слой гликопротеинов, покрывающий всю поверхность клетки [462]. У некоторых галоархей S-слой бывает многослойным. S-слой стабилизируется ионами Na^+ и Mg^{2+} , высокие концентрации которых характерны большинству гиперсоленых сред. Отсутствие этих ионов в ростовой среде способствует разрушению S-слоя и образованию галобактериальных сферопласт – клеток сферической формы, лишенных гликопротеиновой оболочки [3]. Клеточные стенки некоторых галобактерий, помимо S-слоя, включают слизистые гетерополисахаридные капсулы. Представители семейства *Halococcus* лишены S-слоя, их клеточная стенка образована лишь слоем гетерополисахарида [462].

Клеточная стенка галофильных бактерий часто аналогична стенке мезофильных представителей их таксономической группы. Клеточная оболочка грамположительных бактерий представлена цитоплазматической мембраной и толстым слоем пептидогликана, между которыми находится периплазматическое пространство. Грамотрицательные бактерии характеризуются наличием двойной мембраны – внутренней цитоплазматической и внешней, между которыми находится тонкий слой пептидогликана и периплазматическое пространство. Внешняя мембрана грамотрицательных бактерий также несет липополисахариды.

Гликопротеиновый S-слой обнаружен у некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий. В случае грамположительных бактерий S-белки крепятся к пептидогликановой оболочке клетки, в то время как у грамотрицательных бактерий S-слой ассоциирован с внешней мембраной клетки [463]. Многие галофильные бактерии также являются продуцентами экзополисахаридов. Экзопполисахариды галофильных бактерий являются сильно сульфатированными кислыми или нейтральными гетерополимерами, продуцируемыми с целью создания благоприятного микроокружения клеток, способствующего защите от воздействия экстремального осмотического давления, рН и высыхания [464].

Уникальной особенностью некоторых галоархей, которая была случайным образом обнаружена в клетках *Hbt. salinarum*, является наличие у них ассоциированных с цитоплазматической мембраной фиброкристаллических тел, которая является гексагональным образованием, сформированным полыми белковыми трубками [465-466]. Белок, формирующий данные трубки, демонстрирует большое сходство с тубулинами эукариот. Результаты геномного анализа *Hbt. salinarum* свидетельствуют о наличии у данной галобактерии другого гена, продукт которого аналогичен эукариотическому белку, принимающему участие в формировании цитоскелета [467]. Присутствие данных генов у *Hbt. salinarum*, а также тот факт, что обработка галобактериальных клеток антитубулиновыми препаратами способствуют изменению клеточной морфологии и потере способности к делению, свидетельствуют о наличии у данной и некоторых других галоархей некоего подобия цитоскелета, участвующего в установлении и поддержании формы клеток, а также в процессе деления [466, 468].

Многие археи класса *Halobacteria* имеют подвижные, благодаря наличию жгутиков, клетки [171]. Археальные жгутики имеют геометрию правозакрученной спирали [469]. Флагеллины, образующие жгутики, являются сильно сульфатированными гликопротеинами и характеризуются высоким сходством с некоторыми гликопротеинами клеточной стенки галобактерий [470]. Число и

расположение жгутиков галобактерий может варьироваться в зависимости от фазы клеточного цикла. Клетки *Halobacterium salinarum* в экспоненциальной фазе роста являются преимущественно монополярными и несут жгутики лишь на одном конце клетки. В стационарной фазе роста клетки *Hbt. salinarum* становятся биполярными [469]. Наличие жгутиков также широко распространено среди бактерий-экстремофилов (см. раздел 1.3.2).

Цитоплазматическая мембрана галоархей образована липидами археального типа – глицеридами полиразветвленных жирных кислот: фитановой (C_{20}) и сестертерпановой кислоты (C_{25}). Полярные липиды архей семейства *Halobacteriaceae* в основном являются производными 2,3-ди-О-фитанилглицерина ($C_{20}C_{20}$ -липидами). Цитоплазматические мембраны некоторых археальных видов, в особенности алкалофильных, также несут разные количества липидов-производных 2-О-сестертерпанил-3-О-фитанилглицеринов ($C_{25}C_{20}$ -липиды). Минорным компонентом липидной фракции археальных клеточных мембран могут являться липиды-производные 2,3-ди-О-сестертерпанилглицерина ($C_{25}C_{25}$ -липиды) [471-475]. В большинстве случаев гидрофобные цепи липидов являются полностью насыщенными, однако липиды галофильных психрофилов, обитающих в холодных гиперсоленых ценозах Антарктики, могут нести радикалы ненасыщенной фитановой кислоты [476]. Липиды некоторых галоархей могут нести ненасыщенные и гидроксильные остатки фитановой и сестертерпановой кислот [477].

Мембраны архей семейства *Halobacteriaceae* содержат разнообразные фосфо-, сульфо- и гликолипиды, которые составляют более 90% их липидной фракции. У всех представителей данного семейства в составе мембран обнаружены фосфатидилглицерин (ФГ) и метиловый эфир фосфатидилглицерофосфата (Me-ФГФ). Нейтрофильные археи семейства имеют мембраны, образованные совокупностью ФГ, Me-ФГФ и фосфатидилглицеросульфатом (ФГС). Характерной особенностью галофильных и алкалофильных представителей семейства *Halobacteriaceae* является отсутствие ФГС в их цитоплазматических мембранах. Характерным компонентом пурпурных

мембран галобактерий является археальный аналог кардиолипина – 2,3-ди-О-фитанил-1-фосфоглицерин-3-фосфо-2,3-ди-О-фитанилглицерин. Гликолипиды архей отряда *Halobacteriales* представлены липидами, оснащенными ди-, три- и тетрагликозил-радикалами, образованными остатками глюкозы, маннозы, галактозы и галактофуранозы, которые в свою очередь также могут нести сульфатные группы. До 10% липидной фракции мембран галоархей представлено неполярными липидами: каротиноидами, нейтральными фитанилглицеридами хинонами (в основном менахинонами), C₂₀- и C₃₀-изопреноидами и индолом. Неразветвленные жирные кислоты также присутствуют в галоабактериальных мембранах. Не полиразветвленные жирные кислоты не принимают участия в образовании липидов, однако используются для ацетилирования трансмембранных белков, что усиливает гидрофобность их внутримембранных участков и стабилизирует мембрану посредством белок-липидных взаимодействий [478].

Бактерии-экстремофилы адаптируют свои цитоплазматические мембраны к экстремальным воздействиям окружающей среды посредством непосредственного изменения их липидного состава, а также при помощи варьирования химической структуры гидрофобных радикалов липидов. Основными фосфолипидами бактериальных мембран являются фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЕ). К минорным компонентам бактериальной клеточной мембраны относятся кардиолипин (КЛ) и гликолипиды. Увеличение солености окружающей среды способствует увеличению доли ФХ и снижению доли ФЕ. Это связано с различающейся способностью разных фосфоглицеридов формировать стабильный липидный бислой. Благодаря наличию в своей молекуле остатка ненасыщенной жирной кислоты, ФЕ оказывает дестабилизирующее воздействие на цитоплазматическую мембрану, в то время как другие фосфоглицериды формируют стабильный и упорядоченный бислой. Высокая соленость окружающей среды также оказывает дестабилизирующее влияние на цитоплазматическую мембрану, в результате чего активируются внутриклеточные механизмы биосинтеза ФХ, липидный состав смещается в сторону преобладания

данного фосфолипида, что способствует стабилизации мембраны. Грамположительные бактерии в ответ на увеличение солености окружающей среды наравне с ФХ индуцируют активный биосинтез КЛ. Также, в ответ на увеличение осмолярности окружающей среды наблюдается изменение жирнокислотного состава липидов бактериальных мембран. Как правило, гидрофобные радикалы мембранных липидов представлены остатками насыщенной и мононенасыщенной кислот. Минорным компонентом жирнокислотного состава бактериальных липидов являются жирные кислоты с разветвленными радикалами. Увеличение солености окружающей среды способствует снижению содержания остатков разветвленных жирных кислот и увеличению содержания остатков циклопропановых жирных кислот. Циклопропановые жирные кислоты являются результатом модификации мононенасыщенных жирных кислот посредством метилирования одного из углеродных атомов углеводородного радикала, образующих двойную связь, что приводит к формированию циклопропанового кольца и, как следствие, увеличению ригидности радикала [479-482].

Одним из первых обнаруженных у галоархей клеточных включений являются газовые везикулы – пустотелые наполненные газом белковые органеллы цилиндрической или веретеновидной формы [3, 483-484]. Газовые везикулы являются высокостабильными органеллами, сохраняющими целостность при экстремальных соленостях, рН, в присутствии ПАВ, органических растворителей и протеолитических ферментов [485-487]. Данные органеллы формируются посредством самосборки из сильно гидрофобного белка (GvpA, 8 кДа), агрегирующегося в плотно закрученную спираль. Гены этого белка обнаружены у многих прокариот, характеризующихся способностью образовывать газовые везикулы, и являются высоко консервативными. Белок GvpC (42 кДа) является вторым структурным компонентом газовых везикул и участвует в их формировании и стабилизации. Главная функция газовых везикул заключается в обеспечении способности галобактериальных клеток к вертикальному перемещению в толще воды. Данная способность обеспечивает конкурентное

преимущество галобактериям в условиях стоячих гиперсоленых водоемов, где без интенсивного перемешивания кислород в необходимых количествах присутствует лишь в верхних водных слоях. О важности газовых везикул как адаптационного механизма также свидетельствует высокая копияность генов, чьи продукты опосредуют процесс их формирования. Как известно, геном галобактерий фрагментирован и представлен главной хромосомой и несколькими мегаплазмидами. Кластеры генов газовых везикул присутствуют как в мегаплазмидах, так и в хромосоме. Несмотря на высокую копияность генов газовых везикул, утрата способности к их формированию является нередким явлением среди галобактерий. Это связано с тем фактом, что в управлении аппаратом биосинтеза везикул принимает участие от 13 до 14 белков, что, ввиду нестабильности галоархеальных геномов, в значительной степени повышает вероятность его инактивации из-за спонтанной мутации в одном из их генов. Газовые везикулы также были обнаружены у галофильных бактерий, однако данные органеллы редко встречаются у представителей данной группы микроорганизмов [484].

Другими включениями, часто обнаруживаемыми в клетках многих галофилов, являются гранулы ПГА, которые в больших количествах синтезируются галоархеями и галофильными бактериями в качестве запасных веществ в условиях избытка источника углерода и лимитирования по другим биогенным элементам, например, фосфору [488-490].

Многие галофильные и галотолерантные бактерии семейств *Clostridiaceae* и *Bacillaceae* являются спорообразующими микроорганизмами, обладающими способностью формировать эндоспоры в неблагоприятных для жизни условиях (см. раздел 1.3.2). У галоархей каких-либо «спящих» форм типа спор или цист на сегодняшний день обнаружено не было [3].

1.6. Адаптивные системы и механизмы

Галофильные микроорганизмы являются полиэкстремофильными и в процессе своей жизнедеятельности подвергаются регулярным экстремальным биопатогенным воздействиям. Главным биопатогенным фактором гиперсоленых

сред является их экстремальная соленость. Низкая активность воды, экстремальная осмолярность и молярные концентрации неорганических ионов являются типичными характеристиками гиперсоленых экосистем. Другими неблагоприятными факторами соленых сред часто являются экстремальные температуры, негативно сказывающиеся на стабильности биомолекул, а также интенсивное солнечное излучение, УФ-компонента которого не только оказывает негативное воздействие на внутриклеточные компоненты, но и индуцирует каскад фотохимических и радикальных реакций вне и внутри клетки, результатом которых являются масштабные повреждения клеточных систем и накопление реакционно активных высоко токсичных соединений (см. разделы 1.1.4 и 1.1.5).

Комплексное воздействие перечисленных биопатогенных факторов является смертельным для клеток мезофильных микроорганизмов. Однако галофильные микроорганизмы способны длительное время оставаться интактными, активными и нормально функционировать в подобных условиях. Исключительная жизнеспособность галофилов обусловлена множеством разнообразных адаптаций клеточных компонентов и метаболизма, а также наличием и высокой эффективностью функционирования защитных и репарационных систем клетки, выработанных этими уникальными микроорганизмами в процессе эволюции.

1.6.1. Устройство клеточной стенки.

Первым рубежом защиты клеток экстремофильных микроорганизмов от пагубных воздействий окружающей среды является их клеточная оболочка. Клеточная оболочка микроорганизмов имеет многослойное строение и состоит из цитоплазматической мембраны и внешней клеточной стенки, образованной различными соединениями: белками, гликопротеинами, пептидогликанами, полисахаридами и др. [462-463]. Физико-химические свойства цитоплазматической мембраны во многом зависят от температуры и кислотности окружающей среды. Так, подавляющее большинство адаптационных модификаций мембран бактериальных, археальных и эукариотических клеток направлены на приспособление к экстремальным температурам и значениям pH

[471-482]. Однако в условиях низкой активности воды и сильного осмотического стрессирования ввиду экстремальной солености и регулярного высыхания, характерных для большинства гиперсоленых ценозов, решающую роль играют особенности строения клеточной стенки.

Типичными, а зачастую единственными обитателями гиперсоленых экосистем являются галофильные археи. Для большинства экстремофильных архей характерно двуслойное строение клеточной оболочки, подразумевающее наличие S-слоя и цитоплазматической мембраны. S-слой архей - 2-D псевдо кристаллическая структура, характеризующаяся дальним порядком симметрии и состоящая из молекул белка или гликопротеина. S-слой обычно представлен однотипными индивидуальными или группирующимися по две, три, четыре или шесть молекулами. Индивидуальные молекулы и их кластеры образуют подобие элементарной ячейки кристаллической решетки, число молекул в которой соответствует порядку симметрии: одна молекула белка (гликопротеина) образует p1-симметричную решетку, две молекулы – p2-симметричную решетку и тд. Разный порядок симметрии S-слоя, а также расстояние между геометрическими центрами элементарных ячеек его кристаллической решетки являются индивидуальными для каждого вида архей. Белки S-слоя крепятся к цитоплазматической мембране посредством трансмембранного домена и поддерживаются на некотором удалении от нее при помощи «стебельковой» структуры, формируя подобие периплазматического пространства клетки. В зависимости от видовой принадлежности археи, массы молекул протеинов S-слоя варьируются в диапазоне 40 – 325 кДа, а расстояние между геометрическими центрами ячеек кристаллической решетки S-слоя может составлять от 11 до 36 нм [462].

Наиболее изученным белком поверхностного слоя клеточной стенки микроорганизма, на примере которого можно рассмотреть их общее строение белков археального S-слоя, являются гликопротеин галоархеи *Halobacterium salinarum* [491]. Впервые белки S-слоя *Halobacterium salinarum* (ранее *Halobacterium halobium*) были обнаружены в 1956 году: в процессе электронной

микроскопии клеток на их поверхности наблюдались однообразные образования, формировавшие гексагональные структуры [483]. Дальнейшее подробное изучение данных белков посредством рентгенографического анализа и электронной микроскопии в совокупности с применением химических методов анализа структурных особенностей белковых молекул позволили произвести реконструкцию их пространственной структуры. S-слой *Halobacterium salinarum* образован кластерами, состоящими из 6 молекул гликопротеина, образующими куполообразную структуру высотой 4,5 нм с круглой порой по центру [492 – 496]. В молекуле белка S-слоя можно выделить три домена: N-концевой домен, C-концевой домен и O-гликозилированный домен. N-концевые домены белков участвуют в образовании куполообразных структур S-слоя. O-гликозилированный домен обогащен остатками треонина и формирует шестинанометровый «стебелек», поддерживающий N-концевой домен. C-концевой домен является трансмембранным и обеспечивает крепление белков S-слоя к цитоплазматической мембране [497]. Ассоциирование отдельных молекул поверхностных пептидогликанов друг с другом осуществляется, благодаря наличию SLH-доменов (S-layer homology) в N-концевом домене молекулы, связывающимся либо непосредственно с другим гликопротеином, либо с пирувиллированным остатком сахара, ковалентно с ним связанным [498].

Белки S-слоя синтезируются внутри клетки в прекурсорной форме, несущей дополнительную N-концевую аминокислотную последовательность, отсутствующую у зрелых белков. Прекурсор поверхностного гликопротеина *Halobacterium salinarum* синтезируется с дополнительной сигнальной последовательностью длиной в 34 аминокислотных остатка. Сигнальные пептиды аналогичного длины и состава были обнаружены и у других галоархей, в частности *Haloferax volcanii* и *Haloarcula japonica* [499]. Подробное изучение таких N-концевых последовательностей позволило выявить их схожесть с сигнальными пептидами, свойственными бактериальным и эукариотическим клеткам. У бактерий обнаружено по меньшей мере три разные сигнальные пептидазы: SPI (Signal peptidase I), SPII (Signal peptidase II) и TFPP (type IV

prepilin peptidase). У архей были выявлены только две сигнальные пептидазы: SPI, ген которой относится к генам «домашнего хозяйства», осуществляющая удаление сигнальных последовательностей большинства экспрессируемых клеткой белков, и TFPP, ответственная за удаления сигнальных пептидов молекул пилинов IV типа. В биосинтезе белков S-слоя непосредственное участие принимает SPI протеиназа, сопряженная с Sec-механизмом белковой секреции [500].

Зрелые поверхностные белки клеток *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii* и *Haloarcula japonica* образованы 818 (86,5 кДа), 794 (81,7 кДа) и 828 (87,2 кДа) аминокислотными остатками соответственно. Белки данных микроорганизмов стабильны только в условиях высоких концентраций NaCl в окружающей среде. Значительное снижение осмолярности среды обитания ведет к дестабилизации и денатурированию белков S-слоя, что в результате приводит к лизису клеток. Помимо больших количеств NaCl в окружающей среде, галофильные микроорганизмы часто чувствительны к нехватке ионов магния или других двухвалентных ионов, которые также обеспечивают стабилизацию белков S-слоя клеточной стенки [3, 491]. Стабилизация поверхностных гликопротеинов осуществляется посредством совместного хелатирования двухвалентных ионов металлов заряженными остатками сахаров в составе их гликанов и таковых в составе головных групп липополисахаридов [498]. Отсутствие двухвалентных ионов в среде, даже при наличии высоких концентраций растворенного хлорида натрия, способствует снижению стабильности S-слоя клеточной стенки с его последующим разрушением. Лишенные поверхностного слоя клетки теряют свою геометрию и формируют сферопласты [3].

Поверхностный слой клеточной стенки многих экстремофильных (в частности, галофильных) архей образован молекулами сильно гликозилированных белков. Сахара составляют порядка 10 – 12% массы молекулы гликопротеина *Halobacterium salinarum* [3, 491]. Белки S-слоя всех микроорганизмов претерпевают как N-, так и O-гликозилирование, однако белкам разных археальных и бактериальных видов свойственны индивидуальные

паттерны гликозилирования. О механизме О-гликозилирования у архей на сегодняшний день известно мало: оно осуществляется в цитоплазме клетки, где специфичные О-гликозилтрансферазы производят гликозилирование молекулами галактопиранозил-глюкозы гидроксильных групп боковых радикалов остатков серина и треонина [501].

Механизм N-гликозилирования архей во многом идентичен таковому у эукариот. Процесс гликозилирования начинается со сборки олигосахарида на фосфополипrenoльном носителе на внутренней стороне цитоплазматической мембраны. Подобно эукариотам, археи используют долихолы в качестве мембранного носителя молекул сахаров. Синтез олигосахарида осуществляется из нуклеотидфосфатсахаров или долихолфосфатсахаров посредством специфических гликозилтрансфераз. По окончании синтеза связанный с долихолом N-гликан транспортируется на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны, откуда затем переносится олигосахаридтрансферазой на специфичную пептидную последовательность [502].

Механизм N-гликозилирования белков поверхностного слоя клеточной стенки хорошо изучен у галофильных архей вида *Haloferax volcanii*. Секвенирование и последующий анализ полного генома *Hfx. volcanii* позволило выявить гены белков архей, ответственные за посттрансляционное N-гликозилирование. *agl* гены (archaeal glycosylation) позднее также были выявлены и у других представителей царства архей. *agl* гены *Hfx. volcanii* были аннотированы на основе гомологичных генов бактерий и эукариот. Данная группа генов включает гены гликозилтрансфераз *aglJ*, *aglG*, *aglI*, *aglE*, и *aglD*, ответственные за биосинтез пентасахарида, представляющего последовательно соединенные гексозу, два остатка гексурановой кислоты, молекулу метилового эфира гексурановой кислоты и концевую молекулу гексозы. Ген *aglB* кодирует олигосахаридтрансферазу, осуществляющую перенос пентасахарида на боковые цепи остатков аспарагина белков S-слоя. Также в группу *agl* генов входят гены *aglF*, *aglM* и *aglP*, чьи функции на данный момент ясны не полностью, но считается что они принимают участие в синтезе олигосахарида. Флиппаза,

осуществляющая перенос пентасахарида через цитоплазматическую мембрану клетки, неизвестна [491, 500, 503-504].

Предполагается, что гликопротеины S-слоя могут выполнять множество разнообразных функций, однако не все из их потенциальных функций подтверждены экспериментально. В соответствии различными умозрительными теориями, белки S-слоя могут служить для создания псевдо перимплазматического пространства около мембраны, лучшей адгезии к поверхностям или в качестве защиты от механических и фаговых частиц, являются фаговыми рецепторами или патогенными факторами, обеспечивают захват органических и неорганических ионов из окружающей среды [491]. Однако, основываясь на имеющихся экспериментальных данных, можно с уверенностью сказать, что состав и структура гликанов белков S-слоя сильно зависят от условий окружающей среды. На сегодняшний день известны состав и структура N-гликанов множества представителей *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota*. Гликаны археальных S-белков характеризуются значительно большим разнообразием как структур, так и моносахаридного состава, по сравнению с таковыми бактериального или эукариотического происхождения. Археальные гликаны могут быть линейными или разветвленными и состоять из остатков различных сахаров: глюкозы, маннозы, рамнозы, глюкуроновой, галактурановой и идуроновой кислот, галактофуранозы, сульфохинозовы, N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина. Также, некоторые сахара могут подвергаться дополнительной модификации метилированием, сульфатированием или лигированием остатками треонина. Так, разветвленные гликаны наблюдаются в основном у термофильных микроорганизмов. S-белки термофилов также в значительно большей степени гликозилированы. S-слой галофильных архей, таких как *Halobacterium salinarum*, состоит из белков, гликозилированных сильно сульфатированными сахарами, что создает отрицательный поверхностный заряд клетки, способствует хелатированию катионов и, как следствие, нивелированию негативных воздействий высоких осмолярности или pH окружающей среды [505].

Помимо гликозилирования различных сайтов молекулы археальные S-белки могут подвергаться иным пост-трансляционным модификациям. В результате исследования биосинтеза поверхностных гликопротеинов *Haloferax volcanii* было установлено, что молекула незрелого белка обладает меньшей молекулярной массой и в меньшей степени гидрофобна, чем ее зрелый аналог. В процессе пост-трансляционных модификаций S-белки *Haloferax volcanii*, наряду с гликозилированием, претерпевают изопренилирование остатками мавалоновой кислоты. Похожий процесс липидирования поверхностных белков свойственен и *Halobacterium salinarum*, чьи гликопротеины лигируются остатками дифитанилглицерофосфата [499, 506].

Экстремально галофильная архея *Haloquadratum walsbyi* в некоторых случаях окружает свои клетки двойным S-слоем [507]. Иной эксклюзивной чертой *Haloquadratum walsbyi*, упоминавшейся ранее, является его способность продуцировать галомуцины [81]. Галомуцин является одним из самых крупных археальных белков. Как уже обсуждалось, белки архей экспрессируются во внеклеточное пространство в виде несвернутой пептидной цепи посредством системы мембранных Sec-пор. Ввиду того, что транспорт пептида длиной 290 аминокислот в среднем занимает около одной минуты и требует гидролиза порядка 6 молекул АТФ (одна молекула АТФ на каждые 50 аминокислотных остатков), экспрессия галомуцина штамма *Haloquadratum walsbyi* HBSQ001, чья длина составляет 9159 аминокислотных остатков, занимает у археальной клетки, по меньшей мере, 34 минуты и расходует 183 молекулы АТФ [508-509]. Несмотря на то, что биосинтез и экспрессия галомуцина требует много времени, вещества и энергии, вероятно, достаточно лишь нескольких подобных белков для обеспечения защиты клетки от стрессорных воздействий окружающей среды. Анализ последовательности галомуцина выявляет многочисленные сайты N-гликозилирования и сульфатирования (около 280 потенциальных сайтов). Дополнительно отрицательный заряд галомуцина может усиливаться посредством его пост-трансляционной модификации остатками сиаловой кислоты – гены белков гомологичных эукариотическим *neuA* и *neuB* ответственных за ее

биосинтез также были обнаружены в геноме *Haloquadratum walsbyi*. Большое количество сульфатных групп и гликанов на поверхности молекулы галомуцина способствуют его отрицательному заряду и экспонированию в окружающую среду многочисленных гидроксильных групп. Отрицательный поверхностный заряд и многочисленные гидроксильные группы необходимы для связывания катионов и молекул воды. Гидратная оболочка, окружающая клетку, создает область с большей относительно окружающей среды активностью воды, что позволяет *Haloquadratum walsbyi* переносить экстремальную осмолярность и выживать в водных средах с молярными концентрациями хаотропных ионов, губительных даже для большинства экстремально галофильных архей. Также этому способствует отрицательный заряд молекул галомуреина: хелатирование ионов металлов позволяет создавать вокруг клетки область с повышенным положительным зарядом и предотвращает активный приток катионов. Помимо описанного галомуцина, *Haloquadratum walsbyi* имеет два аналогичных белка меньшей массы, кодируемые генами *hmu2* и *hmu3*, а также четырнадцать гомологов гликопротенинов, вероятно, принимающих непосредственное участие в образовании S-слоя стенок клеток этой галоархеи [81, 508].

Также в результате геномного анализа *Haloquadratum walsbyi* были выявлены гены, гомологичные генам бактериального синтетического аппарата CapBCA, отвечающего за биосинтез поли- γ -глутаминовой кислоты. Бактерии осуществляют синтез данного анионного гелеобразного полимера с целью окружения своих клеток капсидом. Наличие у *Haloquadratum walsbyi* данного синтетического аппарата предполагает аналогичную возможность [81].

Различные полимерные субстанции, которыми галофильные микроорганизмы укрывают свои клетки в дополнение или вместо образования S-слоя, довольно широко распространены у архей. Так, клетки экстремального галофила *Halococcus morrhuae* укрыты слоем гетерополисахаридным капсидом толщиной 50 – 60 нм. Данный капсид состоит из разнообразных полисахаридов, в состав которых входят глюкоза, манноза, глюкозамин, галактозамин, глюкуроновая, галактоуроновая и глюкозаминуриновая кислоты. Отдельные

молекулы гетерополисахаридов соединены между собой глициновыми сшивками, образованными между аминогруппами аминсахаров и карбоксильными группами уроновых кислот. Также гетерополисахариды в составе капсида *Halococcus morrhuae* подвергаются сильному сульфатированию и N-ацетилированию [491, 505, 510-511]. Экзополисахаридными оболочками похожего строения и состава окружают свои клетки различные галоархеи рода *Haloferax* и *Haloarcula* [3]. Галоалкалифильные археи образуют уникальные для архей гликоконъюгаты. Капсид *Natronococcus occultus* представлен конъюгированными цепями поли- γ -глутаминовой кислоты и гетерополисахаридами длиной 60 моносахаридных остатков, состоящими из L-глутамата, N-acetyl-D-глюкозамина, N-ацетил-D-галактозамина, остатков D-галактоуроновой и D-глюкуроновой кислот, а также D-глюкозы. Процесс конъюгации заключается в образовании N-амидных сшивок между аминсахарами и α -карбоксильными группами аминокислотных остатков, входящих в состав поли- γ -глутаминовой кислоты [491, 512].

1.6.2. Системы транспорта. Транспорт неорганических ионов. Биоэнергетика

Цитоплазматическая мембрана и мембранные структуры археальных и бактериальных клеток играют основную роль в установлении и поддержании гомеостаза, а также обеспечении реализации энергетических процессов.

Цитоплазматическая мембрана характеризуется как избирательно проницаемая: большинство молекул органических и неорганических веществ не способны преодолеть клеточную мембрану без помощи специальных молекулярных механизмов, однако, небольшие молекулы некоторых соединений, например, воды, необходимой для протекания всех внутриклеточных процессов, легко проходят сквозь мембрану как в клетку, так и из нее, в зависимости от разницы осмолярностей цитоплазмы и окружающей среды [513]. В условиях с экстремально высокими концентрациями различных неорганических ионов в окружающей среде немаловажным является достижение и поддержание осмотического баланса с окружающей средой, необходимого для предотвращения

стремительной потери клеточной влаги. Основой адаптации экстремально галофильных микроорганизмов к высокой осмолярности среды обитания является стратегии “high-salt-in” и “low-salt-in”. Стратегия “high-salt-in” основана на накоплении и поддержании в цитоплазме клетки молярных концентраций ионов K^+ , в то время как стратегия “low-salt-in” направлена на поддержание в цитоплазме клеток минимальной возможной концентрации минеральных солей и достижение осмотического баланса с окружающей средой посредством накопления совместимых растворенных веществ – низкомолекулярных органических осмолитов, путем их биосинтеза *de novo* и/или избирательного забора из окружающей среды. Несмотря на колоссальную разницу в подходах к достижению осмотического равновесия, обе стратегии опираются на скоординированную работу различных клеточных систем, отвечающих за транспорт через цитоплазматическую мембрану неорганических и органических веществ как в клетку, так и из нее [3, 14-15]. Увеличение внутриклеточных концентраций ионов K^+ является нормальным физиологическим ответом многих умеренно галофильных и галотолерантных микроорганизмов на резкое повышение солености окружающей среды [514].

Помимо поддержания необходимого изоосмотического равновесия, мембранные транспортные системы принимают непосредственное участие в осуществлении метаболических и биоэнергетических функций клеточной мембраны. Живая клетка способна генерировать метаболическую энергию двумя разными путями: путем субстратного фосфорилирования или при помощи энергетических систем, ассоциированных с цитоплазматической мембраной и осуществляющих синтез АТФ, движущей силой которого является трансмембранный электрохимический градиент. Трансмембранный градиент характеризуется двумя компонентами – химической, отражающей разность концентраций ионов внутри и снаружи клетки (низкая в цитоплазме, высокая в окружающей среде), и электрической, отражающей разность величин зарядов по разные стороны цитоплазматической мембраны (отрицательный заряд на внутренней стороне мембраны, положительный – на внешней), и создается

совместной работой клеточных систем мембранного транспорта ионов. Клетки всех организмов используют протоны для создания трансмембранного электрохимического градиента. Многие микроорганизмы, живущие в средах, обогащённых солями натрия (например, солёные и щелочные экосистемы), задействуют в создании трансмембранного электрохимического градиента ионы Na^+ , что хорошо сочетается со стратегией “high-salt-in” многих галофилов. Возникающие при этом протон-движущая (PMF, proton motive force) и натрий-движущая (SMF, sodium motive force) силы используются не только для синтеза энергетически насыщенных химических связей, но и для осуществления транспорта различных веществ сквозь клеточную мембрану вторичными транспортерами, используемых в качестве парного иона H^+ или Na^+ [513, 515-517].

Транспортные системы бактерий и архей могут быть разделены на пять групп в соответствии с их строением и принципом действия:

- каналы: к транспортерам данного типа относятся хорошо изученные механосенситивные каналы; осуществляют транспорт растворенных веществ под действием электрохимического градиента [518-521];
- вторичные транспортеры: подразделяются на унипортеры, осуществляющие транспорт единичных ионов без присутствия какого-либо парного иона, симпортеры, осуществляющие перенос ионов совместно с парным ионом, и антипортеры, осуществляющие перенос двух различных соединений/ионов в противоположных направлениях; для своей работы также требуют наличие трансмембранного электрохимического градиента [522-523];
- TRAP-транспортеры: относятся ко вторичным транспортерам, однако выделяются в отдельную группу ввиду иного механизма переноса – помимо непосредственно трансмембранного белка, осуществляющего перенос молекул, существует периплазматический белок, предварительно связывающий молекулу транспортируемого вещества, что является обязательным условием для его переноса через цитоплазматическую мембрану; также требуют наличие трансмембранного электрохимического градиента [524];

- первичные транспортеры: для работы используют энергию химических связей или световую энергию; хорошо известны и изучены такие примеры первичных транспортных систем, как дыхательные цепи, светозависимые протонные помпы, различные типы АТФаз-переносчиков ионов, а также ABC (ATP-binding cassettes)-системы - АТФ-связывающие кассетные транспортеры [523, 525-529];

- PTS-системы (фосфоенолпируват-зависимые фосфотрансферазные системы): осуществляют транспорт сахаров внутрь клетки параллельно с процессом их фосфорилирования [530-531].

Бактерии и археи имеют все из перечисленных транспортных систем. Большая часть (около 50%) аннотированных транспортных систем относятся к типу вторичных транспортеров. На долю трансмембранных каналов приходится порядка 10% известных генов транспортных белков. Оставшееся 40% генов, кодирующих клеточные транспортные системы, аннотированы как гены первичных транспортеров и PTS-систем. Стоит отметить, что PTS-система распространена лишь у бактерий: около 55% бактериальных микроорганизмов обладают по меньшей мере одной PTS-системой. Анализ геномов некоторых представителей царства архей позволил выявить наличие гомологичных транспортных систем, однако высокое сходство последовательностей их генов с таковыми бактериального происхождения говорит о том, что, с высокой долей вероятности, данные транспортные системы были приобретены археями в результате горизонтального переноса бактериальных генов [532].

Галофильные организмы отличаются способностью создавать сильные трансмембранные градиенты концентраций путем селективного импорта и экспорта ионов. Экстремально галофильные организмы, обитающие в рапах, близких к насыщению по NaCl (~5,2 М), поддерживают эквимолярные внутриклеточные концентрации ионов K^+ и Cl^- , а концентрация ионов Na^+ составляет порядка 1 М [61]. Также, многие умеренно галофильные и галотолерантные микроорганизмы прибегают к аккумуляции неорганических ионов в дополнение к совместимым растворенным веществам под

воздействием осмотического стресса [61-62, 533]. Накопление молярных внутриклеточных концентраций неорганических ионов и поддержание трансмембранных градиентов требуют развитых систем ионного обмена с окружающей средой.

Транспорт H^+ и Na^+ из клетки сопряжен с созданием трансмембранного электрохимического потенциала. Механизмы создания и реализации трансмембранного протонного потенциала хорошо изучены у галоархеи *Halobacterium salinarum*. Отток протонов из клетки осуществляется посредством дыхательной цепи и светозависимой протонной помпы – бактериородопсина. Низкое, относительно окружающей среды, содержание ионов Na^+ в клетке достигается при помощи белка-экспортера NhaC - однонаправленного Na^+/H^+ -антипортера. Три копии гена данного белка обнаружены в двух из трех хромосом *Halobacterium salinarum*. Гены аналогичных Na^+/H^+ -антипортерных белков, обеспечивающих создание электрохимического трансмембранного градиента ионов Na^+ , обнаружены у большого числа бактерий и архей. Возникающая в результате их работы натрий-движущая сила обеспечивает функционирование множества вторичных транспортных белков, осуществляющих транспорт различных растворенных веществ из окружающей среды в цитоплазму. У *Halobacterium salinarum* также имеются разнообразные вторичные транспортеры PutP и Cat, осуществляющие импорт катионных форм большинства аминокислот (за исключением цистеина и аспартата), движущей силой которого является электрохимический градиент ионов Na^+ [15, 513, 515, 529, 534-535]. *Haloferax volcanii* осуществляет симпорт молекул глюкозы и ионов Na^+ в клетку [536]. Транспорт аспартата осуществляется иной, но также зависимой от градиента ионов натрия, высоко аффинной системой [537]. Сравнительный анализ геномов 201 микроорганизма, включающих представителей бактерий и архей, позволил установить, что большое число генов, кодирующих Na-зависимые транспортные системы присуще не только галофильным микроорганизмам, но и представителям родов *Bacillus*, *Pirellula* и *Pseudomonas* [532].

Транспорт ионов K^+ в клетки микроорганизмов осуществляется несколькими транспортерами разного типа, которые могут быть объединены в два больших белковых семейства: Trk/Ktr/НКТ/Kdp-семейство и KUP-семейство (K^+ Uptake), включающее Kup, НАК и КТ транспортеры. Оба семейства широко распространены среди бактерий, грибов и растений. Семейство KUP принадлежит к APC-суперсемейству (amino acid-polyamine-organocation) транспортеров, осуществляющих активный вторичный транспорт. Представители данного семейства выполняют различные физиологические функции, обладают широким диапазоном аффинностей к ионам калия и функционируют как K^+/H^+ -симпортеры [538]. Trk/Ktr/НКТ/Kdp-семейство объединяет транспортные белки с идентичным строением, осуществляющие трансмембранный перенос ионов K^+ и/или Na^+ . Белки этого семейства также характеризуются большим разнообразием проницаемостей, аффинностей и механизмов транспортировки ионов: симпорт H^+ и K^+ или Na^+ и K^+ , унипорт Na^+ или K^+ [539]. К Trk/Ktr/НКТ/Kdp-семейству также относится высокоаффинная к K^+ KdpFABC-система, представляющая собой АТФазный белковый комплекс, состоящий из четырех субъединиц: KdpF - стабилизирует комплекс, KdpA – осуществляет связывание и перенос иона калия, KdpB – АТФаза Р-типа, KdpC – принимает участие в сборке комплекса. У организмов, не являющихся галофильными, оперон *kdpFABC* кодирует белки защитного механизма, активирующегося в состоянии осмотического шока в результате резкого повышения солености среды, или в условиях маленьких концентраций ионов K^+ в окружающей среде. Индукция экспрессии белков комплекса находится под контролем регуляторных белков KdpD и KdpE, представляющих собой типичную двухкомпонентную регуляторную систему (сенсорная киназа и белок-регулятор ответа) [540].

Анализ генома *Halobacterium salinarum* и других модельных галофилов как археального, так и бактериального происхождения, выявил несколько различных механизмов транспорта ионов K^+ . В случае избытка солей калия в окружающей среде его транспорт в клетку осуществляется посредством транспортного белка TrkАН, принадлежащего к Trk/НКТ-суперсемейству катионных пермеаз,

селективных к моновалентным катионам [15, 534-535, 541]. Первично-активный транспорт ионов K^+ осуществляется KdpFABC-системой. Стоит отметить, что у галофильных архей, в частности у *Hbt. salinarum*, белки KdpD и KdpE, регулирующие экспрессию генов данного белкового комплекса, отсутствуют. Однако, галобактериальный *kdpFABC* оперон несет нетипичные для бактериальных видов гены (*cat3* у *Halobacterium sp.* NRC-1 и его аналог *uspA* у *H. salinarum* R1), кодирующие регуляторные белки. Компоненты данного белкового комплекса начинают экспрессироваться в клетках галофилов в ответ на недостаток ионов K^+ в окружающей среде и на понижение мембранного потенциала. Несмотря на то, что рост в лимитированных по ионам калия условиях способствует снижению их внутриклеточных концентраций, активация подобного адаптационного механизма позволяет клеткам *Hbt. salinarum* расти в средах с очень низким содержанием калия (вплоть до 20 μM KCl) [542-544]. Экстремально галофильная бактерия *Salinibacter ruber* осуществляет транспорт ионы калия посредством аномального для бактериальных клеток транспортера - Na-K/Cl-симпортера, который, вероятно, играет важную роль в накоплении хлорида калия в клетках. Интересной особенностью данного белка является то, что его аналоги известны лишь у эукариот [545].

Транспорт ионов Cl^- против электрического потенциала клеточной мембраны осуществляется двумя путями: через хлоридный канал или при помощи светочувствительного ионного насоса, галородопсина, широко распространенного среди галофильных архей. *Salinibacter ruber* транспортирует в клетки ионы Cl^- посредством галородопсина. В результате геномного анализа *S. ruber* было выявлено четыре гена, чьи продукты, с высокой долей вероятности, являются родопсинами. Среди них два сенсорных родопсина, протонная помпа и помпа, осуществляющая транспорт ионов Cl^- . Один из данных белков является бактериальным протеородопсином, в то время как три других имеют археальное происхождение и, вероятно, были получены *S. ruber* посредством горизонтального переноса генов. Каким образом то, как *S. ruber* накапливает K^+ в своей цитоплазме, на сегодняшний день остается неясным. Однако, геномный

анализ позволил выявить аномальный белок *S. ruber* – Na-K/Cl котранспортер, который, вероятно, играет важную роль в накоплении хлорида калия в клетках. Интересной особенностью данного белка является то, что его аналоги известны лишь у эукариот, а у прокариот не обнаружены, что также позволяет сделать предположение о горизонтальном переносе генов данного белка архее, бывшей первоначальным носителем данного гена и передавшей его *S. ruber* [545].

Галофильные микроорганизмы обладают развитыми системами транспорта, обеспечивающими забор из окружающей среды ионов биогенных, макро- и микроэлементов, а также активный экспорт из цитоплазмы катионов тяжелых металлов и иных биопатогенных ионных соединений, неизбежно накапливающихся в клетках галофилов, населяющих донные отложения глубоководных морских бассейнов, экосистемы геотермальных источников и т.д. Анализ генома *Hbt. salinarum* также позволил получить общее представление о совокупности транспортных систем неорганических ионов экстремально галофильных микроорганизмов. В геноме *Hbt. salinarum* присутствуют гены множества белков, осуществляющих транспорт неорганических ионов с использованием разнообразных механизмов. Пассивный транспорт фосфат-ионов и ионов Fe^{3+} обеспечивается соответствующими пермеазами. Также ABC-транспортеры осуществляют активный транспорт в клетку катионов Co^{2+} (CbiNOQ), Cu^{2+} (NosFY), Fe^{3+} (HemUV), Zn^{2+} (ZurMA) и анионов SO_4^{2-} (CysAT) и PO_4^{3-} (PstABC). Биопатогенные при высоких концентрациях ионы экспортируются из клетки при помощи АТФ-зависимых транспортных систем: AsO_4^{3-} посредством ArsABC, Cd^{2+} - ZntX и Cd-зависимой эффлюкс АТФазы [535].

1.6.3. Системы транспорта органических соединений, в частности, осмопротекторов

Осмоадаптивная стратегия “low-salt-in”, подразумевающая установление изоосмотического баланса путем накопления высоких внутриклеточных концентраций осмолитов, реализуется микроорганизмами в два этапа. Во время первого этапа происходит быстрый ответ на повышение солености окружающей среды, заключающийся в стремительном накоплении ионов K^+ посредством

скоординированного действия четырех упоминавшихся ранее транспортных систем Trk, Kdp, Kup и kdpFABC. Ввиду неприспособленности клеток “low-salt-in”-микроорганизмов к высоким концентрациям катионов, для компенсации избыточного положительного заряда в условиях высокой осмолярности индуцируется *de novo* синтез глутаминовой кислоты. Таким образом, в качестве быстрого ответа на резкое повышение солености окружающей среды клетки микроорганизмов осуществляют накопление глутамата калия. Однако, высокие внутриклеточные концентрации ионов K^+ оказывают негативное влияние на физиологические процессы клетки. Второй этап осмоадаптации заключается в постепенном накоплении молекул совместимых растворенных веществ, вытесняющих из цитоплазмы глутамат калия без нарушения осмотического равновесия цитоплазмы и внеклеточной среды, не оказывающих влияния на протекание процессов клеточного метаболизма [546-549].

Микроорганизмы накапливают совместимые растворимые вещества двумя путями: путем биосинтеза *de novo* или посредством направленного забора молекул осмопротекторов или их химических предшественников из окружающей среды [546]. Примером *de novo* синтезируемого осмолита является трегалоза. Процесс биосинтеза данного дисахарида давно известен у *E. coli* и хорошо изучен. В биосинтезе трегалозы задействованы два фермента, кодируемые генами оперона *otsAB*. Синтез трегалозы осуществляется посредством двух последовательных биохимических реакций. Первая реакция, катализируемая трегалозо-6-фосфат синтетазой OtsA, представляет собой конденсацию молекул глюкозо-6-фосфата и УДФ-глюкозы в трегалозо-6-фосфат. В процессе второй реакции, катализируемой трегалозо-6-фосфотазой OtsB, происходит дефосфорилирование трегалозо-6-фосфата с образованием молекулы трегалозы. Экспрессия генов оперона *otsAB* не зависит от осмолярности окружающей среды, однако индуцируется на стадии стационарного роста культуры, что говорит о функции трегалозы как универсальной защитной молекулы от разных типов стресса. Также индуктором биосинтеза трегалозы является повышенные

внутриклеточные концентрации глутамата калия и других неорганических катионов [550].

Несмотря на простоту биосинтетического пути трегалозы, микроорганизмы редко прибегают осморгуляции посредством синтеза осмопротекторов *de novo* [546]. Однако многие микроорганизмы неспособны импортировать трегалозу из окружающей среды в клетку, хотя транспортные системы, осуществляющие перенос различных моно- и дисахаридов, в том числе и трегалозы, известны, хорошо изучены и обнаружены у микроорганизмов разнообразной филогенетической принадлежности [551-553]. Тем не менее, подобные механизмы не были обнаружены у *E. coli*. Внеклеточная трегалоза, попадая в периплазматическое пространство клетки *E. coli*, гидролизуется с образованием двух молекул глюкозы высокоактивной периплазматической трегалазой TreA, экспрессия гена которой индуцируется в состоянии осмотического шока. Далее, глюкоза транспортируется в клетку посредством глюкозоспецифичной PTS-системы TreB. Особенностью PTS-транспортёров сахаров является фосфорилирование, осуществляемое в процессе трансмембранного переноса, так что в цитоплазму глюкоза попадает в виде глюкозо-6-фосфата и может быть сразу задействована в клеточном метаболизме, в частности в биосинтезе трегалозы [550].

Согласно произведенным расчетам биоэнергетики процессов биосинтеза разных осмопротекторов, на синтез одной молекулы определенного осмолита из глюкозы клетке гетеротрофного микроорганизма придется израсходовать от 23 до 79 молекул АТФ, что делает *de novo* биосинтез осмолитов энергетически не выгодным. Накопление осмопротекторов посредством селективного транспорта из окружающей среды их молекул или молекул прекурсоров с последующей биохимической модификацией является наиболее энергетически выгодным путем достижения изоосмотического равновесия [554]. Однако подобная стратегия накопления осмолитов подразумевает наличие различных мембранных транспортных систем, способных функционировать в условиях гиперсоленых сред.

Впервые транспортеры молекул осмопротекторных соединений были обнаружены у классических модельных негалофильных микроорганизмов: *E. coli* [547, 550, 555], *C. glutamicum* [556-557], *B. subtilis* [558-559]. Аналогичные транспортные системы были позднее обнаружены у большого числа бактерий и архей разнообразной филогенетической принадлежности [532]. Большинство известных на сегодняшний день транспортеров совместимых растворимых веществ можно отнести к одной из двух групп транспортных систем: ABC-транспортеров и вторичных транспортеров [560-561].

ABC-транспортеры представляют собой мультибелковый комплекс, состоящий из двух пермеаз, двух АТФаз, расположенных на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, и одного субстрат-связывающего белка, находящегося в периплазматическом пространстве клетки и связанного с клеточной мембраной. Использование ABC-транспортерами энергии гидролиза молекулы АТФ, а также высокая аффинность субстрат-связывающего белка, способствуют их большей эффективности, по сравнению с системами вторичного транспорта, и накоплению высоких концентраций субстратов в цитоплазме клетки. ABC-транспортеры подразделяют на две группы в соответствии с типом транспортируемого субстрата: углеводные транспортеры (CUT-транспортеры, carbohydrate uptake transporters), осуществляющие транспорт различных моно-, ди- и олигосахаридов, и ди/олигопептидные транспортеры, транспортирующее, помимо пептидов, множество разнообразных субстратов [529]. Ярким и наиболее изученным примером бактериальной ABC-транспортной системы является ProU-транспортер *E. coli*, осуществляющий перенос через клеточную мембрану широкого спектра разнообразных субстратов, в том числе различных осмопротекторов: эктоина, глицина бетаина, пролина, пролина бетаина и др. [562]. Аналогичные транспортные системы также обнаружены у других микроорганизмов: OpuA *B. subtilis* и OpuC *Pseudomonas syringae*, ProU *Yersinia enterocolitica* [559, 563-565]. Также, ABC-транспортеры, непосредственно вовлеченные в процесс осмоадаптации, были описаны у архей-метаногенов. Такой ABC-транспортной системой является Ota-транспортер

Methanosarcina mazei [566-567]. Осмопротекторные ABC-транспортеры имеются также и у некоторых галофильных архей. Результаты анализ генома *Halococcus hamelinensis* свидетельствуют о наличии у данной археи множественных транспортных систем, селективных к таким осмопротекторам, как глицин бетаин и пролин, в частности, два ABC-транспортера [568].

Вторичные транспортеры, осуществляющие перенос из окружающей среды в клетку молекул совместимых растворимых веществ, относятся к трем разным белковым группам: суперсемейству белков-посредников (MFS-белков), семейству бетаин-карнитин-холиновых транспортеров (BCCT-семейство) и семейству натрий-зависимых симпортеров (SSF-семейство) [533, 546, 561]. Классическими примерами таких транспортеров, принимающих участие в реализации осмоадаптивных механизмов, являются транспортные белки *E. coli* пролиновая пермеаза ProP (MFS-белок) [569], холиновый транспортер BetT и бетаиновый транспортер BetU, ортологичные транспортеру BetP *C. glutamicum* (BCCT-семейство) [557, 570-571]. Холиновые транспортеры *E. coli* и *C. glutamicum* являются ярким примером направленного импорта в клетку прекурсора соединения-осмопротектора – холина, из которого далее ферментами BetA и BetB через образование промежуточного продукта, глицина альдегид бетаина, осуществляется биосинтез глицина бетаина [572]. Ген белка, реконструкция структуры которого выявила наличие характерных для представителей BCCT-семейства 12 трансмембранных доменов, также был обнаружен в геноме галофильной археи *H. hamelinensis* [568].

Изучение осмоадаптивных механизмов и систем транспорта совместимых растворимых соединений галофильных микроорганизмов не только подтвердило наличие и широкое распространение описанных транспортных систем, но также способствовало обнаружению нового типа транспортной системы. Обнаруженная у гамма-протеобактерии *Halomonas elongata* TeaABC-система является транспортером эктоина и 5-гидроксиэктоина, принадлежащим к семейству трехкомпонентных АТФ-независимых периплазматических транспортеров (TRAP-транспортеры, tripartite ATP-independent periplasmic transporters). TeaABC-

транспортер состоит из трех белков: большого и малого трансмембранных белков и периплазматического субстрат-связывающего белка [573]. Аналогичная транспортная система была обнаружена у умеренно галофильной бактерии *Spiribacter salinus* [574]. Особенностью многих TRAP-транспортеров является то, что движущей силой осуществляемого ими транспортного процесса является натриевый электрохимический градиент, что делает подобные системы эффективными в условиях гиперсоленых сред и объясняет их распространенность среди галофильных микроорганизмов [560-561, 573].

Биосинтез всех описанных осморегуляторных транспортных систем индуцируется в ответ на изменение солености окружающей среды. Данные транспортные механизмы представляют собой инфлюкс-системы, которые совместно с инфлюкс-транспортом ионов K^+ активируются для компенсаторного увеличения клеточного объема в ответ на увеличение осмотического давления окружающей среды [561].

Снижение осмолярности окружающей среды подразумевает необходимость компенсаторного уменьшения клеточного объема посредством снижения внутриклеточных концентраций совместимых растворенных веществ. Уменьшение концентрации растворенных в цитоплазме клетки осмопротекторов может достигаться двумя способами: посредством их метаболизма в менее осмотически активные соединения или путем их активного экспорта из клетки. Так, накопленная в результате ответа на осмотический стресс трегалоза быстро гидролизуется в бактериальных клетках до глюкозы, а глицин бетаин, эктоин и другие осмолиты реализуются многими микроорганизмами в среду при помощи различных эффлюкс-систем, тем самым уменьшая внутриклеточное осмотическое давление и увеличивая осмолярность окружающей среды. Многочисленные эксперименты по направленному нокауту генов различных осморегуляторных транспортеров свидетельствуют о перманентном процессе утечки из клетки накапливаемых осмолитов, что говорит о наличии у микроорганизмов многочисленных и разнообразных систем импорта веществ из клетки [546, 560-561]. Яркой иллюстрацией данного факта служит эксперимент с нокаутом

TeaABC-транспортера *H. elongate*, в результате которого наблюдалась гиперпродукция и экскреция в культуральную среду эктоина [574]. Также, участвующие в осморегуляции клетки механосенситивные эффлюкс-каналы MscL и MscS имеются у *E. coli* [575].

1.6.4. Адаптации протеома

Для нормального функционирования в условиях среды с высокой ионной силой и низкой активностью воды, белки галофильных микроорганизмов, как внутриклеточные, так и внеклеточные, должны обладать многочисленными способами адаптациями. Со второй половины 19 века известно, что белковые молекулы сильно подвержены влиянию неорганических ионов в водных растворах солей. Эффект воздействия неорганических солей на белки зависит не только от концентрации последних в растворе, но также от их химической природы. Франц Гофмейстер, проводивший эксперименты по взаимодействию растворов яичного белка и различных неорганических солей, обнаружил, что высокая соленость способствует осаждению белка из раствора, однако эффективность и результат этого процесса во многом зависит от химической природы соли. Данный процесс был назван высаливанием (“salting-out”). Также, в результате своей работы Гофмейстер упорядочил некоторые неорганические ионы в катионном ($\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Al}^{3+}$) и анионном ($\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^-$) рядах Гофмейстера, в зависимости от эффективности производимого ими высаливания. Расположенные в левой части рядов ионы обладают высаливающим действием – в небольших количествах они способствуют стабилизации белковых молекул, а их высокие концентрации – агрегации и преципитации. Ионы правой части рядов обладают противоположным эффектом (“salting-in”) – в малых количествах они способствуют лучшей растворимости белковых молекул, а в больших – денатурации [576]. Доминирующие в большинстве гиперсоленых водоемов NaCl и KCl обладают средним высаливающим эффектом.

Большие количества неорганических ионов также влияют на гидрофобно-гидрофильные взаимодействия белков с водным окружением, являющихся

ключевым фактором в процессах фолдинга и стабилизации белковых молекул. Ввиду того, что с молекулами воды взаимодействуют как молекулы белка, так и неорганические ионы, увеличение числа последних способствует снижению количества «свободной» воды, дегидратации белковых молекул и интенсификации гидрофобных взаимодействия. Более сильные гидрофобные взаимодействия ведут к агрегации белковых молекул и их стабилизации, что в свою очередь сказывается на их конформационной свободе и активности. Исходя из вышесказанного, белки галофильных организмов должны эффективно конкурировать с неорганическими ионами за связывание молекул воды, а также противостоять таким эффектам высаливания, как агрегация, преципитация и сверхстабилизация [577].

Анализ доступных геномов и протеомов разнообразных галофильных микроорганизмов (в частности *Halobacteriales*) демонстрирует радикальные различия их белков и белков негалофильных организмов уже на уровне их аминокислотного состава. Подавляющее большинство белков галофилов содержат большее количество кислых (глутамата и аспартата) и меньшее количество основных (лизина и аргинина) аминокислот в сравнении с белками негалофильных организмов. Наиболее представленной кислой аминокислотой в белках галофилов является аспартат, наименее представленной основной аминокислотой – лизин [578-583]. Большое число кислых радикалов аминокислот, расположенных на поверхности белка, способствуют его дестабилизации ввиду сильных электростатических взаимодействий. Изначально считалось, что такой избыток отрицательного поверхностного заряда галофильных белков экранируется катионами в условиях высокой солености, что позволяет белку функционировать и проявлять активность [584]. Однако дальнейшие исследования позволили установить, что отрицательные радикалы дестабилизируют белковую молекулу и в концентрированных растворах солей, а одна из основных функций отрицательного поверхностного заряда заключается в предотвращении агрегации белковых молекул [580]. Рентгеноструктурный анализ кристаллов галоархеальных кислых белков, в частности ферродоксина *Haloarcula*

marismortui, способствовал детальному изучению их структуры и ближайшего окружения. Полученные изображения свидетельствовали о том, что неорганические ионы не являются основным экранирующим агентом отрицательно заряженной поверхности белка. Однако экранирующий эффект оказывают молекулы воды и гидратированные ионы калия, ассоциированные карбоксильными группами боковых радикалов аминокислотных остатков посредством водородных связей и дипольных взаимодействий в своего рода сеть на поверхности белковой молекулы [585-588]. Кроме того, присутствие на поверхности редких основных боковых радикалов аминокислот должно способствовать образованию ионных связей с кислотными радикалами, стабилизирующих молекулу белка, что подтверждается аномально большим количеством ионных мостиков, наблюдаемых на поверхности молекул ферродоксина *Haloarcula marismortui* и дигидрофолатредуктазы *Haloferax volcanii* [585, 587, 589].

Также, белкам экстремально галофильных микроорганизмов свойственно низкое содержание гидрофобных аминокислот и повышенное содержание слабо гидрофобных аминокислот, чьи радикалы несут гидроксильные группы (серин и треонин). Такой аминокислотный состав способствует ослаблению гидрофобных взаимодействий в молекуле белка, что приводит к ее дестабилизации в условиях низкой солености. Однако большие концентрации солей в окружающей среде способствуют возникновению слабых гидрофобных взаимодействий между боковыми радикалами серинов и треонинов, тем самым способствуя нужным конформационным изменениям и стабилизируя молекулу белка [578-583].

В 2000 году Меварех и его коллеги обобщили имевшиеся на тот момент данные о свойствах и структуре белков галофильных микроорганизмов и на их основе сформулировали общие положения галоадаптации белков. В соответствии с данными положениями, отрицательный заряд поверхности галоархеальных белков имеет двойную функцию. Во-первых, он обеспечивает гидратацию карбоксильных групп боковых радикалов кислых аминокислот и, как следствие, растворимость белковой молекулы в условиях концентрированного раствора

неорганических солей. Во-вторых, дестабилизирующие электростатические взаимодействия отрицательно заряженных поверхностных аминокислотных радикалов нивелируют свехстабилизацию гидрофобных взаимодействий, возникающую под воздействием эффекта неорганических солей. Последнее, совместно со специфическим аминокислотным составом галофильных белков, обеспечивает должную стабильность гидрофобного ядра белковой молекулы и в тоже время способствует конформационной свободе, необходимой для проявления ферментативной активности [590].

1.6.5. Системы фотореактивации и защиты от АФК.

Экологические ниши галофильных микроорганизмов нередко характеризуются как подверженные интенсивному облучению солнечным светом и регулярному высыханию. Ультрафиолетовый компонент солнечного излучения обладает биопатогенными свойствами, реализуя свое биоцидное действие посредством индукции образования различных активных форм кислорода (АФК). АФК, ввиду своей высокой реакционной способности, инициируют широкий спектр нежелательных химических реакций в клетке, ведущих к окислительному повреждению большинства клеточных компонентов, в частности белков, липидов и ДНК, и образованию разнообразных побочных продуктов, обладающих также биоцидным действием. Аналогичным негативным воздействием на клеточные структуры и процессы обладает десикативный стресс. Помимо интенсивного образования АФК, которое является хоть и побочным, но не менее опасным результатом радиационного воздействия и/или дегидратации клетки, данные факторы окружающей среды оказывают непосредственное разрушительное воздействие на многие клеточные структуры, особенно на молекулы ДНК, способствуя химической модификации и нарушению целостности их структуры (см. раздел 1.1.5).

Как упоминалось ранее, эволюция экстремофильных микроорганизмов, в том числе галофилов, тесно связана с эволюцией их экстремальных экосистем. В ходе такой совместной эволюции галофильными организмами было выработано большое число разнообразных защитных молекулярных систем, выполняющих

функции как предупреждения и предотвращения клеточных АФК-индуцированных повреждений (фотопротективные механизмы), так и репарации повреждений (системы репарации ДНК) [591].

1.6.5.1. Фотопротективные механизмы

Фотопротективные механизмы клетки представляют собой системы антиоксидантной защиты клетки, отвечающие за предотвращение образования повреждений, индуцируемых УФ и, как следствие, АФК, а также устраняющие легко обратимые повреждения клеточных компонентов [591].

Активные формы кислорода формируются в живой клетке в результате взаимодействия молекул кислорода с фоточувствительными соединениями (флавинов или порфиринов), активированных воздействием солнечного УФ-излучения. Подобное взаимодействие приводит к образованию четырех различных реактивных форм кислорода: синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), супероксид-аниона ($\text{O}_2^{\cdot-}$), пероксида водорода (H_2O_2). Из пероксида водорода в присутствии двухвалентного железа в результате реакции Фентона образуется наиболее биопатогенная реактивная форма кислорода – гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) [591-592].

1.6.5.1.1. Белковые антиоксидантные системы

Белки, осуществляющие нейтрализацию АФК, относятся к группе ферментов оксидоредуктаз. Данная группа хромопротеидов включает два класса ферментов: каталазы и пероксидазы. Наибольшее распространение среди микроорганизмов, в том числе галофильных, получили каталазы. Каталазы катализируют реакции разложения пероксида водорода на молекулярный кислород и воду, а также реакции окисления различных органических субстратов, в которых донором электрона выступает кислород молекулы пероксида водорода. Каталазы в свою очередь подразделяются на три филогенетически разнородные группы ферментов: типичные каталазы, каталазы-пероксидазы и марганцевые каталазы. Большинство каталаз представлены тетрамерными белками, размеры субъединиц которых варьируются в диапазоне от 55 до 84 кДа [593].

Типичные монофункциональные каталазы осуществляют реакцию разложения пероксида водорода в две стадии. На первой стадии происходит окисление одной молекулой пероксида водорода гема $[\text{Por-Fe}^{\text{III}}]$ типичной каталазы с образованием окисленной формы гема $[\text{Por}^{\text{•+}}-\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$ в соответствии с реакцией: $[\text{Por-Fe}^{\text{III}}] + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow [\text{Por}^{\text{•+}}-\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}] + \text{H}_2\text{O}$. На втором этапе процесса разложения осуществляется восстановление окисленной формы гема в его исходное состояние второй молекулой пероксида водорода в соответствии с реакцией: $[\text{Por}^{\text{•+}}-\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}] + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow [\text{Por-Fe}^{\text{III}}] + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ [593-595]. Филогенетический анализ белков данной группы демонстрирует их широкое распространение среди бактерий и эукариот (в частности, растений) и значительно меньшую представленность среди архей. Типичные каталазы принято делить на три близкородственные клады. Данное разделение, вероятно, произошло в результате двух независимых событий дупликации генов. Считается, что наиболее древней группой является вторая клада каталаз, представленная крупными ферментами, распространенными среди бактерий и грибов. Один из ферментов данной группы стал прародителем первой клады каталаз, получившей широкое распространение среди растений. Происхождение третьей клады каталаз – ферментов, характеризующихся маленькими размерами, получивших распространение во всех трех доменах жизни, на сегодняшний день неизвестно. Предполагается, что данная группа каталаз образовалась в результате удвоения бактериального гена с последующими событиями горизонтального переноса к археям и эукариотам [596-697].

Каталазы-пероксидазы также осуществляют процесс разложения пероксида водорода в две стадии. Белки данной группы имеют гем и строение активного центра, аналогичные гему и таковым типичных каталаз, в результате чего первые стадии каталитического процесса данных ферментов эквивалентны. Ключевое отличие каталаз-пероксидаз заключается в их способности осуществлять пероксидазную реакцию с использованием органических субстратов в качестве восстановительных агентов. При условии наличия подходящего органического восстановителя (AH_2) и низких концентраций пероксида водорода в клетках

каталазы-пероксидазы осуществляют вторую стадию каталитического процесса в соответствии с уравнением: $[\text{Por}^{\bullet+}\text{-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}] + 2\text{AH}_2 \rightarrow [\text{Por-Fe}^{\text{III}}] + 2\text{AH}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ [593, 598]. Несмотря на большое сходство в строении активных центров и механизмах действия каталазы и каталазы-пероксидазы не являются филогенетически близкородственными ферментами. Каталазы-пероксидазы – крупные тетрамерные белки (размер одной субъединицы составляет порядка 80 кДа), широко представленные среди бактерий и в меньшей степени среди грибов и архей [597]. Считается, что данная группа ферментов значительно моложе типичных монофункциональных каталаз и произошла в результате многочисленных последовательных событий горизонтального переноса генов [599-600].

Каталаза и две каталазы-пероксидазы были обнаружены и выделены из клеток экстремально галофильных архей *H. salinarum*. Оксидоредуктазы *H. salinarum* обладают разными оптимальными значениями pH и зависимостью от концентрации солей в цитоплазме, их активности сильно зависят от условий окружающей среды, что, вероятно, говорит об их разных физиологических функциях [601-603]. Также, каталазы-пероксидазы были обнаружены у экстремофильных архей *Haloarcula marismortui* и *Archaeoglobus fulgidus* [604-605]. Каталазы были обнаружены и выделены из архей-метаногенов *Methanosarcina barkeri* и *Methanobrevibacter arboriphilus* [601-602].

Марганцевые, или безгемовые, каталазы являются наименее распространенной группой ферментов, осуществляющих каталазную реакцию. Марганцевые каталазы представляют собой гомогексамерные белки, состоящие из субъединиц массой порядка 30 кДа, и вместо гема в активном центре содержат кластер из двух атомов двухвалентного марганца. Данный тип ферментов также осуществляет двухступенчатую каталазную реакцию разложения двух молекул пероксида водорода. На первой стадии каталазной реакции происходит окисление марганцевого кластера молекулой пероксида водорода с образованием двух молекул воды: $\text{H}_2\text{O}_2 + [\text{Mn}^{\text{II}}\text{-Mn}^{\text{II}}(2\text{H}^+)] \rightarrow [\text{Mn}^{\text{III}}\text{-Mn}^{\text{III}}] + 2\text{H}_2\text{O}$. Вторая стадия реакции происходит с восстановлением марганцевого кластера молекулой

пероксида водорода в исходное состояние и сопровождается образованием молекулы кислорода: $[Mn^{III}-Mn^{III}] + H_2O_2 \rightarrow [Mn^{II}-Mn^{II}(2H^+)] + O_2$ [593, 606]. Предполагается, что данный класс ферментов возник в промежутке времени между типичными каталазами и каталазами-пероксидазами. Филогенетический анализ последовательности этих ферментов обнаруживает по меньшей мере четыре давно разделившиеся клады. Анализ сформировавшейся за последнее время обширной базы нулеотидных последовательностей организмов разнообразной филогенетической принадлежности позволил определить порядка 100 генов потенциальных марганцевых каталаз. Как говорилось ранее, данный тип каталаз бедно представлен среди микроорганизмов и полностью отсутствует у эукариот. Однако белки, принадлежащие к данному классу ферментов, были обнаружены у большого числа факультативно анаэробных бактерий, что может свидетельствовать о непосредственном участии этих ферментов в процессах микроаэрофильной адаптации. Также, гены марганцевых каталаз были аннотированы в геномах экстремально термофильных бактерий и кренархеот [606-607].

Другим важным элементом белковой антиоксидантной системы клетки являются ферменты супероксиддисмутазы (СОД). Данный тип ферментов катализирует реакцию диспропорционирования супероксид-ионов ($O_2^{\cdot-}$) с образованием молекулы кислорода и молекулы пероксида водорода, который в дальнейшем разлагается каталазами. В соответствии с химической природой металлического кофактора СОД разделяют на четыре группы: Cu/Zn-СОД, Mn-СОД, Fe-СОД и Ni-СОД. СОД являются одним из основных ферментов, осуществляющих защиту клетки от реактивных кислородных радикалов. Представители всех четырех групп СОД обнаруживаются у подавляющего большинства известных аэробных, микроаэрофильных и некоторых анаэробных организмов [608-609]. Близкородственные Mn-СОД и Fe-СОД были обнаружены у разных экстремально термофильных архей. У таких экстремально галофильных архей, как *H. salinarum* и *H. volcanii*, были обнаружены марганец-зависимые СОД. Геном *H. salinarum* несет единственный ген *sod*, кодирующий

супероксиддисмутазу [610-611]. Эксперименты, в ходе которых осуществлялось окислительное стрессирование *H. salinarum*, демонстрируют, что структурный ген СОД экспрессируется постоянно, однако увеличение внутриклеточных концентраций супероксид-иона индуцирует активный биосинтез данного фермента [611].

1.6.5.1.2. Небелковые антиоксидантные системы

Клетки галофильных микроорганизмов также обладают небелковой защитной антиоксидантной системой. Одним из таких процессов является марганец-зависимый антиоксидантный процесс. Восприимчивые и устойчивые к интенсивному воздействию коротковолнового электромагнитного излучения микроорганизмы часто характеризуются соотношением внутриклеточных концентраций двухвалентных марганца и железа (Mn^{2+}/Fe^{2+}). Клетки восприимчивых к излучению микроорганизмов характеризуются низкими значениями отношения Mn^{2+}/Fe^{2+} ($<0,001$), что говорит о низком содержании Mn(II). Радиационно-резистентные микроорганизмы характеризуются высокими значениями отношения Mn^{2+}/Fe^{2+} [612]. Так, биомасса наиболее устойчивого к облучению микроорганизма *D. radiodurans* обладает Mn^{2+}/Fe^{2+} равным 0,24 [612-613]. Биомасса архей *H. salinarum* также характеризуется высоким содержанием марганца, а соотношение Mn^{2+}/Fe^{2+} составляет 0,19 [614].

Органические и неорганические комплексы Mn^{2+} играют важную роль в защите компонентов клетки от окислительного воздействия АФК, индуцированных различными типами электромагнитного излучения (ЭМИ). Mn (II) образует комплексные соединения с разнообразными комплексообразователями как органической, так и неорганической природы: ортофосфатом, пирофосфатом, нуклеозидами, олигопептидами, трегалозой, остатками яблочной и молочной кислот и другой низкомолекулярной органикой [615]. Многочисленные эксперименты демонстрируют радиопротекторные и антиоксидантные свойства комплексов двухвалентного марганца, предотвращающие АФК-индуцированные повреждения белков (в частности, железосодержащих), ДНК и других клеточных компонентов [616-617].

Безбелковые экстракты биомассы галобактерий также демонстрируют ярко выраженные радиопротекторные свойства. Добавление подобных экстрактов в водные растворы ферментов ведет к сохранению ферментативной активности и стабильности белка при больших дозах облучения [616, 618-619].

Осмоадаптивные механизмы галофилов также играют важную роль в антиоксидантных процессах клетки. Высокие концентрации ионов Cl^- в цитоплазме клеток «high-salt-in»-микроорганизмов способствуют процессу восстановления гидроксильного радикала ($\bullet\text{OH}$) с образованием гидроксил-иона (OH^-) и атомарного хлора ($\text{Cl}\bullet$), который в свою очередь реагирует с хлорид-ионом с образованием радикала $\text{Cl}_2^{\bullet-}$, обладающего меньшим биопатогенным потенциалом [614, 620-621]. Большие внутриклеточные концентрации осмопротекторов также способствуют повышению устойчивости в условиях активного оксидативного стресса. Многие осмопротекторы, такие как сахара и аминокислоты, проявляют антиоксидантные свойства. Биохимический анализ безбелковых экстрактов штаммов экстремальных микроорганизмов, устойчивых к высоким дозам облучения, демонстрирует повышенное содержание свободных аминокислот в сравнении экстрактами менее радиационно-устойчивых штаммов микроорганизмов того же вида [622-623]. Кроме того, низкомолекулярные осмопротекторы могут выступать в роли комплексообразователей двухвалентного марганца [619].

Марганец-зависимая антиоксидантная система является важным, если не фундаментальным, компонентом фотопротективной системы клетки. Совместно с различными компонентами клеточной цитоплазмы, также обладающими высокой индивидуальной антиоксидантной активностью, комплексные соединения двухвалентного марганца обеспечивают надежную защиту клеточных структур и компонентов, ассимилируя и инактивируя большую часть индуцированных коротковолновым электромагнитным излучением АФК. В пользу данного утверждения свидетельствуют результаты экспериментов, в ходе которых производилось облучение и оксидативное стрессирование мутантных штаммов *H. salinarum*, несших инактивированные гены СОД, каталазы и других белков,

отвечающих за функционирование белковой антиоксидантной системы клетки. При непосредственном воздействии на культуры мутантов химическими окислителями, такими как H_2O_2 (25 мМ) и N,N'-диметил-4,4'-дипиридила дихлорид (4 мМ) (пакват, продуцирует супероксид-ионы), в большинстве случаев наблюдалось увеличение числа АФК-индуцированных повреждений клеточных компонентов и чувствительности клеток к оксидативному стрессу, ведущей к значительному снижению выживаемости. Однако, облучение мутантных клеток дозами радиации в 2,5 и 5 кГр, не демонстрировало снижения выживаемости и вымирания культур [618].

1.6.5.1.3. Каротиноиды

Еще одним компонентом небелковой антиоксидантной системы клетки являются каротиноиды. Многие галофильные микроорганизмы, как археи, так и бактерии, продуцируют каротиноиды как один из компонентов многочисленных адаптивных и защитных систем, в том числе осмоадаптивной, фотопротекторной, антиоксидантной и фотосинтетической. Каротиноиды являются гидрофобными соединениями, представленными длиной (40 – 50 углеродных атомов) углеводородной ненасыщенной цепью с многочисленными сопряженными двойными связями, характеризующейся двусторонней симметрией относительно центральной двойной связи, концы которой могут быть оснащены разнообразными группами атомов: циклическими углеводородными радикалами или кислородсодержащими функциональными группами. В зависимости от химического строения каротиноиды могут быть разделены на две группы: каротины и ксантофиллы. Основным местом локализации каротиноидов в клетке является цитоплазматическая мембрана. Каротины представляют собой углеводороды каротиноидной природы. К каротинам, производимым галофилами, относятся такие каротиноиды как β -каротин и ликопин. Ксантофиллы являются кислородсодержащими каротиноидами и могут нести эпоксидные, гидроксильные, карбонильные химические группы, а также метоксильные и карбоксильные радикалы [624]. Примером галофильных ксантофиллов являются

бактериоруберин и его производные, фитоин и салиниксантин, который является уникальным каротиноидом экстремальных галофилов [625-627].

Все, за редким исключением, представители галофильных архей семейства *Halobacteriaceae* способны осуществлять биосинтез C_{50} и C_{40} каротиноидов [3]. Основным галобактериальным C_{50} -каротиноидом является бактериоруберин, синтезируемый в больших количествах клетками галобактерий, благодаря чему они и, как следствие, их колонии и планктонные культуры приобретают характерное окрашивание в оттенки красного [628]. Из биомассы галобактерий также могут быть выделены другие C_{50} -каротиноиды, являющиеся прекурсорами: 2-изопентил-3,4-дегидрородопин (ИДР, IDR), бисангидробактериоруберин (БАБР, BABR), моноангидробактериоруберин (МАБР, MABR), и производными бактериоруберина: 3,4-дегидромоноангидробактериоруберин, галоксантин и 3,4-эпоксимоноангидробактериоруберин [628-632]. Также C_{50} -каротиноиды продуцируются некоторыми представителями бактериальных родов *Corynebacterium* [633-634], *Dietzia* [635-636], *Micrococcus* [637] и *Arthrobacter* [638]. C_{40} -каротиноиды синтезируются галоархеями в меньших количествах. К C_{40} -каротиноидам, которые могут быть обнаружены в галобактериальной биомассе, относятся фитоин, ликопин, β -каротин, а также их предшественники и производные: цис- и транс-фитоины, цис- и транс-фитофлюины, ликоперсин, нео- β -каротин, нео- α -каротин, кантаксантин, астаксантин и др. [628, 631].

Биосинтез каротиноидов осуществляется в соответствии с путем биосинтеза других изопренов в клетке (терпенов, стероидных гормонов и тд.) и во многом идентичен у архей, бактерий и растений. Основное отличие пути каротиноидного биосинтеза галоархей заключается в том, что из ликопина синтезируются β -каротин (C_{40} -каротиноид) и бактериоруберин (C_{50} -каротиноид). Фотосинтетические организмы на данном этапе биосинтетического пути осуществляют образование двух C_{40} -соединений: α - и β -каротина [639-640].

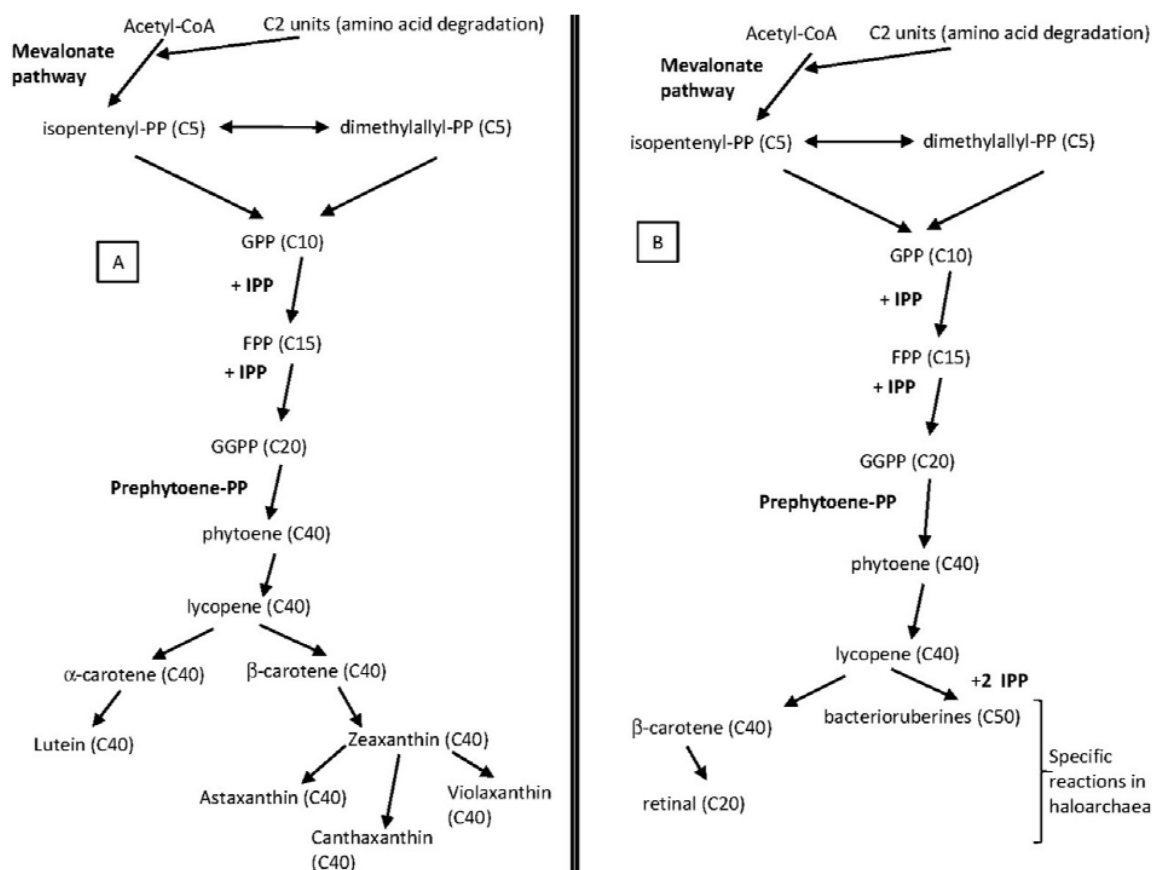


Рисунок 1.5. Сравнение путей биосинтеза изопреноидов у фотосинтезирующих организмов (А) и у галоархей (В) [631].

Биосинтез ликопина (C_{40}) осуществляется в соответствии с общей для архей, бактерий и растений схемой из фитоина (C_{40}), путем образования дополнительных четырех двойных связей и изомеризации, катализируемых у бактерий ферментами десатуразами CrtP и CrtQ, изомеразой CrtH и неизвестной, вероятно, светозависимой изомеразой. Фитоин синтезируется посредством реакции конденсации двух молекул геранилгеранил-дифосфата (C_{20}) «хвостом-к-хвосту», которая катализируется синтазой фитоина (CrtB). Об идентичности данного этапа биосинтеза каротиноидов говорят результаты филогенетического анализа, свидетельствующие о высокой консервативности последовательностей синтазы фитоина представителей дальнородственных групп организмов. Геранилгеранил-дифосфат в свою очередь образуется путем последовательных реакций конденсации «голова-к-хвосту» растущей цепи ($C_5 \rightarrow C_{10} \rightarrow C_{15} \rightarrow C_{20}$) с

молекулами изопренил-дифосфата (C_5), являющимися продуктами мевалонатного пути биосинтеза [639, 641]. Гены белков, отвечающих за осуществление данного биосинтетического пути, были обнаружены в геноме *Hbt. salinarum*. Стоит отметить, что геном *Hbt. salinarum* содержит несколько гомологичных генов ферментов, катализирующих некоторые стадии биосинтеза каротиноидов, что позволяет сделать предположение о возможности одновременной реализации разных путей синтеза каротиноидов в клетках *Hbt. salinarum* [642-643].

Путь биосинтеза β -каротина из ликопина, характерный для растений и бактерий, известен и хорошо изучен. У бактерий процесс биосинтеза β -каротина осуществляется в один этап ферментом CrtY (ликопин- β -циклазой) [644], в отличие от растений, которые синтезируют β -каротин в два этапа, через биосинтез γ -каротина, посредством ферментов CrtL-B и CrtY [639]. Считается, что у галоархей изомеризация ликопина в β -каротин также осуществляется в один этап ферментом ликопен-циклазой, ген которой обнаружен в геноме *Hbt. salinarum* [642]. Далее β -каротин может расщепляться β -каротин диоксигеназой (Bcp) с образованием ретиналя [645].

Ликопин является предшественником в пути биосинтеза бактериоруберина и претерпевает многочисленные химические модификации: к концам молекулы присоединяется по одной молекуле изопрена (C_5), вносятся две двойные связи и присоединяются четыре гидроксильные группы. Геномный анализ галофильной археи *Haloarcula japonica* позволил идентифицировать гены ферментов, которые осуществляют биоконверсию ликопина в бактериоруберин. Удлинение цепи ликопина осуществляется ликопин элонгазой *LeyJ* независимо на каждом конце молекулы, путем присоединения молекулы изопрена к C_2 атому. Данный фермент является бифункциональным и обладает 1,2-гидратазной активностью, благодаря чему одновременно с удлинением углеродного скелета осуществляется гидратирование двойной связи между C_1 и C_2 атомами с присоединением гидроксильной группы к C_1 атому. Реакция на одном из концов молекулы ликопина приводит к образованию промежуточного продукта – дигидроизопентенилдегидрородопина (ДГ-ИДР, C_{45}), который в промежутке

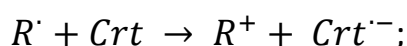
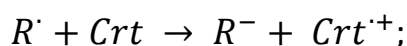
между первым и вторым актами удлинения углеродного скелета подвергается дегидрированию 3,4-десатуразой CrtD с образованием изопентенилдегидрородопина (ИДР). Последующие реакции присоединения изопрена, гидратации и дегидрирования приводят к образованию бисангидробактериоруберина (БАБР) – C₅₀-каротиноида, предшественника бактериоруберина. Дальнейший процесс образования бактериоруберина протекает в две этапа с промежуточным образованием моноангидробактериоруберина (МАБР) и заключается в гидратации изопренил-радикалов, присоединенных к C₂ и C₂' атомам углеродного скелета, осуществляемой ферментом 2'',3''-гидратазой (CruF) [640].

Каротиноиды проявляют свойства сильных антиоксидантных и фотопротекторных агентов [631]. Важная роль каротиноидов в защите клеток от бицидных факторов окружающей среды стала очевидной после экспериментов с белыми мутантами *Hbt. salinarum*, естественным образом утративших способность продуцировать бактериоруберин. В сравнении с пигментированными сородичами, клетки белых мутантов в значительно большей степени подвержены негативному влиянию УФ-облучения и АФК, накапливают большее количество разного рода клеточных повреждений, что ведет к стремительному вымиранию их культур после интенсивного облучения [646-647]. Хотя механизмы, в ходе которых осуществляется защита от интенсивного УФ-излучения и обезвреживание АФК, на сегодняшний день досконально не изучены, экспериментальные данные свидетельствуют о том, что протекторные свойства каротиноидов сильно зависят от их химической структуры, в частности, от числа сопряженных двойных связей основной углеродной цепи. Так, бактериоруберин, содержащий 13 сопряженных двойных связей, является значительно более сильным антиоксидантом и фотопротектором в сравнении с β-каротином (9 сопряженных двойных связей) и любым другим C₄₀-каротиноидом [648]. Предполагается, что один из возможных защитных механизмов заключается в передаче энергии инактивации возбужденных фотосенситивных молекул и АФК к каротиноидам, которые в свою очередь рассеивают избыточную энергию в виде

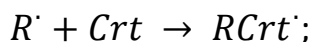
тепла благодаря системе сопряженных π -связей [649]. Также предполагается, что каротиноиды осуществляют свою фотопротекторную функцию, выступая в роли светофильтра. Каротиноиды поглощают свет в диапазоне от 340 до 550 нм, что позволяет им «обезвреживать» длинноволновое УФ-излучение ($\lambda_{340} - 400$ нм), до того, как оно индуцирует образование АФК или иных клеточных повреждений [650]. Индукция биосинтеза каротиноидов, в частности бактериоруберина, наблюдается в результате интенсивного облучения культуры клеток светом, но также зависит от солености, уровня аэрации и других физико-химических факторов окружающей среды [632, 651].

Механизмы процессов (фото)химического окисления каротиноидов на сегодняшний день не ясны. Один из наиболее вероятных сценариев антиоксидантной защиты клетки с участием каротиноидов подразумевает их химическую деградацию. Известны три типа общепринятых реакций, в соответствии с которыми может осуществляться каротиноидное инактивирование АФК [649, 652-655]:

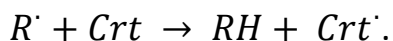
- перенос электрона между свободным радикалом и молекулой каротиноида с образованием радикал-катиона или радикал-аниона каротиноида:



- образование радикального аддукта:



- перенос атома водорода с образованием нейтрального радикала каротиноида:



Ни одно из образовавшихся радикальных производных далее не может выступать в роли антиоксиданта, но может стать потенциально опасным окислительным агентом с продолжительным периодом жизни [652-654]. Интересно, что присутствие неорганических солей двухвалентных металлов (Ca^{2+} ,

Fe^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+}) в реакционной смеси часто оказывает положительный эффект на антиоксидантную активность каротиноидов и снижает стабильность и окислительный потенциал их радикальных производных [656].

Эксперименты по *in vitro* деградации C_{40} -каротиноидов под воздействием таких физических и химических стрессоров, как УФ-излучение, нагревание и сильные окислители, демонстрируют разрушение молекул каротиноидов с образованием более низкомолекулярных продуктов деградации. Так, экстремальные физическое и химическое воздействие на β -каротин ведет к образованию C_{10} , C_{13} , C_{20} , C_{25} , C_{30} и C_{25} апокаротиноидов. Химическое окисление ликопина и β -каротина такими сильными окислителями, как молекулярный кислород и перманганаты, помимо многочисленных продуктов неспецифического окисления по двойным углеродным связям, ведет к образованию различных апокаротиноидов: цис-изомеров, эпокидных производных, β -аполикопиналей и β -апокаротиналей, а также различных радикалов и радикал-ионов каротиноидов [639, 657-660].

1.6.6. Системы репарации ДНК

Помимо фотопротекторных и антиоксидантных систем, галофильные организмы обладают различными системами репарации ДНК, включающими фотореактивационный и эксцизионные механизмы, а также гомологичную рекомбинацию. Репарационные механизмы являются древними и консервативными системами защиты и поддержания целостности и постоянства молекул ДНК и аналогичны для представителей всех трех доменов жизни [591, 661].

1.6.6.1. Световая репарация

В результате непосредственного воздействия УФ излучения на молекулу ДНК происходит образование двух типов нежелательных фотопродуктов: циклобутановых пиримидиновых димеров (ЦПД) и пиримидин-(6-4)-пиримидон аддуктов ((6-4)-ПП аддукты) [662]. Такие УФ-индуцированные повреждения молекулы ДНК являются обратимыми и устраняются молекулярной системой фотореактивации, или световой репарации, использующей энергию видимого

света для направленного разрыва химических связей. Реакции обнаружения и разрушения циклобутановых колец ЦПД и (6-4)-ПП аддуктов катализируются светозависимыми ферментами фотолиазами. Фотолиазы делятся на две группы в зависимости от типа репарируемого димера: ЦПД-фотолиазы и (6-4)-ПП-фотолиазы. Для осуществления катализа реакций фоторепарации фотолиазы требуют наличие кофактора – флавинадениндинуклеотида (ФАД). ФАД выступает в роли хромофора и поглощает свет в синем и около УФ диапазоне. Энергия поглощенных фотонов далее используется для возвращения димеризованных азотистых оснований в их нативное состояние [663-666].

Геномный анализ *Hbt. salinarum* и других галофильных архей обнаруживает у данной группы микроорганизмов два гена фотолиаз: *phr1* и *phr2* [643]. Эксперименты, в ходе которых осуществлялся нокаут обоих генов демонстрируют, что непосредственно в процесс фотореактивации вовлечен продукт гена *phr2*. Фотолиаза Phr2 эффективно репарирует ЦПД, однако не способна осуществлять репарацию (6-4)-ПП аддуктов. ЦПД-фотолиаза *H. salinarum* является крайне высокоэффективным ферментом и осуществляет практически полную репарацию УФ-индуцированных ЦПД в течение 30 минут после облучение культуры клеток. Белок Phr2 экспрессируется в клетках галоархеи конститутивно, вне зависимости от присутствия и интенсивности воздействующего на культуру света [667-668]. Назначение белка, кодируемого геном *phr1*, на сегодняшний день неизвестно [591].

1.6.6.2. Темновая репарация

Для репарации ЦПД, (6-4)-ПП аддукты и других более обширных повреждений молекулы ДНК также существует система темновой репарации, или эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН, NER, nucleotide excision repair). В отличии от световой репарации ЭРН является светонезависимым многостадийным процессом, осуществляемым скоординированным действием нескольких ферментов. Данная система универсальна и не зависит от типа повреждений ДНК. Система темновой репарации, также как и система фотореактивации, является высоко консервативной, ввиду чего процесс эксцизии

нуклеотидов аналогичен у всех организмов вне зависимости от их филогенетической принадлежности [591, 661, 669-671].

Темновая репарация ДНК протекает в несколько стадий: распознавание повреждения, внесение одноцепочечных разрывов с двух сторон от обнаруженного места повреждения и удаление образовавшегося олигонуклеотида, репарационный синтез ДНК, лигирование и восстановление целостности структуры двойной спирали ДНК. Процесс ЭРН осуществляют ферменты, кодируемые группой генов *uvrABCD*, совместно с клеточными полимеразой и лигазами. Белок структурного гена *uvrA* отвечает за распознавание повреждений ДНК. Продукты генов *uvrB* и *uvrC* являются структурно-зависимыми эндонуклеазами, вносящими одноцепочечные разрывы в поврежденной цепи ДНК с 5' и 3' сторон непосредственно около места повреждения. Белок гена *uvrD* – хеликаза, осуществляющая удаление поврежденного олигонуклеотида. Далее, полимераза осуществляет застраивание образовавшегося гэпа, а лигаза восстанавливает целостность сахарофосфатного остова молекулы ДНК [672-673].

Геномный анализ галоархей демонстрирует наличие у них как *uvrABCD* генов, характерных для бактериальной ЭРН-системы, так и их эукариотических гомологов, встречающихся у млекопитающих (гены *xpf*) и дрожжей (гены *rad*), что говорит о возможности осуществления эксцизионной репарации в археальных клетках несколькими путями [643]. Темновая репарация является одним из ключевых элементов галоэкстремофильной фотопротекторной системы клетки. Нокаут *uvrA*, *uvrB* и *uvrC* генов способствует увеличению чувствительности к УФ-излучению и снижению выживаемости культуры *Hbt. salinarum* [674]. Анализ генома *H. volcanii* совместно с экспериментами по оценке выживаемости мутантов с таргетированным нокаутом генов позволили выявить две нуклеазы, принимающие непосредственное участие в процессе темновой репарации. LigA является АТФ-зависимой нуклеазой. Вторая эндонуклеаза – LigN, является НАД⁺-зависимой и, вероятно, была приобретена археями в результате горизонтального переноса гена от бактерии [675].

Галофильные археи также способны осуществлять эксцизионную репарацию, сопряженную с транскрипцией. УФ-индуцированные повреждения и другие изменения оснований транслирующей цепи молекулы ДНК приводят к остановке транскрипции активных генов, препятствуя продвижению транскрипционного комплекса. Данное событие запускает процесс репарации, сопряженной с транскрипцией, привлекая на место остановки РНК-полимеразы ферменты комплекса темновой репарации. Система сопряженной с транскрипцией репарации широко распространена у бактерий и эукариот, однако у архей была обнаружена недавно [676-680]. Несмотря на то, что факт сопряженной с транскрипцией ЭРН-репарации подтвержден у таких галофильных архей, как *Hbt. salinarum* и *H. volcanii*, механизм привлечения ферментов ЭРН-системы на место остановки транскрипции на сегодняшний день неизвестен [679].

1.6.6.3. Репарация фото- и химически индуцированных необратимых повреждений

Образование и накопление в цитоплазме клеток различных активных окислителей в результате интенсивного облучения, оксидативного стрессирования или высыхания культуры ведет к масштабным повреждениям клеточных структур и макромолекул. Несмотря на беспрецедентную эффективность антиоксидантных механизмов галофильных микроорганизмов, их ДНК регулярно подвергается негативному воздействию АФК и продуктов их реакций, способствующих окислению, дезаминированию, алкилированию, потере азотистых оснований, иным необратимым химическим модификациям и структурным повреждениям типа одноцепочечных и двуцепочечных разрывов (см. раздел 1.1.5) [681].

1.6.6.3.1. Эксцизионная репарация оснований

Известно более 20 окислительных модификаций азотистых оснований, минорно обнаруживаемых в ДНК, наиболее распространенными из которых являются 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-охоG), тимин-гликоль, 4,6-диамино-5-формапидопиримидин (FapyAde) и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формапидопиримидин (FapyGua). Репарация различного рода химических

модификаций оснований, апуриновых и апириимидиновых сайтов (АП-сайты) и одноцепочечных разрывов осуществляется системой эксцизионной репарации оснований (ЭРО, BER, base excision repair) [661]. ЭРО является многостадийным механизмом репарации. В первую очередь осуществляется удаление поврежденного азотистого основания путем гидролиза N-гликозидной связи между основанием и дезоксирибозой сахарофосфатного остова молекулы ДНК. Гликозилазы, осуществляющие гидролиз N-гликозидной связи, являются специфичными в отношении типа химической модификации основания, ввиду чего различают порядка 11 типов специфичных ДНК-гликозилаз, инициирующих процесс ЭРО-репарации. Далее производится удаление образовавшегося АП-сайта путем внесения одноцепочечного разрыва на его 5'-конце и удаления дезоксирибозо-5-фосфата АП-эндонуклеазой. Удаление АП-сайта также может происходить альтернативным образом: некоторые ДНК-гликозилазы обладают АП-лиазной активностью, что позволяет им вносить одноцепочечный разрыв на 3'-конце АП-сайта. Образующийся в результате данной реакции 3'-нуклеотид удаляется 3'-фосфодиэстеразой. Далее, одноцепочечный участок достраивается в соответствии с принципом комплементарности ДНК-полимеразой, после чего лигаза восстанавливает целостность нормального сахарофосфатного остова [682].

Наличие ЭРО-системы у галоархей было подтверждено экспериментально, путем детектирования масс-спектрометрическими методами окислительных модификаций азотистых оснований, индуцированных гамма-излучением – образовавшиеся повреждения оснований ДНК клеток *Hbt. salinarum* были полностью репарированы спустя два часа после облучения [614]. Анализ генома *H. salinarum* демонстрирует наличие гомологов бактериальных и эукариотических ДНК-гликозилаз, включая гомологи эндонуклеазы III (*nthA1*, *nthA2* и *nthB*), 8-оксогауанин-гликозилазы (*ogg*), A/G-специфичной аденин-гликозилазы (*mutY*) и 3-метиладенин-гликозилазы (*alkA*) [643]. В пользу наличия функционирующего аппарата ЭРО у галоархей также свидетельствуют результаты транскриптомного эксперимента, демонстрирующие повышение экспрессии генов ферментов,

отвечающих за осуществление некоторых этапов этого репарационного процесса [668].

1.6.6.3.2. Репарация двуцепочечных разрывов

Окислительные повреждения ДНК нередко затрагивают группы близко расположенных нуклеотидов и охватывают небольшие участки молекулы протяженностью около 1-2 витков двойной спирали [683]. Как обсуждалось ранее, ЭРО-система в процессе репарации формирует одностранный разрыв на месте поврежденного нуклеотида. Одновременная ЭРО двух близко расположенных нуклеотидов, принадлежащих разным нитям молекулы ДНК, может стать и нередко становится причиной образования двуцепочечного разрыва ДНК (ДР). Двуцепочечные разрывы репарируются в соответствии с одним из двух возможных сценариев. Первый возможный путь репарации заключается в негомологичном соединении концов (НСК). НСК осуществляется в случае отсутствия молекулы ДНК с гомологичной последовательностью. Второй репарационный сценарий требует наличия гомологичной нуклеотидной последовательности, как шаблона для реализации восстановления целостности молекулы ДНК, и называется гомологичной репарацией [591, 661, 681].

Гомологичная рекомбинация (ГР) является основным и широко распространенным механизмом репарации двуцепочечных разрывов ДНК и используется представителями трех доменов жизни. ГР архей во многом аналогична ГР эукариот и, за некоторыми исключениями, включает аналогичные этапы и задействует гомологичные белки. Еще одним отдаленным сходством эукариот и архей также является свойственная последним полиплоидия, что обеспечивает наличие в клетке последовательности, гомологичной поврежденному фрагменту. Гомологичная рекомбинация может быть рассмотрена на примере классического модельного эукариота *S. cerevisiae*. Репарация двунитевого разрыва посредством ГР осуществляется в несколько шагов, включающих [661, 687-688]:

- распознавание ДР, осуществляемое Mre11 белковым комплексом, включающем нуклеазу Mre11, АТФазу Rad50 и белок Xrs2, и зачистку 5'-концов

одной из цепей ДНК с образованием висячих одностранных 3'-ОН-концов на второй цепи, осуществляемую эндонуклеазой Sac2, хеликазой-нуклеазой Dna1, 5'-3'-экзонуклеазой Exo1 и белковым комплексом Sgs1/Top3/Rmi1;

- связывание рекомбиназы Rad51 с последующим образованием комплекса с белками Rad52, Rad54, Rad55 и Rad57; инвазия одиночной цепи, образование гетеродуплексной ДНК, сопряженное с образованием D-петли вытесненной цепью;

- наращивание 3'-ОН-конца инвазирующей цепи за счет синтеза ДНК и, как следствие, увеличение D-петли, миграция ветвей;

- после достижения D-петлей висячего 3'-ОН-конца на противоположной стороне разрыва, захват второго конца ДР, достраивание инвазирующей цепи ДНК и лигирование концов (образование структуры Холидея);

- разрешение структуры Холидея резольвазой.

Археи обладают набором генов гомологичных эукариотическим белкам, включающим *radA*, кодирующий гомолог рекомбиназы Rad51, ген *rad50* гомолога нуклеазы Mre11 и другие [689]. Облучение УФ светом клеток *Hbt. salinarum* индуцирует активную экспрессию полного набора перечисленных генов [690]. Эксперименты по выживаемости линий *H. volcanii* и *Hbt. salinarum* с нокаутом ГР-сопряженных генов демонстрируют снижение резистентности культур к интенсивному УФ облучению. Это говорит не только о наличии у галоархей аппарата, осуществляющего ГР посредством, в том числе, белков RadA, Mre11 и Rad50, но и о его важности в осуществлении защиты клеток от биоцидного воздействия окислительного стресса и коротковолновых ЭМИ [690-691].

1.6.7. Особенности генетического аппарата

Геном галоархей семейства *Halobacteriaceae* организован в несколько циклических молекул ДНК (цДНК), включающих одну большую хромосому от 0,5 до 5,75 Мб, от 1 до 6 мегаплазмид, размером 100-500 Кб и некоторое количество маленьких плазмид размером от единиц до нескольких десятков Кб. Мегаплазмиды галоархей часто классифицируются как минихромосомы, что

связано с кодируемыми в них генами «домашнего хозяйства» клетки. В частности у *Halobacterium salinarum* мегаплазмиды несут гены некоторых факторов транскрипции, белков аппарата рестрикции-модификации, гены субъединиц цитохром d-оксидазы, гены ферментов биосинтетического аппарата нуклеотидов и др. Также, минихромосомы часто несут гены некоторых функциональных РНК, гены аппарата биосинтеза характерных галоархеям газовых везикул, обеспечивающих свободное передвижение клеток галобактерий в толще воды, необходимое для интенсификации процессов кислородного дыхания и фотосинтеза, а также гены редуктаз и белков транспортных механизмов ионов тяжелых металлов [3, 692-693]. Галоархеальным геномам, как и геномам многих экстремофилов, свойственен высокий процент GC-участков. Анализ доступных полногеномных последовательностей демонстрирует, что в средний процентный GC-состав геномов галофильных архей варьируется в диапазоне 60 - 70%. Как правило, минихромосомы характеризуются меньшим процентным содержанием GC-пар [3, 692].

Классический модельный экстремальный галофил *Halobacterium salinarum* NRC-1 имеет геном размером 2 571 010 пар оснований (п.о.), организованный в три молекулы циклической ДНК: большую хромосому размером 2014239 п.о. и две минихромосомы pNRC100 (191346 п.о.) и pNRC200 (365425 п.о.). Также, в клетке *Hbt. salinarum* NRC-1 может быть обнаружено несколько маленьких вариабельных цДНК, образующихся из делецированных фрагментов минихромосомы pNRC100. GC-состав главной хромосомы *Hbt. salinarum* NRC-1 равен 67,9%, минихромосом pNRC100 и pNRC200 – 57,9% и 59,2% соответственно [535, 694].

Геном *Haloarcula marismortui* имеет общую длину последовательности 4274642 п.о. и представлен 9 циклическими репликациями: большой хромосомой Chr I (3131724 п.о.), четырьмя минихромосомами Chr I (288050 п.о.), pNG700 (410554 п.о.), pNG600 (155300 п.о.) и pNG500 (132678 п.о.), и четырьмя плазмидами pNG100 – pNG400 размерами от 33 до 50 Кб. Геном *H. marismortui* характеризуется следующим GC-составом: главная хромосома несет 62,36% GC-

нуклеотидов, GC-состав минихромосом и плазмид варьируется в диапазоне от 54,25% до 60,02% со средним 57% [693].

Геном другой модельной галоархеи *Haloferax volcanii* DS2 представлен пятью цДНК: главной хромосомой (2848 кб), тремя минихромосомами pHV4 (636 кб), pHV3 (438 кб) и pHV1 (85,1 кб) и как минимум одной плазмидой pHV2 (6,35 кб). В общей сложности геном *H. volcanii* имеет длину 4012900 п.о. Также как у других галоархей, главная хромосома отличается большим (66,6%) по сравнению с остальными цДНК (от 55,5% до 65,5%) содержанием GC-нуклеотидов, средний GC-состав в пересчете на весь геном составляет 65% [695]. Другой представитель архей рода *Haloferax* – *Haloferax mediterranei* обладает геномом длиной 3904707 п.о., состоящим из четырех замкнутых репликаонов: главной хромосомы (2949 кб, GC-состав – 61,1%) и трех минихромосом pHM100 (129,2 кб, GC-состав – 57,6%), pHM300 (321,9 кб, GC-состав – 57,6%) и pHM500 (504,7 кб, GC-состав – 57,5%) [696].

Уникальная архея *Haloquadratum walsbyi* обладает не менее уникальным геномом, чьи характеристики в значительной степени отличаются от характеристик геномов типичных представителей экстремально галофильных архей. Геном *H. walsbyi* HBSQ001 представлен двумя цДНК – главной хромосомой (3132494 п.о.) и плазмидой pL47 (46867 п.о.). Интересной особенностью генома *H. walsbyi* HBSQ001 является низкое содержание GC-пар равное 47,9%. Другой отличительной чертой этой галоархеи является низкая плотность структурных генов, составляющая 76% при характерных для других галоархеальных и негалофильных микроорганизмов 86-91% [697].

Основное отличие геномов галофильных бактерий от генов галоархей заключается в меньшей распространенности мегаплазмид. Геномы разных штаммов бактерий родов *Halomonas* и *Chromohalobacter* обладают размерами, варьирующимися в диапазонах 1450 – 2830 кб и 1770 – 2295 Кб соответственно, и состоят из главной хромосомы и одной или нескольких плазмид (до 70 Кб) [3]. Геном экстремально галофильной бактерии *Salinibacter ruber* характеризуется размером в 3587328 п.о. и представлен двумя цДНК – главной хромосомой (3552

кб) с высоким GC-составом равным 66,29% и плазмидой (35,5 кб), содержание GC-нуклеотидов которой составляет 57,9% [545].

Геномы галоархей и галофильных бактерий характеризуются наличием большого количества мобильных генетических элементов (транспозонов и инсерционных последовательностей (ИП)), что является основной причиной их низкой стабильности и высоких скоростей мутаций, наблюдаемых у многих штаммов галофильных микроорганизмов, являющихся следствием частых спонтанных реорганизаций цДНК [3, 698]. Анализ генома *H. salinarum* NRC-1 демонстрирует наличие 91 инсерционной последовательности, принадлежащих к 12 разным семействам [535, 694]. У других представителей галоархей также обнаруживается большое число разных типов инсерционных последовательностей: геном *H. marismortui* содержит порядка 40 ИП, принадлежащие к 14 семействам, а также 49 генов транспозаз, геном *H. volcanii* содержит 102 ИП [693, 695]. Геном экстремально галофильной бактерии *S. ruber* также содержит многочисленные копии генов транспозаз и компоненты профагов [545].

В случае *H. salinarum* порядка 75% мобильных генетических элементов сконцентрированы в АТ-богатых областях генома [535, 694]. Аналогичная картина наблюдается и у *H. volcanii*, у которого порядка 2/3 мобильных генетических элементов принадлежат АТ-богатым участкам генома [695]. Как уже упоминалось, галоархеям свойственен сильно фрагментированный геном, состоящий из главной хромосомы с высоким содержанием GC-нуклеотидов и нескольких мегаплазмид, характеризующихся низким GC-составом. АТ-богатые участки галоархеального генома как правило представлены АТ-богатыми областями главной хромосомы, а также несколькими минихромосомами с минимальным содержанием GC-нуклеотидов, что позволяет сделать предположение, что минихромосомы с такими свойствами служат «местами резервации» мобильных генетических элементов. АТ-богатые мегаплазмиды *H. salinarum* pNRC100 и pNRC2000 несут 69 из 91 ИП (29 и 40 ИП соответственно), в то время как на главной хромосоме базируется остальные 22 ИП. Такие АТ-

богатые области составляют порядка 20% генома *H. salinarum* [3, 535]. Мобильные элементы *H. volcanii* также в основном сконцентрированы на минихромосомах с низким GC-составом - мегаплазмиды pHV4 и pHV1 составляют порядка 18% генома *H. volcanii* и несут в общей сложности 64 из 102 ИП [695]. Локализация мобильных элементов в AT-богатых регионах наблюдается и у *H. marismortui*, мегаплазида pNG500 которой характеризуется минимальным среди минихромосом содержанием GC-нуклеотидов и несет 15 полных и более 10 фрагментов инсерционных последовательностей [693]. Анализ распределения нуклеотидов в геноме *S. ruber* демонстрирует наличие нескольких областей с низким содержанием GC-нуклеотидов, в которых наблюдается локализация большого числа транспозаз и фрагментов профагов [545].

Многие экстремофильные микроорганизмы, как бактерии, так и археи, являются полиплоидами. Клетки галоархей несут множественные копии главных хромосом и некоторых мегаплазмид. Результаты исследований демонстрируют, что на разных этапах клеточного роста в клетках галоархей присутствует разное число геномных копий. Клетки *Hbt. salinarum* и *H. volcanii* в экспоненциальной фазе роста несут по 25 и 20 копий главной хромосомы, в то время как в стационарной фазе копийность хромосом снижается до 15 и 12 соответственно. Стоит отметить, что копийность разных минихромосом и плазмид может также варьироваться или оставаться без изменений на протяжении всего клеточного цикла, что говорит о наличии различных механизмов регуляции числа копий разных цДНК [699].

Геномный анализ многих представителей архей свидетельствует о наличии у данной группы организмов полного набора генов, необходимого для осуществления компактизации генетического материала. Многие представители архей имеют гены ДНК-связывающих белков, чьи продукты классифицируются как археальные гистоны. Электронная микроскопия образованных *in vivo* и *in vitro* комплексов археальных гистонов и ДНК демонстрирует классическую картину «бусин на нити», которую можно увидеть при визуализации нуклеосом эукариотического хроматина. Основа археальной нуклеосомы образована

тетрамером гистонов, который охватывается фрагментом ДНК длиной порядка 90 п.о. Тетрамерные комплексы археальных гистонов способны сворачивать ДНК и вносить как положительную, так и отрицательную сверхспирализацию, что зависит от соотношения количеств взаимодействующих гистонов и ДНК, а также от концентрации солей в цитоплазме [700].

Несмотря на то, что гистоны взаимодействуют с молекулой ДНК посредством ее сахарофосфатного остова, сборка нуклеосомного комплекса осуществляется в определенных локациях геномной ДНК. Места локализации нуклеосом определяются локальной последовательностью ДНК, а также типом образующих тетрамер археальных гистонов. Многие археи имеют множественные гены гистонов, обладающих разной аффинностью к участкам ДНК с разной последовательностью нуклеотидов. Так, связывание гистона с промотором гена будет способствовать ингибированию его транскрипции. Однако в отличие от эукариотического хроматина хроматин галоархей не приводит к полному сайленсингу компактизованных фрагментов генома, а лишь замедляет процесс экспрессии локализованных на данном фрагменте генов. Тем не менее, ввиду того, что экспрессия разных типов ареальных гистонов осуществляется в разное время клеточного цикла и зависит от внешних условий, нуклеосомы принимают непосредственное участие в процессах регуляции транскрипции у архей [701-702].

1.7. Особенности питания и метаболизма

1.7.1. Метаболизм галофильных архей

Галоархеи являются преимущественно аэробными гетеротрофами. Разные представители семейства *Halobacteriaceae* характеризуются разными требованиями по отношению к составу ростовых сред. Некоторые галобактерии демонстрируют хорошие ростовые показатели на олигокомпонентных синтетических средах. Однако оптимальными для роста многих галоархей являются комплексные органические субстраты, содержащие в своем составе аминокислоты, белки, сахара, нуклеотиды и некоторые ростовые факторы, например, витамины. Галобактерии являются продуцентами широкого спектра

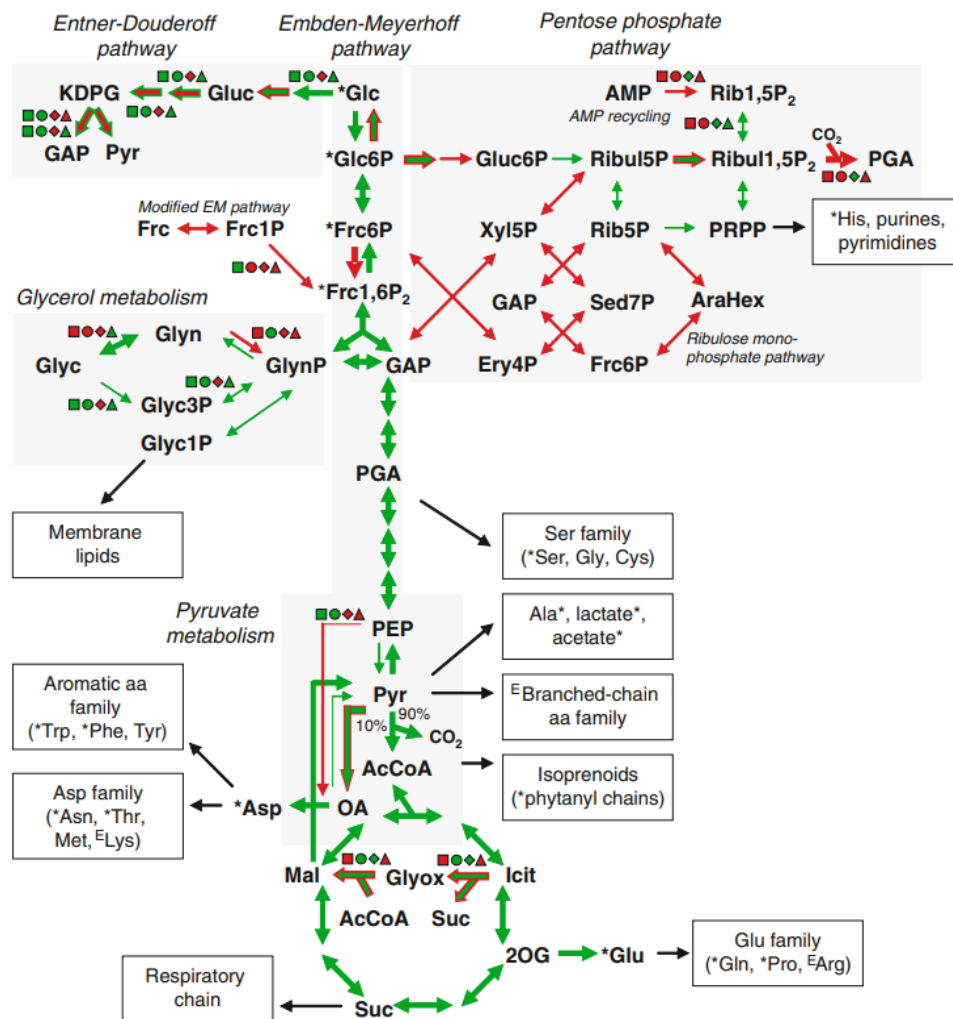


Рисунок 1.6. Пути центрального метаболизма галоархей [703]. Стрелки отображают биохимические реакции, реконструированные для референтных видов *Hbt. salinarum* (зеленый цвет стрелки обозначает ее наличие у *Hbt. salinarum*, красный – отсутствие). Геометрические символы отображают различия в наборах генов ферментов четырех исследуемых архей: *H. marismortui* (квадрат), *H. walsbyi* (круг), *N. pharaonis* (ромб), *Hbt. salinarum* (треугольник); зеленый цвет фигуры означает наличие в геноме археи гена соответствующего фермента, красный – его отсутствие. Реакции, которые были подтверждены экспериментально у *H. salinarum* обозначены жирными стрелками. Те реакции, наличие которых было подтверждено экспериментально, однако генов ферментов их опосредующих на данный момент обнаружено не было, обозначены жирными зелеными стрелками с красным контуром. Те реакции, наличие которых не было подтверждено экспериментально, однако гены ферментов их опосредующих были обнаружены, обозначены жирными красными стрелками с зеленым контуром. Символом «*» обозначены соединения, идентифицированные в клетках *Hbt. salinarum* экспериментально. Незаменимые для *Hbt. salinarum* аминокислоты обозначены символом «^E».

Соединения: AraHex—D-арабино-3-гексулоза-6P, Ery4P—эритроза-4P, Frc—фруктоза, GAP—глицеральдегид-3P, Glc—глюкоза, Gluc—глюконовая к-та, Glyn—дигидроксиацетон, Glyc—глицерин, Glyox—глиоксиловая к-та, Icit—изолимонная к-та, KDPG—2-дегидро-3-деокси-6-фосфоглюконовая к-та, Mal—яблочная к-та, OA—оксалоацетат, 2-OG—2-оксоглутарат, PEP—фосфоенолпируват, PGA—3-фосфоглицерат, Pyr—пируват, Rib5P—рибозо-5P, Ribul5P—рибулозо-5P, Suc—янтарная к-та, Xyl5P—хксилулозо-5P, Sed7P—седугептулозо-7-фосфат, AcCoA—ацетил-CoA.

гидролитических ферментов, позволяющих им разлагать сложную органику

растительного или животного происхождения на легко усваиваемые компоненты. Продуцируемые галобактериями ферменты способны осуществлять гидролиз не только распространенных биомолекул, таких как белки, полисахариды и липиды, но и трудно разлагаемые гетерополимеры сложного строения типа лигноцеллюлозы или хитина (см. далее раздел 1.9.1.1).

Halobacterium salinarum наряду с *Haloarcula marismortui* и *Haloferax volcanii* являются классическими модельными галобактериями и повсеместно используются многими исследователями для изучения метаболизма галоархей. Благодаря стремительному развитию технологий секвенирования и других методов молекулярной биологии, а также подходов к биоинформатическому анализу больших объемов биологических данных, на данный момент известно большое количество успешных попыток создания и экспериментальной верификации метаболических моделей разных галобактерий, что позволяет произвести системную оценку возможностей метаболизма представителей конкретного вида и сравнительный анализ метаболических сетей разных видов микроорганизмов [703-707].

Путь Эмбдена – Мейергофа (гликолиз) является основным метаболическим путем деградации глюкозы. Ключевым ферментом данного пути является 6-фосфофруктокиназа. Однако ген данного фермента, а также гены его археальных аналогов не были обнаружены в геноме модельных галобактерий. Интересной особенностью данных микроорганизмов является отсутствие части гликолитического пути, осуществляющей деградацию гексоз. Некоторые галоархеи, в частности представители рода *Haloarcula*, способны осуществлять деградацию фруктозы посредством археального модифицированного пути Эмбдена – Мейергофа [703, 708-713]. Галобактерии рода *Haloarcula* также способны утилизировать другие сахара, о чем свидетельствует наличие в их геноме генов ферментов разнообразных метаболических путей и трансмембранных переносчиков, осуществляющих транспорт углеводов в клетку [712]. Триозная часть гликолитического пути активна у галоархей. Гены ферментов, необходимых для функционирования данного фрагмента пути

Эмбдена – Мейергофа, обнаружены у всех галоархей, для которых были секвенированы полногеномные последовательности [703, 708].

Несмотря на то, что многие галобактерии утратили способность утилизировать сахара, углеводы являются важной частью их метаболизма и принимают непосредственное участие в процессах биосинтеза археальных гликолипидов, экзополисахаридов, гликозилировании белков, в частности белков S-слоя, флагеллинов и др. (см. раздел 1.6.1). Образование моносахаридов в галоархеальных клетках опосредуется обратным путем Эмбдена – Мейергофа (глюконеогенезом), в результате которого из пирувата образуется фосфорилированная глюкоза. Гены обратного пути Эмбдена – Мейергофа также были обнаружены у многих галобактерий [703, 708].

Другой метаболический путь, при помощи которого клетки галоархей способны утилизировать глюкозу – путь Энтнера – Дудорова (КДФГ-путь, путь окисления глюкозы). При прохождении данного пути молекула глюкозы конвертируется в молекулу 2-кето-3-дезоксиглюконата (КДГ), которая фосфорилируется с образованием 2-кето-3-дезоксиглюко-6-фосфоглюконата (КДФГ) и расщепляется КДФГ-альдолазой на пируват и глицеральдегид-3-фосфат [708, 714]. У некоторых галобактерий наблюдается отсутствие пути Энтнера – Дудорова в описанном варианте. Геномный анализ *Hbt. salinarum*, *H. marismortui* и *H. walsbyi* свидетельствует о наличии у всех трех организмов генов белков, опосредующих археальный вариант пути окисления глюкозы, в соответствии с которым молекула КДГ без фосфорилирования расщепляется с образованием пирувата и глицеральдегид-3-фосфата археальной КД(Ф)Г-альдолазой [703, 708, 715]. У *H. marismortui* и *H. walsbyi* обнаружена также КДФГ-альдолаза бактериального типа, что говорит о возможности протекания в клетках данных микроорганизмов археального и бактериального вариантов КДФГ-пути. *Hbt. salinarum* лишена КДФГ-альдолазы бактериального типа и, несмотря на наличие генов всех необходимых ферментов для осуществления КДФГ-пути археального типа, не способна расти на глюкозе как единственном углеродном субстрате.

Археи, не способные утилизировать углеводы, такие как *N. pharaonis*, в процессе эволюции полностью утратили гены ферментов КДФГ-пути [703].

Гены белков пентозофосфатного пути (ПФ) у галоархей отсутствуют. Однако тот факт, что некоторые галоархеи проявляют глюкоза-6-фосфатдегидрогеназную активность, несмотря на отсутствие гена глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы, говорит о вероятном наличии у этих микроорганизмов аналога ПФ пути [703, 708, 716-717]. Неокислительная часть ПФ пути, используемая бактериями для синтеза пентоз, также наблюдается у некоторых архей, однако отсутствует у галобактерий. Отсутствие у галоархей неокислительной части ПФ пути подразумевает отсутствие механизмов биосинтеза C_4 -сахаров, которые являются прекурсорами ароматических аминокислот (для их синтеза галобактерии используют другой путь), и рибулозодифосфата – субстрата рибулозобифосфаткарбоксилазы (Рубиско), необходимой для осуществления фиксации углекислого газа посредством ПФ пути [716]. Активность Рубиско была обнаружена в клетках некоторых галоархей [711, 718]. Анализ галобактерий также свидетельствует о наличии у некоторых представителей данной группы микроорганизмов археального типа этого фермента [719]. Стоит отметить, что рибулоза-1,5-дифосфат синтезируется археями из 5-фосфо-D-рибозил-1-пирофосфата [720].

Глицерин является распространенным источником углерода в гиперсоленых экосистемах благодаря водорослям рода *Dunaliella*, которые накапливают его в качестве осмопротектора [3]. Галобактерии способны метаболизировать глицерин посредством его фосфорилирования глицеролкиназой с образованием глицерол-3-фосфата, который далее при участии глицерол-3-фосфатдегидрогеназы превращается в дигидроксиацетонфосфат (ДГАФ), который далее может быть изомеризирован в глицеральдегид-3-фосфат и утилизирован посредством триозной части пути Эмбдена – Мейергофа, глюконеогенезе или для биосинтеза липидов [721].

Порядка 90% пирувата, образующегося в клетках галобактерий, превращается пируват:ферродоксин-оксидоредуктазой в ацетил-СоА и

утилизируется в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) [722-723]. В геномах галобактерий обнаружен полный набор генов белков, необходимых для функционирования ЦТК [703-707]. В процессе роста на ацетате, как единственном источнике углерода, некоторые галоархеи способны задействовать глиоксилатный шунт. Гены ферментов изоцитратлиазы и малатсинтазы обнаружены в геномах галоархей *N. pharaonis* и *H. walsbyi*. У *H. salinarum* гены обоих белков отсутствуют [703, 724]. Оставшиеся 10% пирувата конвертируются клеткой в оксалоацетат (ОА), который расходуется на биосинтез некоторых аминокислот [723]. Галоархеи не имеют археального типа пируваткарбоксылазы и, вероятно, осуществляют биосинтез ОА из фосфоенолпирувата (ФЕП), гены карбоксылаз которого были обнаружены в геномах *H. marismortui* и *H. walsbyi* [697, 703].

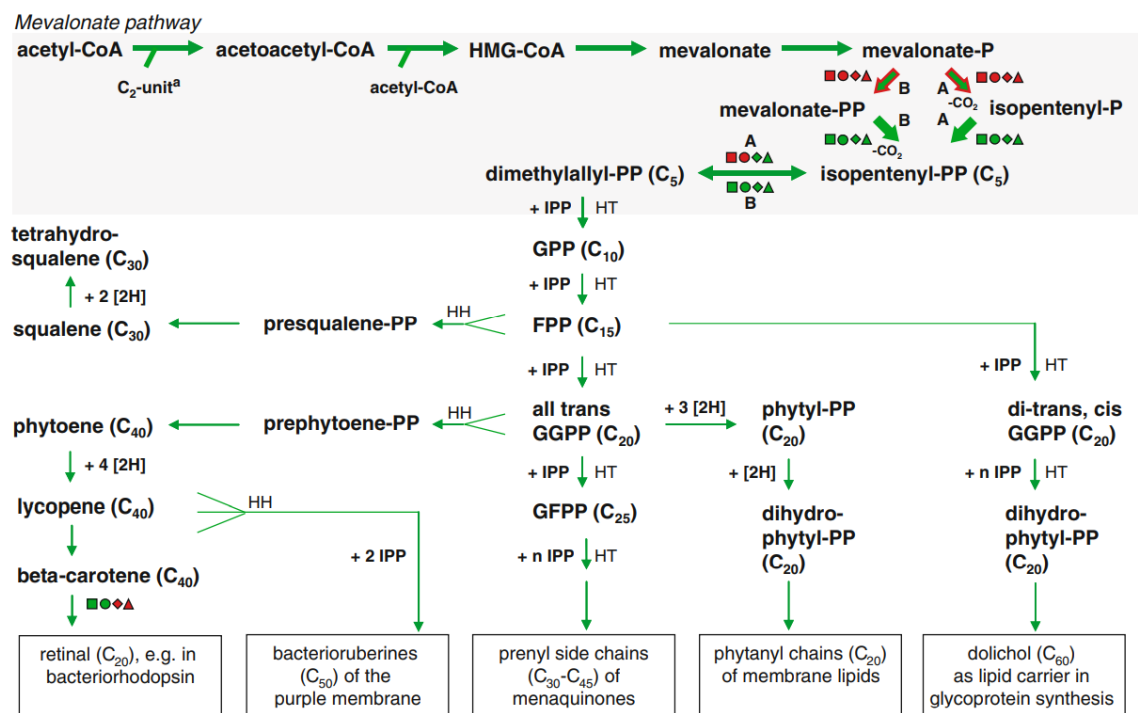


Рисунок 1.7. Путь биосинтеза изопреноидов у галоархей [703]. Стрелки отображают биохимические реакции, реконструированные для референтных видов *Hbt. salinarum*. Геометрические символы отображают различия в наборах генов ферментов четырех исследуемых архей: *H. marismortui* (квадрат), *H. walsbyi* (круг), *N. pharaonis* (ромб), *H. salinarum* (треугольник); зеленый цвет фигуры означает наличие в геноме археи гена соответствующего фермента, красный – его отсутствие. Реакции, которые были подтверждены экспериментально у *H. salinarum* обозначены жирными стрелками. Те реакции, наличие которых было подтверждено экспериментально, однако генов ферментов их опосредующих на данный момент обнаружено не было, обозначены жирными зелеными стрелками с красным контуром. Бактериальные варианты ферментов обозначены символом «^B», археальные – «^A».

Жирнокислотный состав полярных липидов галоархеальных цитоплазматических мембран представлен мультиметилированными жирными кислотами (C_{20} и C_{25}). Неполярная липидная фракция мембран галобактерий включает различные изопреноиды: бактериоруберины (C_{50} -каротиноиды), C_{40} -каротиноиды, сквалены (C_{30}), менахиноны (C_{40}), долихол (C_{60}), ретиналь (C_{20}) и др. (см. раздел 1.5). Мультиметилированные жирные кислоты и соединения изопреноидной природы синтезируются в галобактериальных клетках из продуктов мевалонатного пути [631, 639, 703, 726]. Археальный мевалонатный путь биосинтеза на сегодняшний день не до конца изучен, в частности обнаружены гены не всех белков бактериального варианта данного метаболического пути. Анализ геномов некоторых галобактерий свидетельствует о наличии у них археальных типов некоторых бактериальных ферментов мевалонатного пути, а также уникальных ферментов, осуществляющих реакции, альтернативные бактериальным реакциям [631, 727-729]. Продуктами мевалонатного пути биосинтеза являются активированные C_5 -единицы (IPP): изопентенилпирофосфат (ИППФ) и диметилаллилпирофосфат (ДМАПФ), -прекурсоры изопреноидов. ИППФ и ДМАПФ конденсируются «голова-к-хвосту» посредством пренилтрансфераз и образуют геранилпирофосфат (ГПФ, C_{10}). В результате конденсации «голова-к-хвосту» молекулы ГПФ с еще одной молекулой ИППФ образуется фарнезилпирофосфат (ФПФ, C_{15}). Конденсация двух молекул ФПФ «голова-к-голове» способствует образованию прескваленпирофосфата (C_{30}) – прекурсора скваленов. Дальнейшее удлинение молекулы ФПФ посредством конденсации «голова-к-хвосту» с молекулой ИППФ приводит к образованию геранилгеранилпирофосфата (ГГПФ, C_{20}), который может быть полностью гидрирован с образованием дигидрофитанилпирофосфата и использован для биосинтеза мембранных липидов, либо, в зависимости от типа пространственной конфигурации молекулы, использован для биосинтеза других соединений. Ди-транс, цис-ГГПФ используется клетками для синтеза долихола (C_{60}), а две молекулы транс-ГГПФ посредством конденсации «голова-к-голове» образуют префитоинпирофосфат (C_{40}), являющийся прекурсором фитоина, из

которого в дальнейшем синтезируются C₄₀- и C₅₀-каротиноиды. Один дополнительный этап удлинения молекулы ГППФ приводит к образованию геранилфарнезилпирофосфата (ГФПФ, C₂₅), в результате полного гидрирования которого образуется дигидросестертерпанилпирофосфат – C₂₅-радикал мембранных липидов. Дальнейшее удлинение ГФПФ посредством конденсации «голова-к-хвосту» с молекулами ИППФ способствует образованию боковых изопреноидных цепей менахинонов (C₃₀-C₄₅) [631, 703, 728].

Неразветвленные жирные кислоты, характерные для бактериальных и эукариотических липидов, не участвуют в образовании мембранных липидов архей, однако используются для ацилирования археальных трансмембранных белков [730-731]. Гены белков, которые, вероятно, опосредуют механизм β-окисления жирных кислот, были обнаружены у многих галобактерий. Тем не менее лишь некоторые галоархеи проявляют способность расти исключительно на жирных кислотах [703, 732-733].

Как уже говорилось ранее, разные представители семейства *Halobacteriaceae* разительно отличаются требованиями к природе и комплексности ростовых субстратов. *Hbt. salinarum* является крайне требовательным по отношению к источникам питательных веществ микроорганизмом и хорошо растет на комплексных питательных средах на основе белковых гидролизатов и дрожжевого экстракта. Оптимальные синтетические питательные среды для разных изолятов *Hbt. salinarum* помимо минеральных солей содержат от 10 до 21 разных аминокислот в качестве органических источников углерода и азота, до 5 нуклеотидов, глицерин и разные комбинации витаминов. Представители родов *Haloferax* и *Haloarcula*, напротив, не нуждаются в наличии белков или аминокислот и демонстрируют рост на синтетических средах, единственным источником углерода и энергии в которых являются простые органические соединения, такие как моно- и дисахариды, ацетат, сукцинат и др., а остальные биогенные, макро- и микроэлементы в виде неорганических солей входят в минеральную основу среды (см. далее в разделе 1.9.1.1).

Результаты геномного анализа *Hbt. salinarum* свидетельствуют о том, что данная галоархея утратила гены белков, отвечающих за биосинтез некоторых аминокислот, и является ауксотрофным микроорганизмом. *Hbt. salinarum* не способна синтезировать такие аминокислоты, как валин, лейцин, изолейцин, лизин и аргинин [535, 703-705]. Также, экспериментально подтверждено, что данная галобактерия способна осуществлять биосинтез глутаминовой кислоты, глутамина, пролина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, аланина, серина, фенилаланина, триптофана и гистидина [723, 734-736]. У неауксотрофных по аминокислотам галобактерий с известными на данный момент полногеномными последовательностями идентифицированы гены всех белков, ответственных за биосинтез аминокислот [703]. Археальный аппарат аминокислотного синтеза во многом идентичен таковому у бактерий [725].

Глутаминовая кислота синтезируется галоархеями из α -кетоглутаровой кислоты – интермедиата ЦТК. Гены глутаматдегидрогеназы – фермента, катализирующего прямую и обратную реакции превращения глутаминовой кислоты в α -кетоглутаровую кислоту, были обнаружены у многих галобактерий. Глутаминсинтетаза, катализирующая реакцию аминирования глутаминовой кислоты с образованием глутамина, также обнаружена у всех известных галоархей [703, 725]. Путь синтеза пролина из глутаминовой кислоты через промежуточный продукт – L-глутамат-5-полуальдегид, известен у архей родов *Natronomonas* и *Haloquadratum* и отсутствует у представителей родов *Halobacterium* и *Haloarcula*, которые синтезируют пролин альтернативным образом при помощи реакций, опосредуемых ферментами 1-пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназой и пролиндегидрогеназой [703, 723, 725]. Также, галорахеи могут синтезировать пролин посредством циклизации орнитина, катализируемой орнитинциклодеаминазой, гены которой обнаружены у всех галоархей [703, 737]. Аргинин синтезируется галобактериями в ходе цикла мочевины из орнитина. У ауксотрофной по аргинину *H. salinarum* аппарат биосинтеза аргинина полностью утрачен [703].

Прекурсором аспарагиновой кислоты является другой интермедиат ЦТК – оксалоацетат. Биосинтез аспарагиновой кислоты осуществляется в ходе реакции трансаминирования, катализируемой ферментом аспартатаминотрансфераза, донором аминогруппы в которой выступает глутаминовая кислота. В клетках бактерий и эукариот биосинтез аланина осуществляется посредством переноса аминогруппы от глутаминовой кислоты, катализируемого аланинаминотрансферазой [725]. На сегодняшний день в галоархеальных геномах не обнаружено генов, которые могли бы принадлежать данному ферменту, однако известно, что у галобактерий рода *Halobacterium* имеются ферменты, катализирующие реакцию трансаминирования пирувата, в которой в качестве донора аминогруппы выступает аспарагиновая кислота [703, 735]. Синтез аспарагина, подобно синтезу глутамина, у галоархей осуществляется посредством аминирования аспарагинсинтазой, гены которой были обнаружены в геномах всех секвенированных галобактерий. Аналогично пути биосинтеза пролина из глутаминовой кислоты, аспарагиновая кислота может быть конвертирована в L-аспартат-полуальдегид, который является прекурсором треонина, метионина и лизина, а также принимает участие в биосинтезе ароматических аминокислот у галобактерий. Гены ферментов, осуществляющих биосинтез треонина из L-аспартат-полуальдегида через L-гомосерин и O-фосфо-L-гомосерин, также имеются у всех известных архей [703]. O-ацетил-L-гомосерин является предшественником гомоцистеина, который в свою очередь является прекурсором метионина и может быть в него превращен посредством реакции, катализируемой кобаламин-независимой метионинсинтазой, гены которой у имеются у многих галоархей [703, 738]. Биосинтез лизина осуществляется археями посредством диаминопимелатного пути, наличие которого было экспериментально подтверждено у некоторых галобактерий [703, 725, 739-740]. В геномах представителей родов *Natronomonas*, *Haloquadratum* и *Haloarcula* также частично или в полном объеме обнаружены гены гомологов бактериальных ферментов данного метаболического пути. Отсутствие некоторых генов у определенных архей ввиду наличия функционирующего пути свидетельствует о наличии

неизвестных археальных не ортологичных бактериальным генов. Ауксотрофные по лизину представители рода *Halobacterium* генов белков данного пути не имеют [703].

Глутаминовая и аспарагиновая кислоты являются наиболее распространенными углеродными субстратами аминокислотной природы и деградируются посредством ЦТК и дыхательной цепи клеток. Многочисленные трансминазы, гены которых обнаружены в геномах разных галофильных архей, позволяют осуществлять реакции с участием аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также других аминокислот их семейств, приводящие к образованию интермедиатов ЦТК, которые далее могут быть утилизированы или использованы клеткой для биосинтеза других соединений [703, 716, 741-742]. Аргинин, продуцируемый в процессе цикла мочевины, может быть трансформирован обратно в орнитин, однако не все галоархеи имеют ген необходимой для осуществления данного процесса аргиназы [743]. На сегодняшний день *H. salinarum* является единственной галоархеей, у которой имеется полный набор генов белков, необходимых для реализации этого пути [744]. *Hbt. salinarum* также реализует уникальный процесс трансформации аргинина в орнитин, сопровождающийся биосинтезом АТФ. Гены ферментов, необходимых для реализации данного метаболического пути у прокариот встречаются крайне редко [705, 743, 745]. Также, аргинин может быть задействован галоархеями для биосинтеза полиаминов – термопротекторов, стабилизирующих ДНК при повышенных температурах [703, 746-748].

Галоархеи синтезируют серин посредством окисления глицерат-3-фосфата – одного из интермедиатов гликолитического пути, до 3-фосфогидроксипировата, который через образование фосфосерина превращается в серин. Гены ферментов, осуществляющих данные превращения, обнаружены у всех модельных галоархей. Глицин из серина образуется в результате реакции, катализируемой гидроксиметилтрансферазой. Гены данного фермента также присутствуют у многих галоархей. Подобно биосинтезу гомоцистеина из гомосерина, синтез цистеина у галоархей осуществляется из серина с образованием промежуточного

продукта О-ацетилсерина, к которому присоединяется сульфидная группа [703, 725].

Биосинтез аминокислот с разветвленными боковыми радикалами у галоархей осуществляется аналогично таковому у бактерий [725]. Гены ферментов путей биосинтеза разветвленных аминокислот, таких как валин, лейцин и изолейцин, обнаружены у архей родов *Natronomonas*, *Haloquadratum* и *Haloarcula*, однако отсутствуют у *Hbt. salinarum* [703]. Деградируются разветвленные аминокислоты микроорганизмами посредством дезаминирования с образованием соответствующих 2-оксокислот, которые далее декарбоксилируются. Образующиеся в результате этих превращений активированные жирные кислоты деградируются с образованием ацетил- и пропионил-СoА [716].

Биосинтез ароматических аминокислот через классический шикиматный путь у галоархей невозможен ввиду отсутствия аппарата биосинтеза эритрозы – С₄ сахара, фосфат которой является одним из прекурсоров дегидрохинната – ключевого компонента данного пути биосинтеза [703, 708, 749]. В клетках архей реализуется модифицированный шикиматный путь, в процессе которого биосинтез 3-дегидрохинната осуществляется из L-аспаратполуальдегида и 6-деокси-5-кетофруктоза-1-фосфата (ДКФФ). За исключением шага биосинтеза дегидрохинната, этапы модифицированного шикиматного пути, свойственного археям, соответствуют этапам классического пути [750]. Анализ галобактериальных геномов демонстрирует наличие генов всех необходимых ферментов для синтеза ароматических аминокислот фенилаланина, тирозина и триптофана [703]. Также, факт *de novo* биосинтеза фенилаланина и триптофана экспериментально подтвержден у *Hbt. salinarum*. Биосинтез гистидина также экспериментально подтвержден у *Hbt. salinarum* [734, 736]. Гены всех ферментов, необходимых для биосинтеза гистидина из рибозо-5-фосфата, за исключением гистидинолфосфатазы, у которой, вероятно, существует археальный не ортологичный бактериальному аналог, были обнаружены в галоархеальных геномах [703]. Утилизация гистидина осуществляется через урокановый

метаболический путь, гены ферментов которого в полном объеме обнаружены в геномах многих галоархей [703, 751]. Триптофан утилизируется посредством трансформации в индол или антраниловую кислоту, катализируемой уникальными археальными ферментами – триптофаназой и кинурениазой [703, 716]. В геномах модельных галоархей обнаружены гены L-тирозинкарбоксилазы, используемой археями-метаногенами для биосинтеза метанофурана из тирозина [703, 752]. Также, у галоархей обнаружены гены многочисленных диоксигеназ ароматических соединений [703].

1.7.2. Метаболизм галофильных бактерий

Галофильные бактерии характеризуются значительно большим метаболическим разнообразием. На сегодняшний день известны галофильные анаэробные и аэробные бактерии-гетеротрофы, кислородные и анакислородные бактерии-фототрофы, фотогетеротрофы и хемолитотрофы (см. раздел 1.3.2.). Представители семейства *Halomonadaceae* традиционно используются как модельные бактерии-галофилы. Бактерии данного семейства отличаются низкими требованиями к ростовым средам и демонстрируют прекрасные ростовые показатели на минеральных средах, содержащих единственный источник углерода, в роли которого могут выступать сахара, аминокислоты, органические кислоты и другие простые органические соединения. Некоторые представители данного семейства способны утилизировать углеводороды, серосодержащие органические соединения, а также галогенпроизводные ароматических углеводородов и фосфорорганические соединения. Некоторые бактерии семейства *Halomonadaceae* являются денитрификаторами [211-224].

Отряд *Halanaerobiales* (класс *Clostridia*) включает два семейства галофильных бактерий анаэробов – *Halanaerobiaceae* и *Halobacteroidaceae*. Бактерии этих семейств ферментируют сахара в анаэробных условиях с образованием этанола, уксусной, масляной, пропионовой, муравьиной кислот, а также водорода и углекислого газа. Также известно, что некоторые из представителей данных семейств утилизируют аминокислоты, а также другие азотсодержащие органические соединения, в том числе нитро- и аминоарены.

Acetohalobium arabaticum способна расти как литоавтотроф на смеси водорода и углекислого или угарного газов, или как органотроф на разнообразных аминокислотах и органических кислотах. Многие анаэробные галофилы отряда *Halanaerobiales* способны использовать серу в разных степенях окисления (кроме S^{2-}) в качестве конечного акцептора электронов [293, 295-297].

1.7.3. Родопсины

Светочувствительные трансмембранные протеины играют важную роль в жизни микроорганизмов, поскольку обеспечивают создание индуцируемых светом химических и электрохимических трансмембранных градиентов, а также опосредуют способность микроорганизмов к фототаксису. Бактериродопсин (БР) галоархей *Hbt. salinarum* был обнаружен порядка 50 лет назад и стал модельным белком для изучения родопсинов. С тех пор разные светочувствительные родопсиноподобные белки были обнаружены у многих микроорганизмов, принадлежащих к археальному, бактериальному и эукариотическому доменам [3, 693, 753-757]. В частности, *Hbt. salinarum* продуцирует четыре разных белка, которые могут быть разделены на две группы: ионные помпы, создающие ионный градиент, которыми являются БР и хлоридная помпа галородопсин (ГР), и сенсорные родопсины СРІ и СРІІ – фоторецепторы, задействованные в процессе фототаксиса клеток [758-761].

Молекулы родопсинов состоят из апопротеина бактериоопсина, ковалентно связанного с молекулой ретиналя. Пространственная структура родопсинов представлена семью соединенными петлями трансмембранными α -спиралями (А-Г), формирующими канал, в глубине которого располагается молекула ретиналя, ковалентно связанная с ϵ -аминогруппу лизина G-спирали посредством основания Шиффа в протонированном состоянии. В случае БР *Hbt. salinarum* и археородопсинов AP-1 и AP-2 архей рода *Halorubrum* ретиналь ковалентно связан с Lys216. В ГР *Hbt. salinarum* ретиналь связан с Lys242, а в СРІ и СРІІ – с Lys205 и Lys202 соответственно. Сравнение доступных пространственных структур родопсинов демонстрирует их высокую консервативность вне зависимости от выполняемых функций и филогенетической принадлежности микроорганизма-

продуцента. Сравнение аминокислотных последовательностей разных родопсинов демонстрирует высокую консервативность обращенных внутрь канала регионов спиралей В, С и G, а также мотива ароматических аминокислот, формирующих сайт локализации молекулы ретиналя. Спирали Е и F являются менее консервативными. Наиболее вариативными регионами являются петли [753].

В молекулах родопсинов присутствуют два ключевых аминокислотных остатка – акцептор и донор протона, которые принимают участие в операциях де- и репротонирования основания Шиффа, ковалентно связывающего ретиналь с высоко консервативным лизином. Природа этих аминокислотных остатков определяет выполняемые родопсином функции: протонная помпа, хлорид-ионная помпа или сенсорный ретиналь. В БР и АР, которые являются протонными помпами, акцептором и донором протона являются Asp85 и Asp96 соответственно, карбоксильные группы которых способны осуществлять быструю передачу протонов [753]. У галородопсинов, выполняющих функции хлоридных насосов у разных микроорганизмов, донором протона является остаток аланина, а акцептором – остаток триптофана. Наличие остатка аминокислоты с гидрофобным радикалом на месте донора протона в значительной степени замедляет процесс репротонирования основания Шиффа, что позволяет родопсину длительное время оставаться в «транслирующем сигнал» состоянии [731, 753, 762]. У сенсорных родопсинов в позиции акцептора протона находится консервативная аспарагиновая кислота, в то время как в позиции донора протона может находиться тирозин, фенилаланин или глутаминовая кислота [753].

Родопсины поглощают свет в широком волновом диапазоне. Каждый отдельно взятый белок демонстрирует максимальное поглощение при определенной длине волны. В соответствии с конфигурацией ретиналя, родопсины могут находиться в одном из двух состояний: темновой или световой адаптации. В состоянии темновой адаптации порядка 2/3 молекул ретиналя, ассоциированных с БР *H. salinarum* находятся в цис-конфигурации. Облучение БР светом с длиной волны 558 нм индуцирует его переход в состоянии световой адаптации, в котором все молекулы ретиналя принимают транс-конфигурацию, в

результате чего инициируется фотоцикл БР. Релаксация в состояние темновой адаптации занимает порядка 10 мс и подразумевает завершение фотоцикла БР, в процессе которого белок последовательно проходит через несколько стабильных промежуточных состояний [753, 763-765]. Аналогичная реакция на световое возбуждение свойственна другим археальным и бактериальным родопсинам. Галородопсин *Hbt. salinarum* демонстрирует максимум адсорбции света при длине волны 578 нм. В состоянии темновой адаптации порядка 65% ретиналей ГР находятся в цис-конфигурации, в состоянии световой адаптации 75% ретиналей принимают транс-конфигурацию. Не все родопсины демонстрируют изменение конфигураций ретиналя в состояниях темновой и световой адаптации. Вне

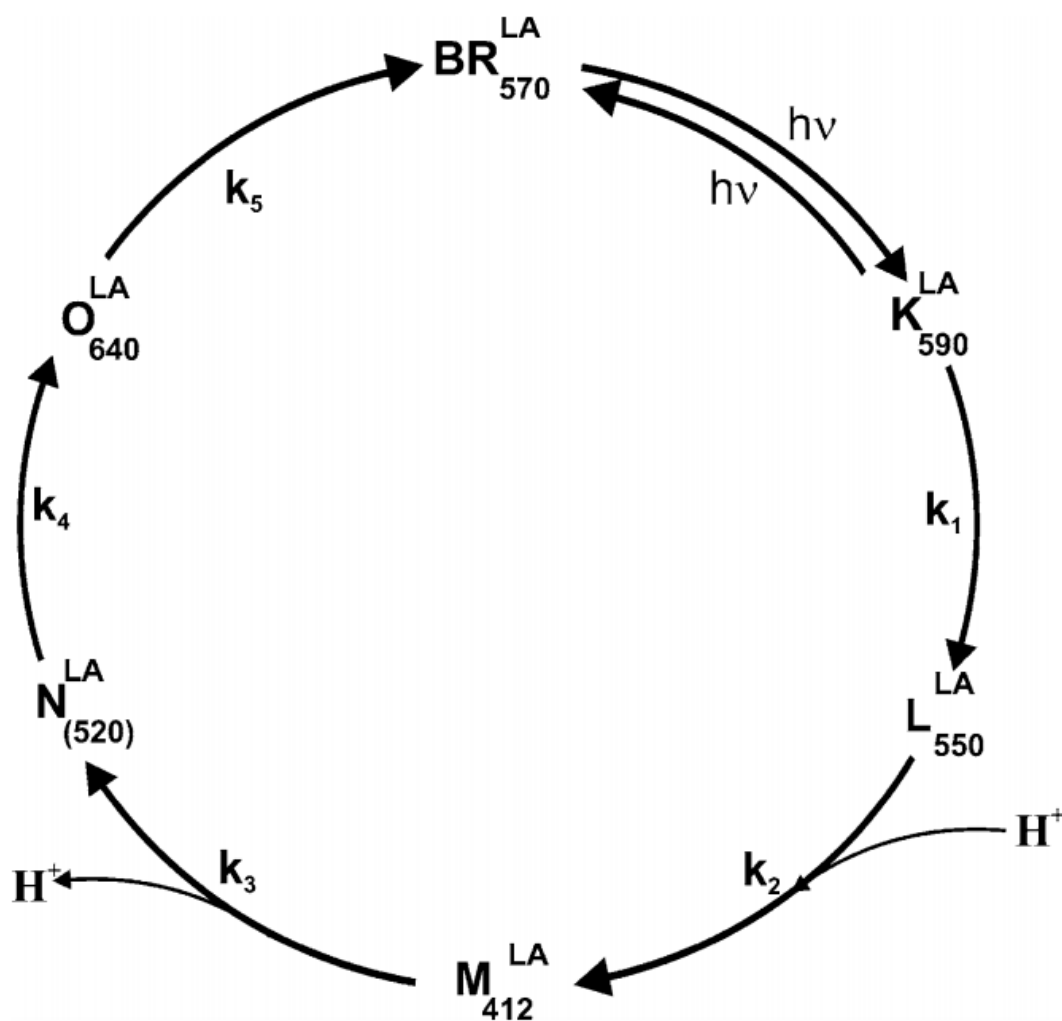


Рисунок 1.8. Модель фотоцикла бактериородопсина *Hbt. salinarum* [753].

зависимости от состояния 85% ретиналей ГР *Natronomonas pharaonis* находятся в транс-конфигурации [766-767]. Сенсорные родопсины, являющиеся светочувствительными рецепторами микроорганизмов, также как и БР, АР и ГР переходят в возбужденное состояние при воздействии света с определенной длиной волны. Однако, продолжительность фотоцикла СР может на несколько порядков превосходить продолжительность фотоцикла родопсинов, выполняющих функцию ионного насоса. Например, продолжительность фотоцикла СР1 *Hbt. salinarum* составляет 800 мс [753].

Первая модель фотоцикла БР была разработана Лозиером и его коллегами в 1975 году и описывала пять промежуточных состояний, сменявших друг друга [768]. Дальнейшие исследования фотоцикла БР позволили установить, что М-стадия включает два интермедиата: M_1 и M_2 , причем M_2 образуется из M_1 в результате необратимого процесса. Стадия М имеет крайне важное значение, поскольку в момент ее реализации осуществляется репротонирование основания Шиффа, индуцирующее конформационные изменения, в результате которых основание становится недоступно со стороны внеклеточного участка канала БР и открывается со стороны цитоплазмы клетки. Данные конформационные изменения лежат в основе модели направленного переноса протонов (и других ионов) через мембрану посредством БР: один протон реализуется на внешней стороне мембраны на М-стадии фотоцикла, на О-стадии другой протон забирается с внутренней стороны мембраны [3, 753, 769-771]. Последовательность событий, происходящих в процессе фотоцикла БР и опосредующих перенос протона, включает пять ключевых этапов [3, 753, 771]:

- Депротонирование основания Шиффа и передача протона Asp85;
- Высвобождение протона из сайта реализации протона в канал БР на внешней стороне цитоплазматической мембраны;
- Репротонирование основания Шиффа, донор протона – Asp96;
- Связывание протона Asp96 на внутренней стороне мембраны;
- Передача протона от Asp85 к сайту реализации протона.

Hbt. salinarum продуцирует БР в больших количествах. В определенных условиях красная благодаря большим количествам бактериоруберина в красных мембранах (КМ) культура *Hbt. salinarum* принимает фиолетовый оттенок, что свидетельствует об активном биосинтезе БР [772-773]. Другие галофильные микроорганизмы также продуцируют родопсины, выполняющие функции ионных насосов, однако в меньших количествах [774-776]. В клетках *Hbt. salinarum* БР агрегирован в пурпурные мембраны (ПМ) – фрагменты цитоплазматической мембраны, характеризующиеся иным липидным составом и физико-химическими свойствами. В составе ПМ молекулы БР ассоциированы в тримеры, которые образуют псевдокристаллическую двухмерную гексагональную гранецентрированную решетку [777-778]. ПМ *Hbt. salinarum* характеризуются высоким содержанием белка. Порядка 77% веса ПМ приходится на долю белка массой 26 кДа – бактериородопсин, 20% составляют липиды. КМ содержат 56% белка и 38% липидов. Белковая фракция КМ *Hbt. salinarum* представлена разнообразными белками массой от 10 до 60 кДа, однако белки массой 26 кДа в ней отсутствуют. Липидный состав красных и пурпурных мембран *Hbt. salinarum* во многом схож. Липидные фракции обоих типов мембран в основном представлены фосфатидилглицерофосфатом (56%) и фосфатидилглицерином (3 – 4%), а также нейтральными липидами (7 – 9%). Основным отличием ПМ является наличие сульфатированных липидов, в частности, сульфатированных гликолипидов и фосфатидилглицеросульфата [779].

Физиологическая роль ПМ в галобактериальной клетке заключается в создании протонного трансмембранного градиента совместно с электрон-транспортной цепью. Трансмембранный протонный градиент является движущей силой процессов синтеза АТФ, трансмембранного транспорта ионов и некоторых органических соединений, а также цитотаксиса (см. раздел 1.6.2). Активный биосинтез ПМ у *Hbt. salinarum* индуцируется в микроаэрофильных условиях и/или при интенсивном освещении [780]. Биосинтез БР находится под управлением генов *bop*-оперона. Данный оперон включает по меньшей мере 3 гена: *bop* – ген бактериоопсина, *brp* и *bat*. Интенсивное освещение и низкие

концентрации кислорода в среде индуцируют экспрессию генов *bop*-оперона. Интенсивное освещение индуцирует экспрессию данных генов даже в условиях избытка кислорода. Также для генов *bop*-оперона характерно изменение уровня экспрессии в зависимости от стадии роста и вне зависимости от условий роста культуры: выращивание *Hbt. salinarum* при интенсивной аэрации в отсутствии света демонстрирует низкие уровни транскрипции генов *bop* и *bat* в экспоненциальной фазе и их увеличение в 29 и 45 раз соответственно в стационарной фазе роста. Изменения уровня транскрипции гена *brp* в процессе роста культуры в данных условиях не наблюдается. Исходя из экспериментальных данных было сделано предположение, что продукты генов *brp* и *bat* принимают участие в регуляции экспрессии гена бактериоопсина. Делеция обоих генов способствует конститутивной экспрессии *bop*, а индуцирование биосинтеза ПМ в микроаэрофильных условиях наблюдается исключительно при наличии активного *bop*-оперона в геноме продуцента. Предполагается, что регуляция экспрессии гена *bop* осуществляется в соответствии со следующей моделью [781-784]:

- экспрессия гена *bat* индуцируется в микроаэрофильных условиях, продукт гена *bat* активирует экспрессию гена *bop*;
- интенсивное освещение индуцирует экспрессию гена *brp*, продукт которого усиливает или модулирует экспрессию гена *bat*.

Продукт гена *brp* также принимает участие в регуляции трансформации β -каротина в ретиналь. Анализ генома *Hbt. salinarum* демонстрирует, что процессы биосинтеза бактериоопсина и ретиналя тесно связаны, зависят от интенсивности освещения и аэрации культуры и регулируются в рамках общего регулона [643, 785-786].

1.7.4. Цитотаксис

Давно известно, что многие галофильные бактерии и археи обладают способностью передвигаться в водной толще благодаря наличию жгутиков у их клеток. Бактериальные и археальные жгутики имеют разное строение, однако сравнительный анализ имеющихся полногеномных последовательностей

галофильных бактерий и архей демонстрирует сильное сходство бактериальных и археальных цитотаксических систем передачи сигнала [3, 753, 787-788]. Способность к фото- и хемотаксису была описана у многих галоархей. *Natronomonas pharaonis* обладает способностью реагировать на световые и химические сигналы и координировать движение в соответствии с ними [789-790]. *Hbt. salinarum* является галоархеей, чьи способности к фото- и хемотаксису изучены наиболее подробно. Известными аттрактантами для этой галобактерии являются аминокислоты, некоторые осмопротекторы, высокие концентрации растворенного кислорода и оранжевый свет [3, 753, 791-795]. Синий свет и УФ излучение характеризуются как фоторепелленты *Hbt. salinarum* [3, 753, 795]. Наличие разнообразных цитотаксических систем позволяет клеткам *Hbt. salinarum* активно перемещаться в среде обитания, реагируя на благоприятные сигналы и избегая негативных воздействий. *Hbt. salinarum* имеет два сенсорных родопсина – СРІ и СРІІ. СРІ демонстрирует максимум поглощения при облучении светом с длиной волны ~600 нм. Этот светочувствительный белок активируется зеленым и оранжевым светом, что позволяет клеткам галобактерий мигрировать в области с максимально благоприятным для БР и ГР освещением и избегать областей с интенсивным УФ излучением, которое являются индуктором клеточных повреждений и способствует образованию активных форм кислорода. СРІІ поглощает свет с длиной волны ~500 нм и реагирует на синий свет, что также позволяет галобактериальным клеткам избегать вредоносного излучения [3, 753, 795]. Благодаря хемотаксическим системам клетки галобактерий способны реагировать на химические сигналы, источником которых являются потенциальные питательные субстраты. Эта способность чрезвычайно важна для *Hbt. salinarum*, так как данные галобактерии являются ауксотрофами по ряду аминокислот, и окружающая среда является единственным источником незаменимых соединений [3, 791-794].

Бактериальные и археальные системы цитотаксиса имеют общий принцип строения: белок-трансдуктор, связанный с белком-рецептором, представляют собой рецептор, который транслирует сигнал о внешнем воздействии

цитоплазматической части цитотаксической системы, которая в свою очередь оказывает воздействие на жгутики клетки. Белки-трансдукторы бывают разных типов. Выделяют три типа археальных белков-трансдукторов [787]:

- тип А – белки-трансдукторы бактериального типа, состоящие из цитоплазматического и периплазматического доменов, соединенных двумя трансмембранными фрагментами;
- тип В – белки-трансдукторы с двумя и более трансмембранными доменами, но лишённые периплазматического домена;
- тип С – белки-трансдукторы, растворимые в цитоплазме и не ассоциированные с цитоплазматической мембраной.

Как уже говорилось ранее, *Hbt. salinarum* имеет два светочувствительных белка СРI и СРII. СРI реагирует на фотоаттрактант - оранжевый свет и фоторепеллент – УФ излучение. СРII реагирует на фоторепеллент – синий свет. Второй компонент галобактериального фоторецептора – фототаксический белок-трансдуктор (HtrI). HtrI гомологичен бактериальным метил-акцепторным хемотаксическим белкам (МХБ). Аналогично МХБ, HtrI имеет трансмембранный участок, представленный двумя спиралями, цитоплазматический участок, ответственный за связывание с гистидинкиназой, и фланкирующие участки, несущие сайты метилирования. Основное его отличие от бактериальных МХБ заключается в отсутствии внеклеточного лиганд-связывающего домена, вместо которого HtrI связан непосредственно с молекулой родопсина. HtrII является белком-трансдуктором, ассоциированным с сенсорным родопсином *N. pharaonis*, и имеет несколько иной принцип функционирования. HtrII не связан ковалентно с сенсорным белком и взаимодействует с ним посредством небольшого дополнительного цитоплазматического фрагмента, перекрывающего канал СР, который у *N. pharaonis* функционирует как светозависимая протонная помпа [796-797].

Фототрансдуктор HtrII также оснащен периплазматическим доменом, который позволяет функционировать ему как хемотрансдуктору и активироваться в ответ на химическую стимуляцию серином [787]. Анализ генома *Hbt. salinarum*

демонстрирует наличие порядка 18 генов потенциальных белков-хемотрансдукторов [535, 798-799]. Функции продуктов некоторых из них были установлены экспериментально посредством избирательной инактивации генов. Таким образом была определена функция белка *Car Hbt. salinarum* – трансдуктора типа С, который является сенсором аргинина [791]. Высоко гомологичный *Car* белок-трансдуктор *HtrXI*, обнаруженный у штамма *Hbt. salinarum* Flx15, является сенсором глутаминовой и аспарагиновой кислот [800]. Геном *Hbt. salinarum* также содержит пары генов *basB/basT* и *cosB/cosT*, экспрессирующиеся одним транскриптом. Белки *BasT* и *CosT* являются белками-трансдукторами типа А. *BasB* и *CosB* являются связывающими белками, аналогичными таковым АВС-транспортерам. Эти белки позиционируются на внешней стороне цитоплазматической мембраны и осуществляют захват определенного типа лигандов. Рецепторы *BasB/BasT* и *CosB/CosT* у *Hbt. salinarum* осуществляют детектирование разветвленных (лейцин, изолейцин, валин) и серосодержащих (метионин, цистеин) аминокислот и некоторых осмопротекторных соединений соответственно [793].

Некоторые галобактерии также обладают способностью к аэротаксису. Впервые данная способность была обнаружена у галобактерии *Hbt. salinarum*, подвижные клетки которой концентрировались у поверхности воздушных пузырьков [801]. *Hbt. salinarum* обладает двумя разными белками-аэротрансдукторами. *HtrVIII* является белком-трансдуктором В типа, имеет шесть трансмембранных спиралей и цитоплазматический участок, гомологичный таковому бактериальным МХБ. Делеция гена *htrVIII* способствует утрате способности клеток *Hbt. salinarum* к аэротаксису [798, 802]. Второй аэротаксический белок-трансдуктор *Hbt. salinarum* – *HemAT-Hs*. Это подобный миоглобину гем-содержащий белок-трансдуктор С типа, несущий сигнальный домен, гомологичный домену *Tsr* – МХБ *E. coli*. Благодаря наличию гема данный белок способен связываться с молекулярным кислородом и транслировать сигнал посредством изменения конформации сигнального домена [803].

Передача сигнала от МХБ-подобного белка-трансдуктора к системе клеточного движения у бактерий и архей происходит одинаково. Трансдуктор взаимодействует с белком CheW, который в свою очередь взаимодействует с белком CheA. CheA автофосфорилируется, после чего фосфорилирует белок CheY, который в фосфорилированном состоянии (CheY-P) контактирует с белком-переключателем направления вращения жгутика. В реализации изменения движения в ответ на активацию фоторецептора микроорганизма принимает участие фумарат, который совместно с CheY-P связывается с белком-переключателем. Молекулы фумарата высвобождаются фумарат-связывающим белком, ассоциированным с мембраной, в ответ на активацию фототрансдуктора. Системы цитотаксиса бактерий и архей также способны реагировать на изменение интенсивности сигнала-возбудителя. Реагирование осуществляется посредством опосредуемых метилэстеразой CheB и метилтрансферазой CheR ре- и деметилирования боковых радикалов остатков глутаминовой кислоты, расположенных на цитоплазматическом участке МХБ-белков. В зависимости от паттерна метилирования, системы цитотаксиса клетки могут адаптироваться или возвращаться в начальное состояние и, как следствие, реагировать на изменение сигнала [787].

1.8. Биотехнологический потенциал галофилов

Галофильные микроорганизмы и продуцируемые ими соединения являются объектом живого интереса. Уникальные физиологические и метаболические адаптации этих экстремофильных микроорганизмов делают их многофункциональными «микрофабриками», способными производить широкий спектр химических соединений пищевого, медицинского и технического назначения, находящих применение в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, медицине, фармакологии, полимерной, текстильной, бумажной, горнодобывающей и других промышленности [804-811].

1.8.1. Пищевое применение

Пищевая соль (NaCl) традиционно используется для производства и длительного хранения различных типов соленых и соленых ферментированных

продуктов в качестве консервирующего агента, предотвращающего рост патогенных микроорганизмов и стимулирующего развитие полезной микрофлоры, необходимой для осуществления процесса ферментации и обеспечения надлежащих органолептических качеств готового продукта. Ферментированные и соленые продукты являются частью этнической кухни разных народов мира, в частности ферментированная рыба и соленые рыбные соусы – широко распространенные элементы азиатской кухни [812-816].

Микробиологические и молекулярно-биологические исследования соленых ферментированных пищевых продуктов демонстрируют огромное разнообразие культивируемых и некультивируемых микроорганизмов – бактерий, архей и эукариотов (дрожжей), играющих ключевую роль в их производственном процессе. Производство таких продуктов подразумевает создание ферментационной среды с высокой концентрацией поваренной соли и содержанием больших количеств пищевых субстратов белковой природы. Ввиду высокой солености галофильные археи и бактерии являются неотъемлемой частью «экосистем» данных пищевых производств. В условиях традиционного (домашнего) мелкомасштабного производства соленых ферментированных продуктов обсеменение производственных емкостей осуществляется естественным образом при внесении основного продукта – различных морепродуктов, и при добавлении пищевой соли [813, 817-822]. Пищевая соль, добываемая в основном путем выпаривания вод соленых водоемов, а также путем разработки естественных эвапоритов, является средой обитания и, как следствие, источником большого числа разнообразных галофильных микроорганизмов. Исследование образцов пищевой соли, добытой в разных географических локациях мира, произведенное с применением методов микробиологического и метагеномного анализа, демонстрирует наличие в ней множества живых клеток экстремально галофильных архей семейства *Halobacteriaceae*, в частности представителей родов *Halobacterium*, *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Natronomonas*, *Haloplanus*, *Halosimplex*, *Haloterrigena* и др. [823].

Чоткаль, или чот, - пищевой продукт, получаемый путем длительной ферментации морепродуктов в соленой среде, является распространенным элементом корейской кухни. В зависимости от типа ферментируемых морепродуктов, выделяют порядка 164 типов этого сильносоленого блюда (соотношение морепродуктов и соли составляет 3-4:1, что эквивалентно более 20% об. NaCl) [816, 819]. Аналогичные блюда, изготавливаемые путем продолжительной ферментации из разных типов морепродуктов или овощей и разной степени солености (на 1 массу соли может приходиться от 1 до 9 масс морепродукта), известны в индийской, малазийской (буду), индонезийской, тайской (нампала), вьетнамской (ныокмам), китайской (юйлу), японской (исиру), филиппинской (патис), французской (ферментированные анчоусы), греческой (гарос) и даже древнеримской (гарум) кухнях [812, 814-816, 819, 822]. Микробиологический анализ соленых ферментированных пищевых продуктов демонстрирует большое число разнообразных микроорганизмов археальной и бактериальной природы, населяющих подобные, своего рода, «экологические ниши». Применение микробиологических и молекулярно-генетических техник для качественной и количественной микробиологической оценки данных продуктов позволило выявить более сотни умеренно и экстремально галофильных архей, некоторые из которых были впервые выделены именно из разного рода чоткаль [813, 817-822]. Так, выделенные из ферментированных продуктов азиатской кухни галоархеи представлены штаммами *Halobacterium salinarum* [824-825], *Haloarcula tradensis* [826], *Haloarcula salaria* [826], *Halococcus thailandensis* [827], *Haladaptatus cibarius* [828], *Halalkalicoccus jeotgali* [829], *Halorubrum cibi* [830], *Haloterrigena jeotgali* [831], *Natronococcus jeotgali* [832], *Natrinema gari* [833] и др. [819, 828]. Представители бактериальной компоненты микрофлоры данных блюд в своем большинстве относятся к следующим бактериальным родам: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Alkalibacterium*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* и *Klebsiella* [828, 834-836]. Также, в некоторых рыбных соусах

обнаруживаются дрожжи и грибы родов *Debaryomyces*, *Hansenula* и *Aspergillus* [834].

Соленые ферментированные пищевые продукты производятся путем длительного (от нескольких недель до 1 года) выдерживания морепродуктов или овощей в соленой ферментационной среде. В процессе ферментации пищевое сырье подвергается воздействию широкого спектра литических ферментов, выделяемых членами сообщества-продуцента, благодаря чему конечный продукт приобретает желаемую консистенцию, а также вкус и запах, которые не достигаются в процессе асептического ферментирования с применением ферментных препаратов. Бактерии и археи родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Halococcus*, *Halobacterium* производят широкий спектр протеолитических ферментов, обеспечивающих постепенную деградацию тканей морепродуктов в процессе ферментации. Галоархеи *Halococcus sp.* и *Halobacterium sp.* продуцируют галотолерантные литические ферменты, активность которых не снижается в условиях высокой солености окружающей среды. Также, некоторые бактериальные микроорганизмы родов *Bacillus* и *Staphylococcus* наряду с галоархеями, выделенные из различных рыбных соусов и ферментированной рыбы, в больших количествах продуцируют летучие органические соединения (предположительно, кислоты), обеспечивающие характерный запах конечного продукта [814].

В процессе нестерильной ферментации наблюдается микробная сукцессия и изменение физико-химических параметров ферментационной среды, обеспечивающие более полную переработку пищевого сырья, обогащение среды различными биологически активными соединениями, а также избирательную деградацию ряда веществ, потенциально опасных для конечного потребителя [810, 814, 818, 821, 837]. Мясо многих видов рыб характеризуется высоким содержанием гистамина – биогенного амина, ярко выраженного аллергена, большие количества которого при попадании в организм человека индуцируют ряд негативных физиологических реакций [838-839]. Исследования динамики химического состава ферментационной среды при производстве рыбных соусов и

других соленых ферментированных продуктов демонстрируют постепенное увеличение содержания гистамина в процессе ферментации [837]. Многие галоархеи проявляют способность деградировать гистамины и другие биогенные амины с образованием безопасных органических соединений [840].

Авторегуляция микробного сообщества и накопление бактериоцидных соединений в процессе ферментации способствует поддержанию определенного микробного состава на каждом этапе процесса и предотвращает контаминацию продукта патогенной флорой [841]. Выделенные из тайского рыбного соуса молочнокислые бактерии являются активными антагонистами таких патогенных бактерий, как *E. coli*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella sp.* [842]. В процессе ферментации молочнокислые бактерии в больших количествах продуцируют молочную кислоту, которая накапливается в ферментационной среде и ингибирует рост патогенной микрофлоры. Многие из изолированных из рыбных соусов и ферментированных продуктов бактерии и археи являются активными продуцентами бактериальных и археальных бактериоцинов [843-844]. Другим фактором, лимитирующим рост нежелательной микрофлоры, является высокая соленость ферментационной среды [845].

При промышленном производстве рыбных соусов и ферментированных пищевых продуктов часто применяются бактериальные культуры для инициации, ускорения и повышения эффективности процессов ферментации. Использование определенных культур бактерий и архей также позволяет получать конечный продукт, отвечающий всем качественным и микробиологическим требованиям. На сегодняшний день для промышленного производства соленых ферментированных продуктов широко используются штаммы бактерий родов *Bacillus*, *Halobacillus*, *Staphylococcus*, *Tetragenococcus* и *Virgibacillus*, изолированные из соленых рыбных соусов, произведенных традиционными методами. Бактерии рода *Staphylococcus* и *Tetragenococcus* производят протеазы, лизирующие ткани морепродуктов вплоть до отдельных α -аминокислот, осуществляют деградацию биогенных аминов, а также продуцируют ряд органических соединений, обеспечивающих характерный запах рыбного соуса.

Галофильные бактерии родов *Virgibacillus* и *Halobacillus* продуцируют галотолерантные протеазы, сохраняющие активность при концентрациях поваренной соли, превышающих 20% [821, 835, 841, 845-852]. Использование штаммов галобактерий рода *Halobacterium* совместно с бактериальными культурами также позволяет увеличить скорость и эффективность ферментации рыбного соуса. Добавление галобактерий демонстрирует интенсификацию процесса гидролиза белков, увеличивает выход пептидов и свободных аминокислот [853].

1.8.2. Экстремозимы

Одним из наиболее интересных и перспективных в биотехнологическом плане продуктов метаболизма галофильных микроорганизмов являются галотолерантные белки, в частности, ферменты. Ферменты мезофильных организмов, в отличие от ферментов экстремофилов – экстремозимов, не способны функционировать в экстремальных условиях, характерных для многих технологических процессов, реализуемых во всех областях промышленности. Галоэнзимы – экстремозимы галофильных организмов, обладают спектром уникальных свойств, благодаря своим специфическим характеристикам. Их аминокислоты обладают преимущественно кислыми (обеспечивает отрицательный поверхностный электрический заряд молекулы белка, предотвращает агрегацию молекул белка в условиях высокой солености, способствует образованию гидратной оболочки) и мало гидрофобными радикалами (способствует ослаблению гидрофобных взаимодействий в молекуле белка, тем самым обеспечивая конформационную мобильность в условиях высокой солености). Однако стоит отметить, что специфичный аминокислотный состав накладывает определенные ограничения на условия нормального фолдинга и эффективного функционирования галоэнзимов. Так многие ферменты галофильных организмов проявляют активность исключительно в условиях высокой солености окружающей среды ($>1,2\text{M NaCl}$), а эндоферменты галоархей часто очень чувствительны к наличию и концентрациям ионов K^+ в реакционной среде. Экологические ниши галофильных организмов в подавляющем

большинстве случаев характеризуются не только экстремальной соленостью – характерными чертами многих гиперсоленых геоценозов, негативно влияющими на активность ферментов мезофильных организмов, являются высокие температуры, экстремальные щелочные и кислые значения pH, экстремальное давление (глубоководные морские гиперсоленые ценозы) и обилие ионов хаотропных металлов (Mg^{2+} , Ca^{2+}), дестабилизирующих пространственную структуру белковой молекулы. Для осуществления своих функций ферменты галофильных организмов должны сохранять стабильность и активность под воздействием множественных экстремальных факторов, что в значительной степени расширяет область их технологического применения. Способность проявлять высокую ферментативную активность в условиях низкой активности воды делает ферменты галофильных организмов технологически применимыми в гиперсоленых и безводных средах при высоких температурах, давлениях и экстремально щелочных или кислых pH (см. раздел 1.6.4).

1.8.2.1. Протеазы

Протеазы являются наиболее технологически используемыми ферментами и часто играют ключевую роль в различных процессах в пищевой, фармакологической, аграрной, текстильной, химической и других промышленности [854-856]. Протеазы, или пептидазы, были классифицированы IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) как гидролазы, воздействующие на пептидные связи (класс КФ 3.4) [856]. На данный момент класс КФ 3.4 объединяет 13 групп (подклассов) протеаз, характеризующимися разными свойствами и механизмами действия [857]. Подклассы протеаз в свою очередь могут быть объединены в две большие группы – экзопептидазы, включающие амино-, карбокси- и дипептидазы, и эндопептидазы, включающие аспарагиновые, цистеиновые, сериновые и треониновые пептидазы, металлопептидазы, а также протеазы с неизвестным каталитическим механизмом [854-856].

Внеклеточные протеазы галофильных микроорганизмов относятся к подклассам сериновых пептидаз и металлопептидаз. Протеазы, продуцируемые

галоархеями, являются исключительно сериновыми пептидазами, в то время как протеазы галофильных бактерий представлены как сериновыми пептидазами, так и металлопептидазами [856]. Пептидазы галофильных организмов проявляют активность в широком спектре температур и значений pH. Оптимальные температуры галофильных протеаз варьируются от 35 до 75°C. Оптимальные значения pH также сильно варьируются в диапазоне pH 5 – 12 ед., но для подавляющего большинства ферментов лежат в слабощелочной и щелочной областях. Галоархеальные протеазы, как и их продуценты, нуждаются в низкой активности воды окружающей среды для осуществления катализа. Оптимум солености реакционной среды для протеаз галоархей лежит в диапазоне от 1 до 5,2 М NaCl [856, 858-861]. Экстремально низкая активность воды необходима галофильным ферментам для обретения и поддержания правильной конформации, а также формирования упорядоченной ион-гидратной оболочки белковой молекулы. Эксперименты с галофильными ферментами в средах с низкой активностью воды, обусловленной высокими концентрациями таких осмоактивных соединений, как сахароза или бетаин, демонстрируют первостепенную важность именно высокой осмолярности среды для проявления ферментативной активности [862]. Однако стоит отметить, что некоторые протеазы галофильных организмов осуществляют более эффективный катализ в присутствии ионов Na⁺ и Cl⁻ [863]. В некоторых случаях отсутствие NaCl в реакционной среде индуцирует реакцию автолиза фермента [864-865]. Галоэнзимы галофильных бактерий характеризуются более гибкими требованиями к осмолярности и ионному составу реакционной среды. В зависимости от степени галофильности бактерии-продуцента и его осмоадаптивной стратегии, оптимум солености окружающей среды бактериальных протеаз может варьироваться в диапазоне от 0 до 4,5 М NaCl [866]. Также, бактериальные протеазы часто не нуждаются в значительных концентрациях ионов Na⁺ в реакционной среде, однако могут быть восприимчивы к наличию больших количеств соединения-осмопротектора, характерного для их бактерии-продуцента [867-868].

Галофильные протеазы находят применение в текстильной промышленности, животноводстве, фармацевтике и медицине, однако наибольшее распространение получили в пищевой промышленности и как активный компонент моющих средств [856, 858-861, 866].

Впервые моющее средство, содержащее бактериальную сериновую протеазу, было представлено в 1960-х годах. Это было моющее средство на основе сериновой эндопротеазы, устойчивой в присутствии как ионных, так и анионных поверхностно-активных веществ (ПАВ), с оптимумом активности при температуре 60°C и pH 8,3, продуцируемой алкалитолерантной бактерией *Bacillus licheniformis*. На сегодняшний день выпускается большое количество моющих средств, содержащих в своем составе продуцируемые разными штаммами рода *Bacillus* щелочные сериновые протеиназы, также известные как субтилизины [869-872]. Галофильные протеазы также являются перспективными претендентами для применения в качестве активного компонента как хозяйственных, так и промышленных моющих средств, благодаря их способности нормально функционировать в присутствии высоких концентраций разного типа ПАВ, а также в водных и безводных средах [860]. Протеазы с подходящим спектром свойств были обнаружены у многих галофильных бактерий, в частности представителей родов *Bacillus*, *Geomicrobium* и *Virgibacillus* [868, 873-874]. Аналогичные бациллярному субтилизину пептидазы также имеются у галоархей, в частности у *Haloferax mediterranei* [865, 875].

Консорциумы галофильных микроорганизмов, состоящие из бактерий, и архей, применяются в пищевой промышленности для производства соленых ферментированных продуктов. Ярким примером таких богатых белками и аминокислотами продуктов являются широко распространенные мясные блюда и морепродукты, а также разнообразные рыбные соусы, являющиеся важным элементом азиатской кухни. Галофильные микроорганизмы, в частности продуцируемые ими разного типа протеазы, играют ключевую роль в производстве данных продуктов, осуществляя процесс длительной ферментации, в ходе которого под действием пептидаз происходит деградация тканей мяса и

морепродуктов с образованием пептидов и свободных аминокислот. На сегодняшний день для промышленного производства соленых ферментированных продуктов применяются большое число галофильных бактериальных и археальных штаммов-продуцентов, принадлежащих к родам *Bacillus*, *Halobacillus*, *Staphylococcus*, *Tetragenococcus*, *Virgibacillus* и *Halobacterium*. Для осуществления процессов стерильной ферментации могут применяться непосредственно галотолерантные протеазы, продуцируемые данными микроорганизмами (см. раздел 1.3.2).

1.8.2.2. Карбогидразы

Галофильные бактерии и археи продуцируют большое число разнообразных карбогидраз, или гликозил-гидролаз (подкласс гликозидаз, КФ 3.2.1). Наиболее изученными и распространенными в технологическом плане гликозил-гидролазами являются амилазы – группа ферментов, объединяющих α -амилазы, β -амилазы и глюкоамилазы. Также, особого внимания заслуживают такие карбогидразы галофильных микроорганизмов, как целлюлазы, ксиланазы и маннаназы [858, 860-861, 866, 876-878].

α -Амилазы (КФ 3.2.1.1) галофильных микроорганизмов широко применяются в пищевой промышленности и в производстве моющих средств [866, 876-878]. Эти в большинстве своем кальций-зависимые ферменты катализируют гидролиз внутримолекулярных α -1,4-гликозидных связей в молекулах крахмала и других полисахаридов аналогичного строения. В зависимости от типа фермента, некоторые α -амилазы способны осуществлять реакцию трансгликозилирования совместно с реакцией гидролиза. Помимо классификации IUBMB, гликозидазы классифицируются в соответствии с CAZy-классификацией (Carbohydrate-Active EnZyme), осуществляющей группировку ферментов на основе сходства их аминокислотных последовательностей [876, 879]. Подавляющее большинство α -амилаз, продуцируемых представителями всех трех филогенетических доменов, в соответствии с CAZy-классификацией принадлежит семейству GH13 – крупнейшему семейству гликозил-гидролаз, объединяющему более >104200 (ноябрь 2020 года) аминокислотных

последовательностей белков (в том числе ~99400 бактериальных и >560 археальных), принадлежащих к трем разным семействам в соответствии с классификацией IUBMB (гликозилазы КФ 3.2.1, гликозилтрансферазы КФ 2.4.1, изомеразы КФ 5.4.99) [876, 879, 880].

α -Амилазы галофильных архей представляют собой неоднородную группу ферментов, проявляющих разные свойства и отнесенных к разным подсемействам семейства GH13. Первым археальным амилолитическим белком, отнесенным к данной группе гликозил-гидролаз, является α -амилаза *Natronococcus amylolyticus*, которая также может быть характеризована как амилаза, продуцирующая мальтотриозу [881-882]. Согласно филогенетическому анализу, данный фермент является родственным внеклеточным α -амилазам грибов, образующих подсемейство GH 13_1 [876]. Амилолитические ферменты, продуцируемые археями *Haloarcula japonica* и *Haloarcula marismortui*, являются родственными ферментам подсемейства GH 13_37, объединяющего α -амилазы морских бактерий [876, 879, 883-884]. Один из ферментов *Haloarcula hispanica* ассоциируется с α -амилазами большой группы подсемейств (15, 24, 27, 28, 32) семейства GH13, включающей ферменты бактериального и животного происхождения [876].

В зависимости от вида фермента и организма-продуцента галоархеальные амилолитические ферменты демонстрируют значительную варибельность оптимальных значений физико-химических параметров, необходимых для осуществления катализа. Одной из первых описанных амилаз галоахей является амилаза *H. salinarum*, гидролизующая крахмал с образованием мальтотриозы, мальтозы и глюкозы. Оптимальная активность данного фермента наблюдается при температуре 55°C и нейтральном pH (7). Для осуществления катализа эта амилаза не нуждается в экстремальной солености реакционной среды – оптимальная соленость составляет 0,05% NaCl, однако требовательна к наличию ионов Na⁺ и K⁺ [885]. Галоалкалифильная архея *Natronococcus amylolyticus* продуцирует амилазу, оптимально функционирующую при температуре 55°C, pH 8,7 в 2,5 М растворе NaCl [881]. *Hfx. mediterranei* продуцирует несколько внеклеточных α -амилаз – амилазу, деградирующую пуллулан, и три амилазы,

экспрессируемые исключительно в присутствии крахмала в окружающей среде. Амилаза *Hfx. mediterranei*, специфичная к пуллулану, осуществляет гидролиз 1-4 связей в его молекуле и оптимально активна при pH 7-8, температуре 50 – 60°C в среде 3 М раствора NaCl. Другие амилазы *Hfx. mediterranei* проявляют оптимальную активность при нейтральном pH в 1 – 3 М растворе NaCl [886-887]. α -Амилаза *Har. hispanica* осуществляет оптимальный катализ в реакционной среде, характеризующейся pH 6 – 6,5, температурой 50°C, 3 – 4 М NaCl [888].

Галофильные бактерии также продуцируют широкий спектр амилаз, обладающих различными оптимальными условиями катализа. Внеклеточная α -амилаза умеренно галофильной бактерии *Halomonas meridiana* проявляет максимальную активность в условиях 10% (1,7 М) раствора NaCl при нейтральном pH (7) и температуре 37 °C [889]. *Nesterenkonia sp. F* продуцирует α -амилазу, проявляющую максимальную активность при pH 7-7,5 и температуре 45°C. Данный фермент высокоактивен в большом диапазоне соленостей (0 – 4 М NaCl), однако оптимальную активность проявляет в условиях 0,25 М раствора NaCl [890]. Другая галофильная α -амилаза, продуцируемая *Thalassobacillus sp. LY18*, оптимально активна при pH 9 и температуре 70°C в 10% (1,7 М) растворе NaCl. α -Амилаза *Thalassobacillus sp.* стабильна и активна в широком диапазоне условий, проявляет свойства термостабильного (30 – 90 °C), алкалостабильного (pH 6 – 12) и галотолерантного (0 – 3,4 М NaCl) фермента [891]. α -Амилаза галоалкалифильной бактерии *B. agaradhaerens* также активна в широком диапазоне соленостей (0 – 4 М NaCl), однако оптимальные каталитические свойства проявляет в 2 М растворе NaCl при pH 10 – 11, температуре 50 °C [892].

β -Амилазы (КФ 3.2.1.2) – экзоамилазы, осуществляющие отщепление мальтозы с невосстанавливающего конца молекулы полисахаридов крахмала или аналогичных полимеров [893]. На данный момент данные ферменты обнаружены лишь у двух галофильных бактерий: штамм *Halobacillus sp. LY9* и штамм *Salimicrobium halophilum LY20*. β -Амилаза *Halobacillus sp. LY9* высокоактивна в широких диапазонах температуры (50 - 70°C), pH (4 – 12) и солености (5 – 20%). Оптимальная активность данного фермента наблюдается при pH 8, 60°C в 1,7 –

2,1 М растворе NaCl. Также, амилаза *Halobacillus sp.* LY9 требовательная к наличию больших количеств ионов Na⁺ в реакционной среде и демонстрирует лучшую стабильность и более высокую активность в присутствии ионов Ca²⁺. β-Амилаза *S. halophilum* LY20 также является термостабильным, алкалостабильным и галотолерантным ферментом и сохраняет высокую активность при температуре 30 - 80°C, pH 6 – 10, солёности 2,5 – 20%, максимальная активность проявляется в среде 1,7 М NaCl при pH 10, 70°C [894-895].

Глюкоамилазы (КФ 3.2.1.3) – экзоамилазы, осуществляющие гидролиз α-(1,4)- и α-(1,6)-гликозидных связей на невосстанавливающих концах молекул полисахаридов крахмала с образованием молекулы глюкозы. Глюкоамилазы продуцируются как галоархеями, так и галофильными бактериями [893]. Экстремальная галофильная архея *Halorubrum sp.* Ha25 продуцирует глюкоамилазу, активную в солевых растворах с концентрацией NaCl 0 – 4,5 М при 50°C и pH 7 – 7,5 [896]. Галофильная бактерия *Alkalilimnicola sp.* NM-DCM-1 является продуцентом глюкоамилазы, оптимально активной при pH 9,5, 55°C в 2 М растворе NaCl [897]. Ферменты обоих микроорганизмов, помимо крахмала, осуществляют гидролиз пуллулана [896-897]. Глюкоамилаза галофильной бактерии *Halolactibacillus sp.* SK71 отличается уникальной термостабильностью и проявляет активность при температурах от 0 до 100°C. Данный фермент также галостабилен и активен в 0 – 3,4 М растворах NaCl. Максимальная активность этой глюкоамилазы наблюдается в условиях 1,3 М раствора NaCl при pH 8 и 70°C [898].

Амилазы животного, растительного, грибного и бактериального происхождения используются в пищевой промышленности, в частности в хлебопекарной отрасли, пивоварении, производстве различных сиропов. Процессы ферментативного гидролиза (осахаривания) крахмального сырья и аналогичных крахмалу полисахаридов широко применяются в промышленности для получения сиропов (например, фруктозных сиропов, на этапе ферментативного расщепления крахмального сырья), ди- и олигосахаридов пищевого и медицинского назначения (мальтозы и других мальтоолигосахаридов,

разветвленных декстринов и др.), для частичного осахаривания крахмала для оптимизации процессов брожения в хлебопечении и пивоварении, а также в качестве активного компонента моющих средств [893, 899-901]. Большинство из перечисленных процессов интенсифицируются путем повышения температуры и создания кислой или щелочной среды. Амилазы галофильных микроорганизмов способны в значительной степени повысить эффективность и ускорить данные технологические процессы ввиду их уникальных свойств полиэкстремотолерантных ферментов: термостабильности, устойчивости в условиях кислых и щелочных, а также высоко осмолярных сред. Способность сохранять структуру и активность в присутствии ПАВ и в безводных средах делает амилазы галофильных микроорганизмов идеальным кандидатом на роль активного компонента моющих средств. Некоторые галофильные микроорганизмы, как бактерии (например, *H. salinarum* [902]), так и археи, являются эффективными промышленными продуцентами амилаз, что способствует упрощению процесса интеграции данного типа галоэнзимов в различные технологические процессы [858, 860-861, 866, 876-878].

Галофильные микроорганизмы также являются продуцентами других гликозил-гидролаз – целлюлаз, ксиланаз и маннаназ, используемых для переработки растительного сырья [903]. Основным компонентом растительного сырья является целлюлоза – гомополимер, состоящий из остатков D-глюкозы, соединенных β -1,4-гликозидными связями [904]. Целлюлазы (КФ 3.2.1.4) осуществляют гидролиз гликозидных связей в молекулах целлюлозы, лихенина и других полисахаридов аналогичного строения. Выделяют три типа целлюлаз – эндоцеллюлазы, экзоцеллюлазы и β -глюкозидазы, которые посредством совместного действия с рядом других ферментов осуществляют полный гидролиз целлюлозы с образованием глюкозы [903-905]. Помимо целлюлозы растительное сырье содержит гемицеллюлозу и лигнин. Гемицеллюлоза является гетерополимером сложного строения и может состоять из связанных молекул ксилана, ксилогликана, глюкоманнана, галактоглюкоманнана и арабиногалактана. Ксилиназы и маннаназы являются частью ферментного комплекса, способного

осуществлять гидролиз гемицеллюлозы. Ксиланазы включают два типа ферментов, осуществляющих эндо- и экзомолекулярный гидролиз ксилана – гетерополимер с короткими боковыми цепями, главная цепь которого образована остатками D-ксилозы, соединенных β -1,4-гликозидными связями. Эндо- β -ксилианазы (КФ 3.2.1.8) катализируют гидролиз случайной внутренней связи в молекуле ксилана, в то время как β -ксилозидазы (КФ 3.2.1.37) осуществляют последовательное отщепление остатков D-ксилозы от невозстановливающего конца молекулы ксилана [903, 906]. Маннан является полимером D-маннозы и гидролизуется аналогично ксилану ферментами β -маннаназами (КФ 3.2.1.78) и β -маннозидазами (КФ 3.2.1.25) [907].

Целлюлазы, ксиланазы и маннаназы нашли применение в пищевой, химической, фармацевтической, текстильной, бумажной промышленности, а также в сельском хозяйстве. Целлюлазы широко используются для осахаривания растительного сырья для производства глюкозы, в текстильной промышленности - для размягчения растительных волокон, как активный компонент моющих средств [903-904, 908]. Ксиланазы применяются в пищевой промышленности для осветления фруктовых соков и улучшения пекарских свойств муки, в бумажной промышленности - для отбеливания бумаги [903, 906, 909]. Целлюлазы, ксиланазы и маннаназы совместно используются для увеличения пищевой ценности растительного непищевого сырья в производстве кормов для птицы и скота, а также в процессах переработки отходов лесной и бумажной промышленности и аграрного растениеводства для получения биодизеля и биоэтанола [907]. Ферменты, продуцируемые экстремофилами, являются перспективными ферментами для использования в технологических процессах с экстремальными физико-химическими параметрами, неоптимальными для каталитической активности мезофильных энзимов, а экстремофильные микроорганизмы-продуценты данных ферментов могут быть использованы непосредственно для биоремедиации промышленных стоков и твердых отходов с высоким содержанием целлюлозы, гемицеллюлозы и других аналогичных полимеров [877-878, 903].

Галофилы – продуценты целлюлаз и ксиланаз присутствуют как среди бактерий, так и среди архей. Микробиологические исследования гиперсоленых биоценозов, таких как соленые и содовые озера, демонстрируют большое разнообразие микроорганизмов, проявляющих целлюлолитическую и ксилолитическую ферментативные активности [903]. Высев на селективные среды образцов воды и ила соленых озер Кулундинской степи (Россия) демонстрирует наличие трех микроорганизмов, близкородственных археям родов *Halorhabdus*, *Halosimplex* и *Halomicrobium*, утилизирующих целлюлозу при солености окружающей среды 3 – 5 М NaCl (оптимальная соленость - 3,5 – 4,5 М). Высев аналогичных образцов, отобранных из содовых озер Кулундинской степи, позволил выделить семь микробных изолятов, родственных представителям родов *Halovivax*, *Natronolimnobius* и *Halopiger*. Изоляты из содовых озер росли на средах, содержащих в качестве единственного источника углерода как целлюлозу, так и ксилан, что свидетельствует об их способности продуцировать целлюлазы и ксиланазы. Оптимальный рост изолированных микроорганизмов наблюдался при pH 9,5 и температуре 36 - 38°C на среде с концентрацией 4 М Na⁺ [910].

Галоархея *Haloarcula sp.* 2ТК2 является перспективным промышленным продуцентом галоостабильной целлюлазы и способна осуществлять ее эффективный биосинтез [911]. Экстремально галофильная бактерия *Salinivibrio sp.* NTU-05 продуцирует галоостабильную целлюлазу, сохраняющую активность в диапазоне соленостей 0 – 4,3 М NaCl при температурах от 35 - 60°C. Оптимальными условиями для данного фермента являются pH 7,5, температура 35°C и 0,85 М раствор NaCl. Ионы Na⁺, K⁺ и Mg²⁺ способствуют увеличению активности данного фермента [912]. Галоалкалифильная бактерия *Bacillus sp.* BG-CS10 продуцирует эндоцеллюлазу, проявляющую также глюкоманназную активность, проявляющую максимальную активность в средах с высокой осмолярностью. Оптимальная активность данного фермента достигается в условиях pH 10, 55°C и 2,5 М раствор NaCl [913]. *Halomonas sp.* PS47 является продуцентом стабильной в 0 – 4 М растворах NaCl целлюлазы, оптимально активной в условиях pH 7,1, 50 °C, 0 – 1 М NaCl [914].

В научной литературе имеется ряд свидетельств об успешном применении целлюлаз галофильных архей и бактерий в процессах опытно промышленного производства биоэтанола. Экстремально галофильный археальный штамм *Haloarcula sp.* LLSG7 является продуцентом пяти разных эндоглюканаз и демонстрирует максимальную целлюлазную активность при 50°C, pH 8 в среде с содержанием NaCl 200 г/л (3,4 М). Целлюлазный комплекс, продуцируемый данной археей, использовался для гидролиза предварительно обработанной щелочью рисовой соломы. На полученном ферментативном гидролизате производилось культивирование дрожжей *S. cerevisiae*. Максимальный выход биоэтанола составил 10,7 г/л после 30 часов ферментации. Коэффициент продуктивности процесса составил 0,177 г/г субстрата, эффективность процесса конверсии сырья - 41,9%, что превышает эффективность процессов с использованием целлюлаз мезофильных грибов [915]. Штамм галофильной бактерии *Gracilibacillus sp.* SK1 также является высоко перспективным продуцентом целлюлолитических ферментов для промышленного производства биоэтанола. Данная умеренно галофильная бактерия (оптимальная соленость для роста составляет 10% NaCl) продуцирует целлюлазный комплекс, включающий по меньшей мере шесть разных эндоглюканаз и проявляющий эндоглюканазную, экзоглюканазную и β-глюкозидазную активности. Максимальная активность этого комплекса достигается в условиях среды 2,1 М NaCl при pH 8 и температуре 60°C. Процесс гидролиза кукурузной и рисовой соломы целлюлазами *Gracilibacillus sp.* SK1 характеризуется производительностью 0,678 г/г и 0,502 г/г субстрата соответственно. Культивирование дрожжей *S. cerevisiae* на полученных гидролизатах демонстрирует выход биоэтанола 13,5 г/л после 56 часов процесса, коэффициент производительности по биоэтанолу составляет 0,186 г/г исходного субстрата, эффективность биоконверсии – 52,8%, что также является выдающимся результатом в сравнении с процессами, основанными на применении широко распространенных мезофильных целлюлаз [916].

Экстремально галофильная архея *Halorhabdus utahensis* является продуцентом двух перспективных ксиланаз – β-ксиланазу и β-ксилозидазу. Оба

фермента демонстрируют устойчивость в средах, характеризующихся концентрациями NaCl от 0 до 5,1 М. β -Ксиланаза *H. utahensis* обладает двумя оптимумами температуры и проявляет максимальную активность при 55° и 70°С в 0,85 – 2,5 М растворе NaCl при pH 7,5. β -Ксилозидаза *H. utahensis* осуществляет оптимальный катализ при pH 6-7, 65°С в 0,85М растворе NaCl [917]. Галофильная алкалитолерантная бактерия *Gracilibacillus sp.* TSCPVG, растущая в средах с соленостью от 1 до 30% при pH в диапазоне от 6,5 до 10,5 также продуцирует β -ксиланазу и β -ксилозидазу. β -Ксиланаза данной бактерии сохраняет активность при pH 5-10,5, 50 - 70°С в средах с концентрациями NaCl, составляющими 0 – 5,1 М, максимальную активность проявляет при pH 7,5, 60°С и 0,6 М NaCl [918]. Галофильная гамма-протеобактерия с неустановленной филогенетической принадлежностью (штамм CL8), выделенная из Великого Соленого озера (США, Юта), продуцирует две перспективные ксиланазы, проявляющих активность в широком диапазоне соленостей (1 – 5 М NaCl) и pH (4 – 11), максимально активных при pH 6, температуре 60°С и 65°С в 1 М растворе NaCl. Ксиланазы данного галофила демонстрируют более высокую эффективность в присутствии ионов двухвалентных металлов, таких как Ca²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, в реакционной среде [919]. Галофильная бактерия *Chromohalobacter sp.* TPSV 101 продуцирует стабильную в широком диапазоне температур (40 – 80 °С) ксиланазу, демонстрирующую максимальную каталитическую активность при pH 9 и 65 °С в среде 3,4 М раствора NaCl [920].

Первым галофильным микроорганизмом, у которого была выявлена маннаназная активность, является галотолерантная бактерия *Bacillus sp.* NN. Эта бактерия является продуцентом двух маннанолитических ферментов – β -маннаназы и β -маннозидазы, проявляющих максимальную активность в реакционных средах с содержанием NaCl 1 и 5% соответственно [921]. Галостабильная β -маннаназа продуцируется бактерией *Pantoea agglomerans* A021. Данный фермент проявляет оптимальную активность при pH 6 и температуре 55°С и остается стабильным в среде с pH 4 – 10 при температурах до 60 °С. Для осуществления катализа маннаназа *P. agglomerans* A021 нуждается в высоких

концентрациях ионов Na^+ в среде (оптимальная концентрация 0,75 М NaCl). Также повышение активности наблюдается в присутствии ионов Zn^{2+} , Mg^{2+} и Co^{2+} [922].

1.8.2.3. Липолитические ферменты

Группа липолитических ферментов включает два класса ферментов липазы (КФ 3.1.1.3) и карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1) [923]. Липазы осуществляют гидролиз триглицеридов, образованных длинноцепочечными жирными кислотами ($\geq \text{C}_{10}$). Триглицериды длинноцепочечных жирных кислот не являются водорастворимыми соединениями, что обуславливает особенность реакционной среды липаз, – данные ферменты осуществляют катализ в двухфазных системах на границе раздела водной и гидрофобной фаз [924-925]. Отдельно стоит выделить липазы, осуществляющие гидролиз фосфолипидов – фосфолипазы. В молекулах фосфолипидов насчитываются четыре варианта эфирных связей. В зависимости от типа гидролизуемой связи, выделяют четыре типа фосфолипаз [926]:

- фосфолипазы А и В, осуществляющие гидролиз эфирных связей между остатками глицерина и жирных кислот. Фосфолипазы А, осуществляют отщепление одного из ацильных радикалов, в то время как фосфолипазы В (лизофосфолипазы) осуществляют отщепление обоих ацильных радикалов;
- фосфолипазы С, гидролизующие эфирную связь между остатком глицерина и фосфатом полярной группы с образованием диацилглицерина и молекулы органического фосфата;
- фосфолипазы D, гидролизующие эфирную связь между фосфатом и остатком спирта, образующего радикал полярной группы фосфолипида.

Карбоксилэстеразы производят гидролиз водорастворимых низкомолекулярных эфиров, в том числе триглицеридов, образованных короткоцепочечными жирными кислотами ($\leq \text{C}_6$) [927].

Микробиологический анализ разнообразных гиперсоленых сред обитания демонстрирует огромное разнообразие бактерий и архей, продуцирующих липолитические ферменты. Исследование соленого озера оазиса Эль-Голеа,

расположенного в Алжире, способствовало выделению 35 галобактериальных штаммов, проявляющих липолитическую активность. В результате данного исследования была описана первая археальная липаза, продуцируемая экстремально галофильной археей *Natronococcus sp.* ТС6 [928]. Изучение других соленых озер Алжира (оз. Мельгир и др.) способствовало получению 44 изолятов галофильных архей, принадлежащих родам *Halorubrum*, *Halomicrobium* и *Haloferax*, также проявляющих липолитическую активность [929]. Попытки высева на селективные среды микробиоты из разных гиперсоленых ценозов Ирана и Индии демонстрируют обилие продуцирующих липолитические ферменты галофильных и галотолерантных бактерий, принадлежащих к родам *Bacillus*, *Halomonas*, *Piscibacillus*, *Oceanobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Thalassobacillus*, *Idiomarina*, *Salicola*, *Salinivibrio*, *Marinobacter*, *Chromohalobacter*, *Geomicrobium* и др. [930-935].

Липазы и эстеразы галофильных архей часто характеризуются как термо- и галостабильные ферменты, сохраняющие активность в широком диапазоне температур, соленостей и pH. Многие из данных ферментов чувствительны и проявляют максимальную ферментативную активность в присутствии значительных концентраций ионов Na^+ в реакционной среде [858, 860, 866, 878, 936-937]. Первая описанная археальная липаза, продуцируемая *Natronococcus sp.* ТС6, проявляет максимальную активность в среде 4 М раствора NaCl при нейтральном pH и температуре 50°C [938]. Экстремально галофильная архея *Haloarcula sp.* G41 продуцирует термостабильную липазу, оптимально активную при температуре 70°C в среде с содержанием 2,6 М NaCl с pH 8 [939]. Липаза археи *Haloarcula hispanica* 2TK2 проявляет максимальную активность в реакционной среде с условиями pH 8, 45°C и 4 М NaCl, однако сохраняет высокую активность в среде с концентрацией NaCl 5 М и при температурах вплоть до 90°C [940]. Галоархея *Haloarcula marismortui* продуцирует спектр вне- и внутриклеточных липаз и эстераз, проявляющих оптимальную активность в средах с высоким содержанием NaCl (от 0,5 до 5 М) [941]. *Halobacterium salinarum* NRC-1 продуцирует экстремально термо- и галостабильную эстеразу,

проявляющую оптимальную активность при температуре 80°C в среде 5 М раствора NaCl [942].

Ферменты галофильных бактерий также толерантны к экстремальным условиям среды. Полиэкстремофильная липаза бактериальной природы, продуцируемая галофильной бактерией *Salinivibrio sp.* SA-2, проявляет максимальную активность при pH 7,5 и температуре 50°C [932]. Внеклеточная липаза бактерии *Idiomarina sp.* W33 демонстрирует оптимальную активность в среде с концентрацией NaCl 1,7 М при pH 7 – 9 и температуре 60°C [943]. Умеренно галофильная бактерия *Marinobacter litoralis* SW-45 экспрессирует галоустойчивую в широком диапазоне соленостей (0 – 21% NaCl) липазу. Максимальная активность данной липазы достигается в среде 2 М раствора NaCl при pH 8 и температуре 50°C [944]. Оптимальная активность алкалустойчивой липазы бактерии *Halobacillus sp.* AP-MSU 8 наблюдается при pH 9 и 40°C в среде с концентрацией NaCl 2,5 М и в присутствии ионов Ba^{2+} или Mg^{2+} [945]. Галофильная липаза *Chromohalobacter sp.* обладает высокой активностью в средах 2,5 – 3,5 М NaCl при pH 8,5 и температуре 55°C [945]. Галофильная бактерия *Bacillus atrophaeus* FSHM2 продуцирует экстремально гало- и термостойкую алкалофильную липазу, оптимальная активность которой проявляется в 4 М растворе NaCl при pH 9 и 70°C [946]. Эстераза бактерии *Alkalibacterium sp.* SL3, выделенной из содового озера, устойчива в широком диапазоне солености (0 – 5 М NaCl) и pH (7 – 10), а также демонстрирует высокую стабильность при низких температурах (0 - 30°C) [947].

Наряду с протеазами и карбогидразами, липолитические ферменты крайне востребованы на промышленном рынке. Данные ферменты нашли широкое применение в пищевой, фармацевтической и химической промышленности. Липазы и эстеразы характеризуются как высоко регио- и хемоспецифичные ферменты, благодаря чему широко используются для осуществления процессов биохимического синтеза соединений медицинского и пищевого назначения, а также для синтеза биополимеров. Помимо высоких температур и экстремальных значений pH, химический синтез часто проводится в средах с низкой активностью

воды или в безводных средах. В подобных условиях мезофильные ферменты теряют активность, однако липазы и эстеразы экстремофильных микроорганизмов сохраняют активность как при высоких рН и температурах, так и в средах, содержащих органические растворители, что способствует применению данных экстремозимов в качестве перспективных катализаторов во многих процессах химического синтеза [858, 860, 866, 878, 948].

В последние годы наблюдается стремительный рост объемов мирового производства биодизеля. Биодизель является смесью сложных эфиров жирных кислот. Традиционно биодизель производится посредством щелочного гидролиза триглицеридов растительного и животного происхождения [949-952]. Однако, омыление триглицеридов, являющееся нежелательной побочной реакцией, протекающей параллельно с гидролизом, в значительной мере осложняет процесс осуществления последующих производственных стадий. Использование ферментативного гидролиза является решением данной проблемы [953-954]. На сегодняшний день известны два примера применения липаз галофилов в процессах производства биодизеля. Липаза галофильной бактерии *Idiomarina sp.* W33 (описана ранее) использовалась для получения биодизеля из масла ятрофы, получаемого из семян растений рода *Jatropha* семейства *Euphorbiaceae* (Молочайные). Процесс осуществлялся с применением фермента в свободной и иммобилизованной форме, производительность процесса составила 84 и 91% соответственно [943]. Другая липаза, применявшаяся в производстве биодизеля, продуцируется штаммом архей *Haloarcula sp.* G41 (описана ранее). Производительность процесса с применением данной липазы в свободной и иммобилизованной форме составила 80,5 и 89,2% соответственно. В качестве сырья для получения биодизеля в данном случае применялось соевое масло [939].

1.8.2.4. Катализ в средах органических растворителей

Традиционной реакционной средой для осуществления биокатализа является вода. Считалось, что биокатализ невозможен в средах органических растворителей ввиду активной денатурации белков, опосредующих каталитический процесс. Однако изучение многих экстремофильных организмов,

в том числе галофилов, способствовало появлению множества сообщений о способности их белков не только сохранять стабильность, но и проявлять высокую ферментативную активность в средах полярных и неполярных органических растворителей. Открытие уникальных свойств экстремозимов дало стимул для стремительного развития подходов для осуществления нетрадиционного биокатализа [955-960].

Биокатализ осуществляется как с использованием клеток организмов без нарушения их целостности (культур микроорганизмов или эукариотических клеток), так и с использованием отдельных клеточных компонентов, в частности ферментов [960-964]. На сегодняшний день известно и испытано на практике множество физико-химических систем, в которых возможно осуществление разных видов катализа с использованием разнообразных биокатализаторов. Такие системы характеризуются большим числом разнообразных параметров, которые можно объединить в две группы: тип и свойства биокатализатора, субстрата и продукта, число и физико-химические свойства фаз. Девисоном и коллегами была предложена система классификации сред для биокатализа на основе их трехсоставного обозначения, где первый компонент соответствует фазе, в которой находится биокатализатор, второй – фазе, несущей субстрат, третий – фазе, в которую реализуется продукт. Разные фазы имеют свои одно- или двухбуквенные обозначения: водная - А (aqueous), органическая – О (organic), паровая (смесь газа(ов)-носителя и пара) – V (vapor) и сверхкритическая жидкость (вещество при давлении и температуре выше критической точки) – SC (supercritical fluid). Стоит отметить, что авторы данной системы обозначений принимают за водную фазу также водные растворы водорастворимых органических соединений с содержанием последнего менее 20% об. Под органической фазой, помимо чистых органических веществ, также подразумеваются их водные растворы с содержанием вещества, превышающим 20% об. Индексы у буквенного обозначения фаз несут информацию о специфике компонента или используемого технологического решения. Например, индекс «i» говорит об использовании иммобилизованного фермента или клеток организма-производителя, а индекс «H»

свидетельствует о наличии гидратной оболочки у фермента. В соответствии с данной классификацией, можно выделить следующие физико-химические системы, подходящие для осуществления биокаталитических процессов [955]:

- AAA – монофазная водная среда, традиционная среда для биокатализа;
- O__ или O_n__ - нетрадиционная среда для биокатализа, в которой катализатор находится в органической фазе:
 - OOO - однофазная органическая среда;
 - OOV, OVO, OVV – вариации двухфазных систем, где вторая фаза – пар, и используется для подвода субстрата и/или отвода продукта;
 - OAA, OOA, OAO - вариации двухфазных систем, где вторая – водная фаза является носителем субстрата и/или продукта;
- A__ - нетрадиционные среды для водного катализа:
 - AOA, AAO, AOO – двухфазные системы водная «фаза – органическая фаза»;
 - AAV, AVA, AVV – двухфазные системы водная «фаза – пар/газ»;
 - A₁A₁A₂ – системы с двумя несмешивающимися или сепарированными мембраной водными фазами.

Помимо приведенных систем выделяют сложные трехфазные системы, включающие водную, органическую и газовую фазы в различных комбинациях. Однако, данные системы сложны в реализации, масштабировании и контроле, что делает их малоподходящими для применения в промышленных процессах.

Другой экзотический тип сред для осуществления катализа – сверхкритические жидкости. О биокатализе в таких средах на сегодняшний день известно мало [955].

Как говорилось ранее, однофазная водная среда (AAA) широко применяется в биотехнологии для осуществления подавляющего большинства биопроцессов: от культивирования микроорганизмов до осуществления различных ферментативных реакций [960-964]. Гетерофазные системы, где водная среда

является носителем биологического катализатора, будь то целые клетки или отдельные их компоненты, а посредством органической или газовой фазы осуществляется подвод субстратов или отвод продуктов, также широко распространены в промышленности. Примерами таких процессов является культивирование микроорганизмов, деградирующих газообразные (AVA) или жидкие углеводороды (AOA), процессы биодезодорации газов (AVV) [939, 943, 965-967]. Подобные системы подходят для жизнедеятельности мезофильных организмов и нормального функционирования их ферментов, однако интенсификация посредством физико-химических методов - высокие температуры и давления, экстремальные среды, высокие концентрации веществ и, как следствие, высокая осмолярность среды и низкая активность воды, в комбинации с применением культур экстремофильных микроорганизмов в качестве биокатализаторов, могут в значительной мере повысить эффективность технологических процессов, осуществляемых с их помощью [858, 956, 968-969].

В качестве фазы-носителя биокатализатора в случае использования ферментов может выступать как водная, так и органическая фазы. Использование органических растворителей для ферментативного катализа длительное время считалось невозможным ввиду инактивации ферментов в таких реакционных средах. Инактивация фермента в среде органического растворителя может происходить из-за его денатурации, стабилизации или ингибирования. Ингибирование происходит в результате необратимого связывания молекулы растворителя в активном центре фермента, однако данная причина инактивации является довольно редкой и устраняется посредством подбора другого растворителя. Денатурация и стабилизация ферментов, являющиеся следствием взаимодействия молекул белка и растворителя, - являются наиболее распространенными причинами их инактивации в органических средах. Денатурация молекулы белка в органических средах происходит в результате взаимодействия неполярных аминокислотных радикалов с молекулами растворителя, нарушения электростатических взаимодействий, стабилизирующих белковую молекулу. Молекулы ферментов обладают гидратной оболочкой,

необходимой для их нормального функционирования. В том случае, если в процессе взаимодействия белка-растворителя происходит вытеснение молекул растворителя из гидратной оболочки белка, это способствует увеличению поверхностной энергии, компактизации и, как следствие, потере конформационной мобильности молекулы фермента [956, 959]. Гиперсоленые среды оказывают аналогичное гиперстабилизирующее воздействие на молекулы белков галофильных организмов посредством высаливающих свойств ионов Na^+ . Однако, белки галофилов обладают рядом специфических адаптаций, в частности структурированной многослойной ион-гидратной оболочкой, препятствующим белковой агрегации отрицательным поверхностным зарядом и подвижной при низкой солености пространственной структурой, стабилизируемой в условиях низкой активности воды. Ввиду перечисленных особенностей галоэнзимы являются подходящими кандидатами на роль биокатализаторов в нетрадиционных водных и органических реакционных средах (см. раздел 1.6.4).

Нетрадиционные среды для катализа часто демонстрируют некоторые особенности природного окружения галоэнзимов. Примером нетрадиционной водной среды (АОО, АОА, ААО) являются обращенные мицеллы, часто используемые для ферментативного катализа в органических средах. Органическая фаза в данном случае является мажорной фазой и представлена длинноцепочечными спиртами и алифатическими углеводородами. Минорная водная фаза находится внутри обращенных мицелл и представлена гидратированными белками и свободной водой. Сами мицеллы формируются при помощи ПАВ. Стабильность галоэнзимов в такой системе зависит от активности воды. При активности воды ниже индивидуального для каждого белка порога вся внутримицеллярная вода связана и совместно с гидрофильными группами молекул ПАВ образует свойственную галоэнзимам упорядоченную ион-гидратную оболочку. Увеличение активности воды, происходящее в результате накопления свободной воды внутри мицеллы при внесении в систему, например, водорастворимого субстрата, дестабилизирует молекулу галоэнзима, что негативно сказывается на его активности. При наличии внутри мицеллы высоких

концентраций неорганических ионов, таких как Na^+ , снижения активности фермента не наблюдается [958]. Аналогичная ситуация наблюдается при использовании органических растворителей в качестве фазы-носителя фермента (O_nOO). В данном случае органическая фаза представлена неполярными растворителями, такими как трет-амиловый спирт, гексан, толуол и др. Белки нерастворимы в неорганических растворителях и распределение ферментов в органическом растворителе достигается за счет диспергирования его лиофилизированного препарата [956]. В процессе лиофилизации фермента с криопротекторными агентами (сахара, полиспирты, неорганические соли) происходит формирование гидратов, которые сохраняются в среде неполярного растворителя и дополнительно стабилизируются внесением в систему неорганических солей. Таким образом фермент оказывается в ион-гидратной оболочке в среде с экстремально низкой активностью воды [956, 970-971].

Многие ферменты галофильных бактерий и архей отличаются исключительной стабильностью в органических средах. Одними из первых белков, у которых была описана стабильность в средах органических растворителей, являются ферменты экстремально галофильных архей. Каталаза *Hbt. cutirubrum (salinarum)* демонстрирует колоколообразную зависимость активности от концентрации водных растворов этиленгликоля, глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО), свидетельствующую об увеличении каталазной активности при низких концентрациях растворителей (<5 М) и последующем ее уменьшении при высоких концентрациях (>5 М). Мезофильная каталаза, выделенная из говяжьей печени, демонстрирует снижение активности с увеличением концентрации растворителей в реакционной среде [972]. Аналогичные наблюдения были сделаны в отношении лактатдегидрогеназы *Hbt. salinarum* [973]. Позднее была описана стабильная органических средах протеаза *Hbt. salinarum* [974]. Глутаматдегидрогеназа *Hbt. salinarum* также характеризуется активностью в водных растворах различных органических веществ: 10% об. растворы этанола, метанола ацетона, ацетонитрила, 2-пропанола и диметилформамида способствуют сохранению от 30 до 74% активности фермента

в сравнении с его активностью в водной среде, а продолжительное нахождение фермента в 30% об. растворе ДМСО практически не сказывается на его активности [975].

На сегодняшний день известно большое количества археальных и бактериальных ферментов, устойчивых в различных органических растворителях. Алкогольдегидрогеназа другой экстремально галофильной археи *H. volcanii* демонстрирует высокую стабильность и длительное время сохраняет свою стабильность в растворах тетрагидрофурана (ТГФ, 10% об.), метанола (30% об.) и ДМСО (30% об.) [976]. Описанная ранее галоустойчивая α -амилаза галофильной бактерии *Nesterenkonia sp.* F длительное время сохраняет стабильность как в водных растворах органических соединений, так и в безводных органических растворителях. Данный фермент демонстрирует активности в реакционных средах с 20% об. этанола, ацетона и циклогексанола, сопоставимые с его активностью в водной среде. Также стабильность и активность α -амилазы *Nesterenkonia sp.* F длительное время сохраняется в присутствии бензола, толуола, циклогексана, хлороформа и 1-деканола [977]. Галоустойчивая протеаза бактерии *Geomicrobium sp.* EMB2 на протяжении 72 часов сохраняет стабильность как в средах с 25 и 75% об. полярных (этанол, 1-бутанол), так и неполярных растворителей (бензол, толуол, циклогексан, гептан, изооктан, декан, додекан). Эта протеаза также проявляет высокую активность в присутствии 2% растворов таких ПАВ, как додецилсульфат натрия, цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ), Tween 20, Tween 80 и др. [978]. Липаза, секретируемая бактерией *Idiomarina sp.* W33, сохраняет более 80% активности в водных растворах глицерина, ДМСО, а также длительное время проявляет активность в присутствии бензола, толуола, циклогексана, н-гексана и изооктана [943].

Известны примеры успешного применения галофильных ферментов в нетрадиционных водных и органических средах для получения технологически значимых продуктов. Описанные ранее процессы получения биодизеля при помощи липаз галоархеи *Haloarcula sp.* G41 и галофильной бактерии *Idiomarina sp.* W33 осуществлялись в водно-органических средах. Реакция

трансэтерификации соевого масла, катализируемая очищенной липазой археи *Haloarcula sp.* G41, осуществлялась в реакционной смеси, содержащей 6 мл. трет-бутанола (~79% масс.), 0,96 мл. метанола (~13% масс.) и 0,5 мл. воды (~8% масс.), при температуре 70°C на протяжении 72 часов [939]. Биоконверсия масла ятрофы в биодизель, осуществляемая при помощи изолированной липазы бактерии *Idiomarina sp.* W33, также производилась в среде с крайне низкой активностью воды – содержание воды в среде составляло 0,7% об., органическая фаза была представлена смесью метанола и масла ятрофы в молярном соотношении 4:1 [943]. Алкогольдегидрогеназа галофильной археи *Haloferax volcanii* используется для энантиоспецифичного синтеза ароматических спиртов из ароматических альдегидов в среде совместного водного раствора этанола (5% об.), ацетонитрила (5% об.) и ДМСО (5% об.) [979].

1.8.3. Бактериородопсин

Бактериородопсин (БР, bacteriorhodopsin) является трансмембранным светочувствительным белком, обнаруженным впервые у экстремально галофильной археи *Halobacterium salinarum* (см. раздел 1.7.3). Уникальные свойства БР как высокоэффективной протонной помпы, поглощающей видимый свет в диапазоне 380-640 нм, стабильной в условиях высокой солености (до 5 М NaCl), в широком диапазоне pH (5 – 11) и при высоких температурах (до 140°C), а также тот факт, что *Hbt. salinarum* является перспективным промышленным продуцентом, способным синтезировать бактериородопсин в больших количествах, делает данный белок перспективной основой для создания широкого спектра биоэлектронных и оптических устройств [772-773, 980-982]. Важной особенностью бактериородопсина для применения в биоэлектронике и оптике является фотоцикл БР - последовательный переход между устойчивыми конформациями-интермедиатами, инициируемый и сопряженный с процессом фотоизомеризации ретиналя – кофактора БР каротиноидной природы, ковалентно связанного с белком посредством кетиминной связи (основания Шиффа). Результатом фотоцикла БР является перенос протона через клеточную мембрану,

приводящий к созданию трансмембранного электрохимического потенциала, тем самым конвертируя световую энергию в химическую (см. раздел 1.7.3).

В основе большинства технологий, основанных на применении БР, лежит создание пленок с его правильной пространственной ориентацией, которая необходима оптимального функционирования и стабильности белка. В цитоплазматической мембране живых клеток молекулы БР образуют пурпурные мембраны – псеводкристаллические образования, состоящие из тримеров молекул БР. Пурпурные мембраны являются устойчивыми образованиями и сохраняются в процессе выделения бактериородопсина из клеток продуцента [777-779]. Для правильной ориентации пурпурных мембран в искусственных условиях применяют ряд методов: метод Ленгмюра – Блоджетт, электрофоретическую седиментацию, электростатическую адсорбцию, связывание с биотин-стрептавидиновым комплексом и иммунопреципитация. Все из перечисленных методов, за исключением иммунопреципитации, основаны на разнице зарядов разных концов молекулы БР, что обеспечивает их правильную ориентацию и позволяет производить высокоэффективное осаждение на подложки разного типа [983-988].

Благодаря устойчивым интермедиатам главного и побочного фотоциклов БР, каждый из которых имеет разные времена перехода и жизни, а также возбуждается светом разной длины волны, данный белок может быть использован для создания голографической объемной памяти и оптических процессоров [981-982]. Исследования показывают, что основанная на БР оптическая память подходит для записи и считывания информации в виде двоичного кода. Возбуждение зеленым светом БР в его исходном состоянии (bR) индуцирует его главный фотоцикл, начинающийся в состоянии К и заканчивающийся в состоянии О. Состояние О является точкой ветвления основного цикла: из данного состояния белок может перейти к своему исходному состоянию (bR) или под воздействием красного света осуществить переход к состояниям побочного фотоцикла Р и Q. Белок в состоянии О соответствует бинарному 0, в то время как состояние Q расценивается как бинарная 1. Процесс перехода от состояния О

через состояние Р в состояние Q является процессом записи информации. Извлечение информации происходит посредством возбуждения бактериородопсина в состоянии Q синим светом [989]. Фотоцикл БР также делает его подходящим для использования в создании оптических переключателей и логических вентилей. Как говорилось ранее, каждое из состояний фотоцикла имеет индивидуальную продолжительность жизни. Наиболее продолжительными временами жизни характеризуются состояния М и К, способные до нескольких секунд сохранять стабильность. Так начальное состояние bR может расцениваться как активное, при котором происходит передача сигнала, а интермедиаты М или К соответствовать инактивированному состоянию, при котором передача сигнала не осуществляется [991-992]. Согласно некоторым исследованиям, благодаря способности интермедиатов фотоцикла БР отвечать возбуждением с последующим переходом в исходное состояние на воздействие монохромного излучения разной длины волны, позволяет также использовать данный белок в качестве различных вентилей, опосредующих элементарную логику (логические вентили AND, OR, NOT, NOR, NAND и XOR) [993-994].

Бактериородопсин также применяется в создании сенсibiliзирoванных красителем солнечных батарей, или ячеек Гретцеля (СКСБ, DSSC, dye-sensitized solar cell) [995-996]. Ячейка Гретцеля состоит из двух электродов: светочувствительного анода и платинового или угольного катода, находящихся в среде электролита – раствора йодида щелoчного металла (например, LiI) и молекулярного йода в органическом растворителе, формирующих пару йодид/трийодид в процессе работы ячейки. Светочувствительный анод, как правило, представлен наноструктурами, покрытыми красителем – бактериородопсином или другим светопоглощающим веществом, такими как наночастицы или нанотрубки TiO₂, наночастицы ZnO₂, золота и др. Краситель, возбужденный солнечным светом, передает электрон веществу наноструктур-носителей, которые далее передают его во внешнюю цепь. На электроде осуществляется восстановление трийодид-аниона (I₃⁻) с образованием трех ионов I⁻, которые в свою очередь восстанавливают молекулу красителя, вновь окисляясь

с образованием I_3^- [995-997]. Некоторые эксперименты с ячейками Гретцеля, в которых в качестве красителя использовался БР совместно с квантовыми точками или слоем золота, покрывающими поверхность анода, демонстрируют передачу электрона от БР к полупроводнику в сухих ячейках, не содержащих электролита. На сегодняшний день эффективность конверсии солнечной энергии в электрическую посредством ячеек Гретцеля с использованием бактериородопсина варьируется в диапазоне 0,09 – 0,35% [981-982, 998-1000].

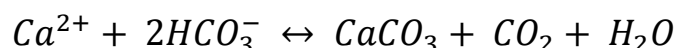
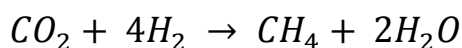
Благодаря высокой чувствительности БР к внешним раздражителям различной природы, пленки на его основе имеют большой потенциал для использования их в качестве чувствительных элементов биосенсоров. Фотодетекторы на основе БР демонстрируют высокую чувствительность, а также маленькое время реагирования, а созданные на их основе фотоматрицы – высокую разрешающую способность [982]. Бактериородопсиновые фотодетекторы также характеризуются широким диапазоном чувствительности – от УФ до инфракрасного излучения, и способны фиксировать излучения в рентгеновском диапазоне, что позволяет с их помощью в реальном времени фиксировать радиационное излучение, его энергию и дозу [1001-1002]. Высокая чувствительность и скорость реагирования позволяют создавать на основе БР датчики движения, способные также фиксировать скорость и направление движения объектов [1003-1004]. Использование естественных и мутантных аналогов БР для получения гетерогенных светочувствительных матриц позволяет создавать цветочувствительные искусственные аналоги сетчатки глаза [1005]. Бактериородопсин демонстрирует различные оптические свойства в зависимости от влажности окружающей среды, а также при наличии и отсутствии паров аммиака и пероксида водорода в атмосфере, что говорит о возможности его применения в качестве чувствительного элемента химических и гигроскопических датчиков [1006-1007]. Использование в фотодетекторах пленок БР, модифицированных при помощи антител к конкретным антигенам (бактерии, белки и т.д.) демонстрирует возможность создания высокоточных фотоэлектрических иммуносенсоров. Связывание антигена антителами на

поверхности детектора способствует уменьшению фототока, причем чем больше антигена находится в среде, тем меньше фототок, что было продемонстрировано в результате испытания такого иммуносенсора в среде с растущей популяцией *E. coli*. В ходе данного эксперимента было установлено, что такой фотоэлектрический иммуносенсор обладает чувствительностью в диапазоне $1 - 10^7$ КОЕ на 10 мл культуральной среды [1008].

1.8.4. Биобетон

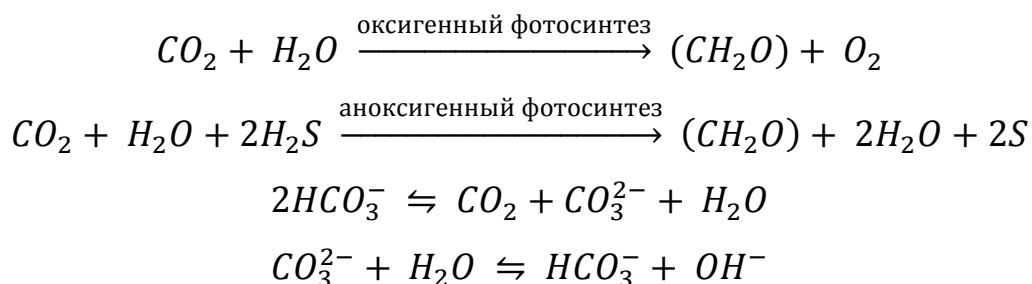
Микробно-индуцированное осаждение кальцита (карбоната кальция, CaCO_3) (МИОК, MICP, *microbially induced calcite precipitation*) – процесс образования карбоната кальция, опосредуемый биохимической активностью микроорганизмов. В данном процессе микроорганизмы играют роль источника карбонат-ионов (CO_3^{2-}), вступающих в реакцию с ионами кальция (Ca^{2+}), большие концентрации которых присутствуют в окружающей среде, что способствует образованию и осаждению кристаллов кальцита (CaCO_3). На сегодняшний день описано несколько автотрофных и гетеротрофных стратегий, позволяющих микроорганизмам осуществлять МИОК [1009-1013]:

- Неметилотрофный метаногенез. Автотрофный процесс, опосредуемый некоторыми археями-метаногенами. В ходе данного процесса оксид углерода и водород конвертируются микроорганизмами в метан. Метан в анаэробных условиях окисляется до гидрокарбоната посредством сульфатредукции. Гидрокарбонат-ионы в свою очередь реагируют с ионами кальция с образованием карбоната кальция.

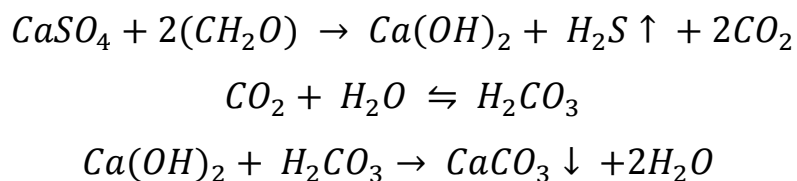


- Фотосинтез. Автотрофный процесс, опосредуемый фототрофными микроорганизмами, как кислородными (цианобактерии), так и анакислородными (пурпурные бактерии). В процессе фотосинтеза происходит образование углеводов из воды и углекислого газа под действием солнечного света. При кислородном фотосинтезе донором

электрона служит кислород молекулы воды, а в случае анаэробного фотосинтеза донором электрона является сера молекулы сероводорода. В процессе фотосинтеза происходит ассимиляция оксида углерода из обогащенных гидрокарбонат-ионами сред, что способствует накоплению карбонат-ионов, повышению pH среды и осаждению нерастворимого карбоната кальция.

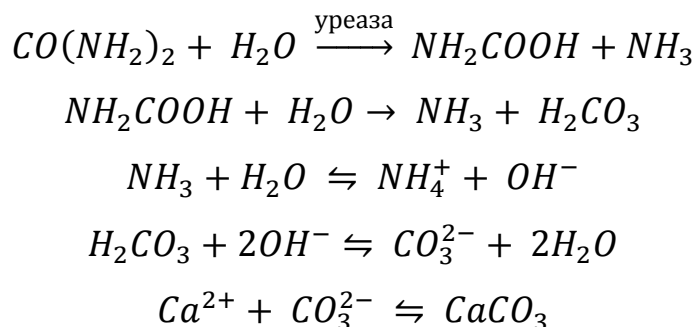


- Сульфат-редукция. Гетеротрофный процесс, опосредуемый сульфат-редуцирующими бактериями (СРБ) в анаэробных условиях при наличии источников углерода в окружающей среде. СРБ катаболизируют субстрат (углеводы) с образованием гидрокарбоната в процессе восстановления атома серы сульфат-ионов, источником которых является слаборастворимый сульфат кальция. Образующийся в процессе восстановления сульфат-ионов сероводород улетучивается из реакционной среды, способствуя ее защелачиванию и, как следствие, осаждению карбоната кальция.



- Процессы цикла азота. В данном случае МИОК может производиться в результате трех разных метаболических процессов: аммонификации аминокислот, осуществляемой в аэробных условиях; нитрат-редукции, осуществляемой аналогично сульфат-редукции в анаэробных условиях при наличии источников углерода, а также нитрат-ионов и ионов кальция; и гидролиз мочевины и мочевой кислоты. В ходе данных процессов происходит образование карбонат-ионов, гидрокарбонат-

ионов и аммиака. Образование аммиака способствует защелачиванию среды, что смещает химическое равновесие между гидрокарбонат- и карбонат-ионами в сторону последних. Увеличение концентраций карбонат-ионов в среде, содержащей Ca^{2+} , провоцирует образование и осаждение нерастворимого карбоната кальция. Данный процесс может быть подробно рассмотрен на примере реакций, происходящих в среде при МИОК посредством гидролиза мочевины:



Кристаллизация кальцита происходит на отрицательно заряженной поверхности клетки микроорганизмов. Экспонированные в окружающую среду отрицательно заряженные химические группы связывают ионы кальция, тем самым образуя ядра кристаллизации [1009-1013].

Биоцементирование при помощи МИОК является перспективным направлением развития в области биотехнологий. Биоцементирование имеет большой потенциал в качестве экологичного способа укрепления и предотвращения эрозии сыпучих почв, а также в сфере строительства дорог, искусственных водных объектов (каналов, прудов и др.), укрепления дамб, склонов и береговых линий водоемов [1014-1018]. Препараты на основе кальцинирующих микроорганизмов могут успешно применяться для восстановления повреждений («заживление» трещин в бетоне и камне) и продления срока службы (упрочнение высокопористых пород камня, снижение пористости железобетонных конструкций для предотвращения проникновения коррозионных веществ к элементам армирования) конструкций, а также для производства строительных материалов (производство строительных блоков, модификация свойств бетона и строительных растворов для обеспечения эффекта

самовосстановления трещин и пор) [1013, 1019-1028]. Также подобные препараты могут найти применение в реализации экологических проектов, целью которых является восстановление пострадавших в результате катаклизмов природных объектов (упрочнение и восстановление целостности горных пород, пострадавших в результате сейсмической активности, выветривания, антропогенного воздействия и т. д.), ремедиация загрязнений (иммобилизация солей тяжелых металлов, радиоактивных изотопов и других загрязнителей неорганической и органической природы в биогенном кальците) или контролируемая модификация экосистем (создание поверхностей, подходящих для заселения морской биотой) [1029-1033].

Условия осуществления МИОК, а также тот факт, что данный процесс будет использован для достижения определенных технологических или экологических целей, накладывает ряд ограничений на используемые микроорганизмы. Специфика применения МИОК подразумевает, что кальцинирующие микроорганизмы должны быть толерантны к средам с высоким содержанием солей и щелочным рН, для успешного проникновения глубоко в трещины и поры клетки микроорганизмов не должны агрегироваться, однако также должны обладать способностью закрепляться на целевой поверхности. Также для применения биоцементирующих препаратов в городском или любом другом биоценозе важно, чтобы кальцинирующий микроорганизм не был патогеном и не провоцировал нежелательную сукцессию видов [1011]. Для применения в составе самовосстанавливающегося бетона или цементных растворов кальцинирующий микроорганизм должен обладать способностью длительное время пребывать в малоактивном состоянии в условиях недостатка влаги, питательных веществ и кислорода. С точки зрения технологий производства и применения бетона и цементных растворов биодобавки не должны влиять на их характеристики, а также должны в полной мере сохранять свои свойства на всех стадиях технологического процесса под воздействием механического и других типов стресса [1034].

Исходя из перечисленных требований галофилы могут стать идеальными кандидатами на роль кальцинирующих микроорганизмов. Многие галофильные микроорганизмы являются полиэкстремофилами и приспособлены не только к низкой активности воды окружающей среды, но и к экстремальным рН и температурам, высоким концентрациям двухвалентных ионов (Ca^{2+} , Mg^{2+} и др.), низким концентрациям доступного кислорода и питательных веществ. Способность многих галофилов длительное время пребывать в дегидратированном состоянии делает возможным создание биоцементирующих препаратов не только на основе микроорганизмов, способных образовывать спящие формы типа спор, но и на основе неспорообразующих микробов (см. разделы 1.1.1 и 1.1.4).

Среди галофильных микроорганизмов можно найти представителей разных филогенетических групп, способных осуществлять каждый из приведенных типов МИОК – современной науке известно множество галофильных гетеротрофных микроорганизмов, цианобактерий, пурпурных бактерий и архей-метаногенов (см раздел 1.3.2.). Однако, МИОК, сопряженный с гидролизом мочевины, качественно выделяется на фоне других типов данного процесса благодаря своим эффективности, скорости и простоте контроля [1012]. Мочевина является конечным продуктом метаболизма азотсодержащих соединений у млекопитающих, а также у некоторых рыб, земноводных и пресмыкающихся, благодаря чему данное соединение, как и микроорганизмы его утилизирующие, широко распространены во многих экосистемах [1035]. Уреаза-продуцирующие бактерии (УПБ), как экстремофильные, так и мезофильные, были найдены среди представителей родов *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Spoloactobacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*, *Halmonas*, *Helicobacter*, *Aerobacter*, *Methylocystis*, *Mухococcus*, *Pseudomonas*, *Salinivibrio* и др. [1009].

Бактерии рода *Bacillus* являются наиболее перспективными бактериями для применения в составе биоцементирующих препаратов ввиду их большей уреазной активности в сравнении с другими уреолитическими микроорганизмами [1011, 1036]. Представители рода *Bacillus* – палочковидные, грамположительные,

спорообразующие бактерии, характеризуются как типичные представители микробиоты почвенных и водных экосистем, приспособленные к осуществлению жизнедеятельности в широком спектре условий, в том числе под воздействием экстремальных температур и pH в гиперсоленых средах. Бактерии рода *Bacillus*, за редким исключением, непатогенны в отношении человека и широко применяются в пищевой промышленности. Другой важной особенностью данных бактерий является их способность образовывать споры, что позволяет им длительное время сохранять жизнеспособность в спящем состоянии, будучи инкапсулированными в бетон [265, 1036].

Среди бактерий рода *Bacillus* известно множество гало-, алкали- и термотолерантных представителей [1037]. Некоторые штаммы промышленно используемых видов данных бацилл, например, *B. subtilis* и *B. megaterium*, характеризуются как галотолерантные [1038-1041]. Уреолитические галотолерантные бациллы, близкородственные бактериям рода *Bacillus*, были изолированы из образцов почвы, отобранных в локациях с континентальным (Украина) и тропическим (Сингапур) климатом. Выделение чистых культур данных бактерий осуществлялось на минеральной среде, содержащей 100 г/л NaCl [1042]. Штамм *Bacillus sp.* VUK5, обитающий в почве в континентальной климатической зоне, демонстрировал уреазную активность 9,6 мМ/мин. Уреолитическая активность штамма *Bacillus sp.* VS1, изолированного почвы тропической климатической зоны, составила 8,3 мМ/мин. Эксперименты с осуществлением биоцементирования посредством штамма *Bacillus sp.* VS1 демонстрировали образование плотной и слабо водопроницаемой корки кальцита на поверхности слоя песка. Анализ минерального состава культуральной жидкости после окончания процесса цементирования свидетельствовал о значительном снижении содержания ионов кальция в сравнении с его начальной концентрацией: до 95% растворенного в минеральной среде кальция было осаждено, из которого большая часть (0,6 г/см²) осаждалась с образованием кальцитной корки и порядка 17 - 22% проникало и осаждалось в песчаной подложке [1043]. Штамм *Bacillus sp.* ТК2d – легко галофильная бактерия,

выделенная из морских донных осадков, также демонстрирует способность к МИОК. Данная бактерия была успешно использована для иммобилизации в кальците радиоактивного изотопа стронция (^{90}Sr). Культивирование на протяжении 4 суток глубинной культуры *Bacillus sp.* TK2d на среде, содержащей 30 г/л NaCl и 1 мМ солей ^{90}Sr , способствовало иммобилизации >99% изотопа в биогенных кристаллах кальцита [1044]. Пьезотолерантная морская бактерия *Bacillus sp.* NIOTVJ5, близкородственная виду *B. thuringiensis*, характеризуется как галотолерантный (рост наблюдается при концентрациях NaCl до 100 г/л, оптимальная соленость составляет 40 г/л NaCl) и алкалитолерантный (оптимально растет при щелочном pH вплоть до 12 ед.) микроорганизм. Данная бактерия способна демонстрировать высокую уреазную активность (>500 ME/мл) на протяжении 168 часов [1045]. Другая галотолерантная бактерия *Bacillus flexus* NM25, проявляющая уреазную активность, способна расти в средах с соленостью вплоть до 20% NaCl при pH в диапазоне 4 – 12 [1046].

Микробиологический анализ соленых биоценозов демонстрирует большое видовое разнообразие уреолитических галофильных и галотолерантных бактерий. Однако, стоит отметить, что подавляющее большинство уробактерий, осуществляющих биоминерализацию карбоната кальция, относятся к филуму фирмикут, в частности к классам *Bacilli*, где наиболее представлен род *Bacillus*, и *Clostridia*, что говорит о важной роли данной группы микроорганизмов в процессах биоминерализации [1047-1053]. Анализ факультативно анаэробного и анаэробного микробных уреолитических сообществ, выделенных из соленого содового озера Соап (США, Вашингтон) на средах с содержанием NaCl варьировавшимся от 0 до 100 г/л (0 – 10%) (оптимальное содержание NaCl составило 50 г/л, 5%), выявил, что факультативно анаэробное бактериальное сообщество более чем на 99% представлено бактериями рода *Bacillus*. В облигатно анаэробном уреолитическом сообществе порядка 99% микробиоты представлено бактериями родов *Bacillus* (39%) и *Clostridium* (60%) [1047]. Микробиологический анализ образцов, отобранных на солончаке Салар-де-Атакама (Чили), позволил изолировать и описать 11 штаммов уреолитических

бактерий, обладающих способностью индуцировать образование кальцита. Филогенетический анализ 16S рРНК последовательностей данных микроорганизмов позволяет отнести их к следующим видам микроорганизмов: *Bacillus subtilis* (5 штаммов), *Marinilactibacillus psychrotolerans* (1 штамм), *Pseudomonas gessardii* и *P. fluorescens* (2 штамма), *Rhodococcus erythropolis* (1 штамм), *Halomonas sp.* (1 штамм) и *Shewanella sp.* (1 штамм) [1048]. Морфологический анализ изолятов, полученных их образцов морской воды и верхних осадочных слоев, отобранных в нескольких локациях береговой линии провинции Антофагаста (Чили), демонстрирует численное превосходство грамположительных бацилл и кокков среди кальцинирующих уробактерий. Из 213 галотолерантных бактериальных изолятов 24 проявляли уреолитическую активности и демонстрировали способность образовывать кристаллы кальцита. Более 80% данных 24 изолятов были охарактеризованы как грамположительные бациллы и кокки, что может свидетельствовать о том, что их большинство является представителями порядка *Bacillales* [1049]. Исследование морских седиментов на предмет кальцинирующих уробактерий, отобранных в другой географической локации (Бэйдайхэ, Китай), демонстрирует схожие результаты. Филогенетический анализ 20 полученных изолятов свидетельствовал о принадлежности 19 изолятов к фирмикутам (15 штаммов *Sporosarcina sp.* и 4 штамма *Bacillus sp.*) и 1 изолята к протеобактериям (*Brevundimonas sp.*) [1050].

1.8.5. Полимеры

Галофильные микроорганизмы являются перспективными продуцентами таких биополимеров, как экзополисахариды (ЭПС) и полигидроксиалканоаты (ПГА) [3, 804-807, 810-811, 1054-1061].

Многие микроорганизмы, с том числе представители галофильных бактерий и архей продуцируют ПГА в качестве запасного источника углерода и энергии [3, 804-807, 810-811, 1054, 1057, 1060]. ПГА классифицируются в зависимости от их химической структуры. По своей химической природе ПГА являются полиэфирами, образуемыми посредством полимеризации различных гидроксикарбоновых кислот. В зависимости от длины радикалов кислот-

мономеров, ПГА разделяют на короткоцепочечные ($C_3 - C_5$), с углеродными цепями средней длины ($C_6 - C_{14}$). К короткоцепочечным ПГА относятся полимеры, образованные 3-гидроксипропановой, 4-гидроксипропановой и 3-гидроксивалериановой кислотами. ПГА, которые можно классифицировать как средне- и длинноцепочечные, образуются 3-гидрогексановой, 3-гидрооктановой и другими гидроксикарбоновыми кислотами. В зависимости от химического строения кислот, участвующих в образовании молекулы ПГА, она может быть как гомополимерной, так и гетерополимерной. Гетерополимерные ПГА являются сополимерами разных гидроксикарбоновых кислот. Короткоцепочечные ПГА, такие как полигидроксипропанаты (ПГБ, поли-3-гидроксипропанат, поли-4-гидроксипропанат и их сополимер поли(3-гидроксипропанат-ко-4-гидроксипропанат), а также сополимер поли(3-гидроксипропанат-ко-3-гидроксивалерат) (ПГБВ) являются наиболее распространенными ПАГ, гранулы которых часто обнаруживаются в клетках различных микроорганизмов [1062-1064].

На сегодняшний день известно множество микроорганизмов-продуцентов ПГА, способных осуществлять их биосинтез на основе разнообразных субстратов: от сахаров и спиртов до богатых углеродом промышленных стоков [1065-1069]. ПГА являются биоразлагаемыми и биосовместимыми полимерами, чьи свойства сопоставимы со многими широко используемыми в современной промышленности пластиками [1070]. Благодаря своей экологичности и дешевизне ПГА являются перспективными пластиками, обладающими высоким практическим потенциалом в изготовлении упаковочных материалов, пленок, сложных пластиковых изделий посредством 3D-печати, медицинских имплантов, текстиля и др. [1071-1075]. Гранулы ПГА в липидно-белковой оболочке – в такой форме они присутствуют в клетках микроорганизмов-продуцентов - являются перспективной системой таргетированной доставки лекарственных средств внутрь организма [1075]. Данный класс биополимеров имеет определенный потенциал в качестве нового источника биотоплива [1076-1077].

Среди галофильных микроорганизмов известно много перспективных продуцентов ПГА, принадлежащих как к бактериям, так и археям. Использование галофильных организмов в качестве промышленных продуцентов ПГА имеет ряд существенных преимуществ: сниженный риск контаминации сред ввиду их экстремальной солености, способность галофилов потреблять широкий спектр субстратов, а также простота деструкции клеток галофильных микроорганизмов. Тот факт, что ПГА является внутриклеточным биополимером и накапливается путем образования внутриклеточных гранул, подразумевает необходимость разрушения клеток на этапе отделения ПГА от биомассы микроорганизма-продуцента. Для разрушения клеток мезофильных продуцентов с целью экстракции гранул ПГА применяются водные растворы детергентов (например, додецилсульфата натрия), что в значительной степени усложняет дальнейшую утилизацию промышленных стоков. Галофильные микроорганизмы в данном случае выгодно отличаются от мезофильных тем, что для деструкции клеток успешно достигается путем обработки их биомассы дистиллированной водой [804-807, 810-811, 1054, 1057, 1060].

К галоархеям, продуцирующим ПГА (в частности ПГБ и ПГБВ), относятся такие микроорганизмы, как *Haloarcula marismortui* [1078], *Haloquadratum walsbyi* [1079], *Halogeometricum borinquense* [1080], *Natrinema altunense* [1081] и *Haloferax mediterranei*. *H. mediterranei* является наиболее перспективным галоархеальным продуцентом ПГА. Данная галоархея в больших количествах продуцирует ПГА разного состава, характеризующиеся разными свойствами, потребляя при этом широкий спектр углеродных субстратов. Непрерывное культивирование *H. mediterranei* в условиях фосфорного голодания на среде с абсолютным содержанием солей (АСС) равным 25% мас., содержащей 2% крахмала в качестве источника сырья и энергии, демонстрировало накопление 10 г/л биомассы, 60% которой приходилось на долю ПГБ. Выход ПГА составлял 0,33 г/г субстрата. Данные показатели оставались стабильными на протяжении 3-х месяцев непрерывного культивирования [1082]. Культивирование *H. mediterranei* на богатой среде, содержащей казаминовые кислоты (7,5 г/л) в качестве источника

углерода и дрожжевой экстракт (10 г/л) как источник азота, с АСС 25% демонстрировало максимальное накопление ПГА 71,1% [1083]. В зависимости от типа источника углерода и состава питательной среды *H. mediterranei* способен продуцировать большие количества гетерополимерных ПГА, как правило ПГБВ и П(3ГБ-ко-3ГВ-ко-4ГБ) (ПГБВ4ГБ). При культивировании *H. mediterranei* на среде с глюкозой и дрожжевым экстрактом в качестве источников углерода и азота на 5 сутки процесса наблюдалось образование 85,8 г/л АСБ, 48,6% которой приходилось на долю ПГА. Анализ полученных ПГА свидетельствовал о наличии двух разных фракций ПГБВ с молярными массами 569,5 и 78,2 кг/моль и молярными долями 3-гидроксивалерата 10,7% и 12,3% соответственно [1084]. Использование винассы (спиртовой барды) в качестве источника углерода для биосинтеза ПГА *H. mediterranei* демонстрировало накопление 70% ПГА от АБС, а максимальная концентрация ПГА составляла 19,7 г/л. В данном случае ПГА был идентифицирован как ПГБВ, содержание 3-гидроксивалерата в котором варьировалось от 12,36% до 14,09%, в зависимости от способа предобработки винассы [1085]. Культивирование *H. mediterranei* на глицериновой фракции отходов производства биодизеля позволяло достигать производительности по ПГА 0,12 г/л*ч, при этом накопление полимера в клетках составляло порядка 75,4% АСБ. В данном случае ПГА был классифицирован как ПГБВ (~10% 3-гидроксивалерата). При внесении в питательную среду таких добавок, как γ -бутиролактон, прекурсора 4-гидроксипентановой кислоты, наблюдалось образование гетерополимера ПГБВ4ГБ, содержащего 12% мол. 3-гидроксивалерата и 5% мол. 4-гидроксипентаната [1086]. Недавнее исследование демонстрирует, что в качестве нетрадиционного сырья для производства ПГА посредством культивирования *H. mediterranei* могут быть использованы гидролизаты биомассы водорослей. Культивирование культуры галоархеи на 25% гидролизате водоросли *Ulva* sp. демонстрировало накопление 3,8 г/л биомассы, порядка 58% которой приходилось на долю ПГБВ [1087].

Среди галофильных бактерий наиболее перспективными продуцентами ПГА являются представители рода *Halomonas*. В отличие от галоархей, которые

являются экстремальными галофилами, умеренно галофильные бактерии рода *Halomonas* оптимально растут при солености среды 10 – 15% NaCl, что способствует значительному сокращению расходов на сырье, необходимое для осуществления их культивирования. Кроме того, галофильные бактерии отличаются большей универсальностью с точки зрения потребляемых субстратов [212]. Культивирование *H. boliviensis* LC1 на среде с содержанием NaCl 4,5% и бутановой кислотой и ацетатом натрия в качестве источников углерода и энергии демонстрировало накопление ПГБ в количестве 88% от АСБ [1088]. При использовании глюкозы в качестве источника углерода при культивировании бактерии *H. bluephagenesis* TD01 наблюдался выход биомассы продуцента 80 г/л, из которых 80% приходилось на долю ПГБ [1089]. Культивирование *H. bluephagenesis* TD40 на среде, содержащей глюкозу, γ -бутиролактон и кукурузный ликер (побочный продукт мокрого помола кукурузы) после 36 часов процесса демонстрировало накопление 100 г/л биомассы продуцента, от 60,4% до 74% которых в зависимости от соотношения источников углерода было представлено гранулами поли(3-гидроксibuтирата-со-4-гидроксibuтирата) [1090]. Использование растительных отходов, таких как багасса (измельченные стебли сахарного тростника после отжима), кожура фруктовых плодов и обезжиренный жмых, для культивирования *H. campisalis* MCM B-1027 с целью получения ПГА, демонстрировало накопление до 47% ПГБВ от АСБ [1091]. Культивирование этого же штамма-продуцента на питательной среде с содержанием мальтозы и дрожжевого экстракта в качестве источников углерода и азота при разных условиях демонстрировало накопление от 45% до 81% ПГА от АСБ [1092]. Культивирование *H. halophila* на таком растительном сырье, как кислые гидролизаты молочной сыворотки, соевой муки, кукурузных стеблей, отработанных молотых кофейных зерен, а также на мелассе демонстрировало значительную выработку ПГА, массовая доля которого могла достигать 82% АСБ [1093].

Экзополисахариды бактериального происхождения получили широкое распространение в современной промышленности и используются в пищевой,

косметической, фармацевтической и медицинской отраслях. Огромное количество разнообразных бактериальных ЭПС, характеризующихся разным строением, физическими и химическими свойствами находят применение в качестве загустителей и эмульгаторов не только пищевого и медицинского назначения, но и в таких процессах как газо- и нефтедобычи [804-807, 810-811, 1055-1059, 1061]. Микроорганизмы и продуцируемые ими полисахариды, благодаря их управляемой вязкости, эмульгирующим свойствам и другим специфическим характеристикам, являются ключевыми элементами современных методов увеличения нефте- и газоотдачи пласта, таких как, например, гидроразрыв пласта (ГРП) и микробное усиление нефтедобычи (microbially-enhanced oil recovery, MEOR), а также в качестве компонента буровых растворов. Несмотря на разнообразие потенциальных применений, ЭПС должны обладать рядом конкретных характеристик, в частности, проявлять высокую и управляемую вязкость в низко концентрированных растворах, обладать устойчивостью в условиях высоких температур, агрессивных химических сред, а также в присутствии высоких концентраций минеральных солей [1094-1095]. Благодаря полиэкстремальному характеру природных сред обитания галофильных микроорганизмов, многие из продуцируемых ими ЭПС соответствуют предъявленным требованиям.

Способность продуцировать значительные количества ЭПС была обнаружена у многих галофильных архей, принадлежащих родам *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronococcus* и *Halobacterium* [1057]. *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 стал первым галоархеальным микроорганизмом, у которого была обнаружена и описана способность продуцировать ЭПС. Данный штамм продуцировал до 3 г/л ЭПС на средах содержанием NaCl 25% и глюкозы или сахарозы в качестве источника углерода и сырья. Анализ химического состава и свойств полисахарида позволил установить, что это кислый сильно сульфатированный гетерополисахарид, чей мономерный состав представлен в основном маннозой, а также глюкозой, галактозой, аминасахарами и глюкуроновыми кислотами, обладающий хорошими гелирующими свойствами и

образующий гели, стабильные в широком диапазоне соленостей, температур и pH [1096]. Позднее была установлена структура данного ЭПС, которая может быть схематически описана следующим образом: $\rightarrow 4$)- β -D-GlcpNAcA-(1 \rightarrow 6)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAcA-3-O-SO₃⁻-(1 \rightarrow [1097]. Другой ЭПС-продуцирующей галоархеей является *Haloferax denitrificans* ATCC 35960. Данный микроорганизм продуцирует линейный кислый полисахарид, чья структура может быть описана следующим образом: $\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA_{2,3}NAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA_{2,3}NAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcpA_{2,3}NAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp(1 \rightarrow [1098]. *Haloferax gibbonsii* ATCC 33959 продуцирует нейтральный разветвленный полисахарид, состоящий из остатков D-маннозы, D-глюкозы, D-галактозы и L-рамнозы в соотношении 2:1:3:1 [1099]. Галоархея *Haloterrigena turkmenica* при росте на среде, содержащей глюкозу в качестве углеродного и энергетического субстрата, продуцирует сульфатированный гетерополисахарид, состоящий из остатков глюкозы, галактозы, глюкозамина, галактозамина и глюкуроновой кислоты, обладающий эмульгаторными и антиоксидантными свойствами.

Подавляющее большинство галофильных бактерий-продуцентов ЭПС относятся к семействам *Halomonadaceae* и *Alteromonadaceae* [212, 1101]. Среди них бактерии рода *Halomonas* (семейство *Halomonadaceae*) являются наиболее перспективными промышленными продуцентами ЭПС ввиду того, что осуществляют высокоэффективный биосинтез широкого спектра полисахаридов с разнообразными физико-химическими свойствами [212]. Другими перспективными продуцентами, не принадлежащими роду *Halomonas*, являются галофильные бактерии *Alteromonas hispanica* [1102], *Idiomarina ramblicola* [1103], *Idiomarina fontislapidosi* [1103] и *Salipiger mucosus* [1104].

H. eurihalina на среде с содержанием NaCl 7,5% и глюкозы, дрожжевого экстракта, солодового экстракта и пептона продуцирует порядка 2,8 г/л ЭПС, состоящего в основном из глюкозы, маннозы, галактозы и рамнозы. Данный полисахарид проявляет свойства гелеобразователя в кислых средах, причем образуемые гели па протяжении длительного времени (до 14 дней) сохраняют стабильность. Культивирование бактерий данного вида на средах с добавлением

нефти стимулировало биосинтез ЭПС с ярко выраженными эмульгаторными свойствами [1105-1106]. *H. tauro* является продуцентом уникального ЭПС – маурана, анионный сульфатированный гетерополисахарид. *H. tauro* S-30, культивируемый в средах с соленостью 2,5% NaCl, содержащих глюкозу в качестве источника углерода и энергии, способен накапливать до 3,8 г/л маурана. Водные растворы маурана обладают псевдопластическими, вязкоэластичными и тиксотропными свойствами, которые сохраняются в широком диапазоне pH (3 – 11), после цикла замораживания-оттаивания, а также в присутствии ПАВ [1107]. *H. stenophila* НК30 продуцирует ЭПС – галогликан, сульфатированный гетерополимер, состоящий из двух фракций с молекулярными массами 82 кДа и 1,4 МДа. Мономерный состав данного полисахарида представлен в основном остатками глюкозы, глюкуроновой кислоты, маннозы, фукозы, галактозы и рамнозы. Этот полисахарид образует высоко вязкие псевдопластические растворы, а также обладает свойствами эмульгатора и флокулянта. При культивировании *H. stenophila* НК30 на среде с содержанием NaCl 5% и глюкозой в качестве основного субстрата максимальное накопление галогликана составило 3,89 г/л [1108]. *H. xianhensis* SUR308 при росте на среде с содержанием NaCl 2,5% и глюкозой и гидролизатом казеина продуцирует до 7,87 г/л ЭПС с антиоксидантными свойствами, способный эмульгировать углеводороды и масла [1109]. *Halomonas* sp. AAD6 является продуцентом левана – полисахарида, состоящего из остатков β -(2,6)-D-фруктофуранозы. Культивирование *Halomonas* sp. AAD6 в биореакторе на среде с сахарозой в качестве углеродного и энергетического субстрата демонстрировало выход левана 1,85 г/л [1110]. Галофильные бактерии *Idiomarina fontislapidosi* F32^T и *Idiomarina ramblicola* R22^T продуцируют ЭПС, состоящие из остатков глюкозы, маннозы и галактозы. *Alteromonas hispanica* F23^T синтезирует полисахарид, состоящий из глюкозы, маннозы и ксилозы. Культивирование данных бактерий на средах с глюкозой и содержанием NaCl 7,5% демонстрирует выход ЭПС 1 – 1,5 г/л. ЭПС данных микроорганизмов являются хорошими эмульгаторами [1101]. *Salipiger mucosus* A3^T продуцирует сульфатированный гетерополисахарид, проявляющий

эмульгирующие свойства и состоящий из остатков глюкозы, маннозы и фукозы. Высокое содержание фукозы делает данный полисахарид или полученные из него олигосахариды потенциально пригодными для использования в медицинских и фармацевтических целях. Культивирование *S. mucosus* A3^T на глюкозе в качестве основного субстрата в среде с содержанием 7,5% NaCl демонстрировало выход ЭПС 1,35 г/л [1104].

1.9. Биотехнология галофилов

1.9.1. Подходы к культивированию

Экстремально галофильные бактерии и археи являются перспективными продуцентами широкого спектра практически значимых соединений, в частности бактериородопсина, каротиноидов, галоэнзимов, биополимеров и др. (см. раздел 1.8). Также, важное практическое значение имеет непосредственно биомасса галобактерий и галоархей и ее различные экстракты, которые обладают большим потенциалом в качестве комплексной пищевой биоактивной добавки для человека и сельскохозяйственных животных, демонстрирующей иммуномодуляторные, антиоксидантные, радиопротекторные свойства, оказывающей положительный эффект на метаболизм организма-потребителя [3, 804-811, 1111-1120]. В результате комплексной переработки биомассы галоархей могут быть получены уникальные галоархеальные липиды, белки, обогащенные кислыми и слабогидрофобными аминокислотами, а также GC-богатые нуклеиновые кислоты (см. разделы 1.6, 1.6.4, 1.6.5.1.3 и 1.6.7).

Однако, несмотря на высокий коммерческий потенциал галоархей/галобактерий и их компонентов, на сегодняшний день известно мало примеров биотехнологических производств промышленного масштаба, направленных на производство продуктов на основе экстремальных галофилов. Причиной этому являются значительная продолжительность процесса культивирования, например, галоархей, обусловленная характерной им малой скоростью роста, его низкая эффективность, связанная с низким накоплением галоархеальной биомассы в чистых культурах, а также частым ингибированием роста, вызванным минорными компонентами комплексных питательных сред,

продуктами их окисления в процессе культивирования, метаболитами самих галобактерий, высокой себестоимостью, обусловленной необходимостью применения высококачественных питательных субстратов и высокой стоимостью больших количеств минеральных солей, необходимых для обеспечения оптимальной для их роста солёности [1121-1129].

На сегодняшний день известно много примеров работ, направленных на оптимизацию процессов культивирования галобактерий/галоархей для получения как биомассы, так и ее отдельных компонентов, в частности таких их аспектов, как состав питательных сред и параметры процесса.

1.9.1.1. Ростовые среды

Ростовые среды для галофильных микроорганизмов могут быть разделены на комплексные и синтетические. Для приготовления комплексных питательных сред часто используются такие органические компоненты, как дрожжевой экстракт, пептон, триптон и казаминовые кислоты. В качестве органических источников углерода и азота в синтетических средах могут использоваться аминокислоты, углеводы, глицерин, пируват и соли ряда органических кислот. Минеральный состав ростовой среды определяется химическим составом естественной среды обитания культивируемого микроорганизма и часто соответствует минеральной композиции талассогалинных вод, характеризующихся пропорциями неорганических солей, аналогичными свойственным морской воде. Основой минеральной композиции ростовых сред галофилов является NaCl. Также в больших количествах присутствуют соли калия и магния, как правило, хлориды и сульфаты. Для обеспечения требуемого минерального состава для конкретного штамма галофильного микроорганизма для приготовления ростовой среды может использоваться вода, отобранная непосредственно из места его изоляции. Также для приготовления сред может использоваться морская, артезианская или водопроводная вода, которые несут определенный набор минеральных солей микроэлементов, необходимых для оптимального роста большинства микроорганизмов. Дистиллированная вода часто применяется для приготовления питательных сред с целью исключить

вероятность негативного воздействия каких-либо нежелательных примесей на процесс роста микроорганизмов, однако в данном случае необходимо искусственное внесение растворов солей необходимых микроэлементов [1129].

Комплексная среда для культивирования экстремально галофильных микроорганизмов, разработанная коллективом Гиббонса в 1955 году, стала основой для множества гиперсоленых ростовых сред, адаптированных и оптимизированных для разных умеренных и экстремальных галофилов путем частичного изменения основной минеральной композиции, замены оригинальных или внесения дополнительных органических источников углерода и азота, модификации состава раствора микроэлементов [1130-1139]. Питательная среда, разработанная в 1960 году Пэйном, Гиббонсом и коллегами для культивирования микроорганизмов, изолированных из содовых озер, также легла в основу разных сред для галоалкалифилов [1140-1141].

Соленость ростовой среды (абсолютное содержание минеральных солей, % масс.) выбирается в зависимости от степени галофильности культивируемого микроорганизма и часто определяется соленостью его естественной среды обитания. Экстремально галофильные археи родов *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloferax* и *Halorubrum* культивируются на ростовых средах с соленостью 12,5 – 23% [1134, 1142-1145]. Умеренно галофильные бактерии рода *Halomonas*, обладающие высоким биотехнологическим потенциалом, демонстрируют оптимальные ростовые характеристики на средах, соленость которых составляет порядка 5 – 10% [212, 1146-1150]. Многие другие умеренно галофильные и галотолерантные микроорганизмы, например, представители родов *Bacillus*, *Halobacillus*, *Gracilibacillus* и *Salibacillus*, культивируются на средах с соленостью 10 – 15% [1151-1154].

Как говорилось ранее, ключевым компонентом минеральной композиции гиперсоленых ростовых сред является NaCl. Также данные среды в меньших количествах включают MgSO₄, KCl, CaCl₂, NaBr и NaHCO₃. Минеральные среды подобного состава повторяют ионную композицию морской воды и были разработаны и впервые использованы для культивирования микробиоты

солнечных солевых группой Родригеса-Валеры в 1980 году [1135]. Часто в качестве минеральной основы ростовых сред используются соль и вода гиперсоленых озер, несущие все необходимые основные и минорные минеральные компоненты [1155-1158].

Подавляющее большинство галофильных микроорганизмов демонстрируют оптимальные ростовые характеристики на средах, где основной минеральной составляющей является NaCl. Однако многие из них также способны расти на средах, в которых NaCl частично или полностью заменен на другое осмотически активное вещество неорганической или органической природы, например, хлориды, сульфаты, нитраты щелочных и щелочноземельных металлов, соли некоторых органических кислот или сахара [1130, 1134, 1159-1162]. Ониши и коллегами были протестированы на предмет роста 168 штаммов галофильных микроорганизмов на средах с измененной минеральной композицией: 75 из изученных штаммов оказались сильно зависимыми от присутствия в среде значимых количеств NaCl, а 25 штаммов демонстрировали хорошие ростовые характеристики на средах, содержащих 1 – 4 М KCl [1163]. Галофильная бактерия *Halomonas elongata* способная расти на средах, содержащих NaBr и NaNO₃ вместо NaCl [1136]. *Deleya halophila* растет на минеральных средах, основными компонентами которых являются NaBr, Na₂SO₄ и Na₂S₂O₃ [1164]. *Micrococcus varians* демонстрирует рост на средах, содержащих молярные концентрации хлоридов, нитратов и бромидов натрия, калия и рубидия [1165].

Многие галофильные микроорганизмы требовательны к наличию значительных количеств ионов Mg²⁺ в ростовых средах ввиду их высоких концентраций во многих природных гиперсоленых геоценозах. Большинство гиперсоленых питательных сред, используемых для культивирования галофильных и галотолерантных микроорганизмов, включают порядка 2 – 5% солей магния (хлоридов, сульфатов или нитратов) [1130 – 1141]. Уникальным исключением являются галофилы, изолированные из таких нетривиальных гиперсоленых сред, как Мертвое море или некоторые глубоководные гиперсоленые бескислородные бассейны Средиземного моря. Воды данных

природных объектов характеризуются концентрациями ионов Mg^{2+} от 2 до 4 М (см. раздел 1.1.1). Изолированные из подобных сред галофильные микроорганизмы для оптимального роста, помимо молярных концентраций ионов Na^+ , требуют эквивалентные или большие концентрации ионов Mg^{2+} (1 – 1,5 М). В ряде случаев ионы Mg^{2+} могут быть частично заменены ионами Ca^{2+} [422].

Ионы K^+ также являются одним из основных и обязательных компонентов сред для культивирования галоархей и галофильных бактерий, так как принимают непосредственное участие в реализации быстрого ответа на резкое повышение осмолярности окружающей среды у бактерий и являются ключевым ионом, опосредующем осмоадаптивную стратегию галоархей (ссылка на раздел). Минимальные концентрации ионов K^+ , при которых наблюдается рост галофильных микроорганизмов, составляют 1 – 3 мМ. Большинство гиперсоленых ростовых сред в своем составе имеют до 2% KCl [1121, 1130 – 1141].

В качестве источников биогенных элементов (N, S, P) комплексные гиперсоленые ростовые среды могут включать комплексные органические субстраты, такие как пептон, триптон, казаминовые кислоты и дрожжевой экстракт, который помимо серы и азота также содержит следовые количества фосфора. Аминокислоты часто используются в качестве органического источника азота в синтетических средах. Помимо внесения органических источников биогенных элементов, часто необходимо вносить их минеральные аналоги [1129-1141, 1157, 1166-1169]. Минеральный азот в аммонийной или нитратной форме часто вносится в минеральную композицию сред посредством таких солей, как NH_4Cl , $NaNO_3$ и $(NH_4)_2SO_4$, сера вносится в сульфатной форме совместно с некоторыми макро- (K, Mg, Ca) и микроэлементами (Fe, Cu, Zn и др.), источником минерального фосфора выступают фосфаты, которые часто добавляются в виде гидро- и дигидрофосфатов щелочных металлов для обеспечения буферных свойств питательной среды [1129]. Фосфор является важным для галофильных микроорганизмов элементом. Работа Смирнова и коллег демонстрирует, что увеличение концентраций неорганического фосфата в среде способствует увеличению количества накопленной биомассы галобактерий – культивирование

Hbt. salinarium на средах, содержащих 0,05, 2,3 и 11,5 мМ неорганического фосфата способствовало образованию 2, 5 и 12 г/л АСБ соответственно. Также авторами было установлено, что накопление фосфатов в клетках происходит в форме ортофосфата магния и осуществляется в самом начале роста культуры [1170]. Это, вероятно, связано с тем фактом, что фосфор является одним из элементов, участвующих в биосинтезе и образующих молекулы нуклеиновых кислот, а галобактерии являются полиплоидами. Максимальное количество хромосом в их клетках наблюдается на этапе активного роста культуры, что обуславливает высокую потребность в фосфоре (см. раздел 1.6.7).

Для большего соответствия ионного состава ростовых сред ионному составу морской воды часто дополнительно вносятся соли железа и кальция, а также бромиды и гидрокарбонаты щелочных металлов. В ранних исследованиях Сегалом и Гиббонсом была отмечена потребность галофильных архей в железе – отсутствие доступных форм железа в среде способствовало снижению ростовых показателей культур данных микроорганизмов. Также исследователями было отмечено положительное влияние марганца на рост галобактериальных культур [1131]. Марганец является важным для галофилов микроэлементом ввиду его непосредственного участия в клеточных механизмах защиты от активных форм кислорода (см. раздел 1.6.5.1.2).

Микроорганизмы, изолированные из аталассовых гиперсоленых сред обитания, часто требуют больших количеств тех или иных ионов. Например, микробиота Мертвого моря для нормального роста, помимо молярных концентраций ионов Na^+ и Mg^+ , также нуждается в децимолярных концентрациях ионов Ca^{2+} , а изолированные из содовых озер микроорганизмы часто нуждаются в высоких концентрациях карбонатов [1135, 1139, 1171]. Гиперсоленые ростовые среды часто не требуют внесения растворов микроэлементов. Это связано с тем фактом, что часто для приготовления таких сред используется поваренная соль (галит), добываемая посредством выпаривания морской воды или разработки галитовых эвапоритов и несущая необходимые количества всех необходимых микроэлементов. Также, дополнительным источником микроэлементов может

служить вода. Однако в случае приготовления минеральных растворов на дистиллированной воде с применением высокочистых неорганических солей, в ростовую среду могут быть внесены следовые количества солей В, Со, Сu, Мп, Мо, Ni и Zn [1129]. Источником микроэлементов также могут служить такие комплексные ростовые субстраты, как дрожжевой экстракт [1172].

Комплексные органические субстраты также служат источником витаминов и других ростовых факторов, поэтому часто вносятся в среды, в том числе синтетические, в следовых количествах совместно с основными источниками углерода и азота. Такие витамины как биотин, тиамин, фолат и В₁₂ могут также в чистом виде добавляться в питательные среды [1129, 1173].

1.9.1.2. Ростовые среды и их оптимизация для разных технологических нужд

Для лабораторного и полупромышленного культивирования экстремально галофильных архей, таких как *Hbt. salinarum* и др., широко применяются модификации среды Сегала и Гиббонса, рекомендованной для культивирования микробиоты морских солнечных солеварен. Такие среды обеспечивают приемлемые скорости роста и выход биомассы галобактерий. В минеральную основу данных сред входит NaCl (200 – 250 г/л), KCl (2 – 5 г/л) и MgSO₄*7H₂O (10 – 29 г/л) и/или MgCl*6H₂O (20 – 50 г/л), а также может вноситься CaCl₂ (0,1 – 0,2 г/л) и/или FeCl₂ (или FeSO₄, 0,02 – 0,03 г/л). В качестве органических субстратов для приготовления данных сред используется дрожжевой экстракт (1 – 10 г/л) в комбинации с триптоном или пептоном (5 г/л). Совместно с основными источниками углерода данные питательные среды могут включать цитраты или пируваты (до 3 г/л), а также глицерин (1 – 4 г/л) [1130-1131, 1133-1135, 1138-1139]. Модификации классической среды Сегала и Гиббонса с меньшей соленостью и более сложным минеральным составом также широко применяются для культивирования разнообразных галофильных и галотолерантных бактерий [1132, 1136-1137, 1139]. Однако для обеспечения требуемых выходов биомассы галофилов или определенных продуктов их биосинтеза часто требуется тонкая оптимизация состава ростовых сред.

1.9.1.2.1. Получение биомассы

Маникандан и коллегами была произведена оптимизация ростовой среды для галоархей с целью получения галоархеальных культур с высокими плотностями клеток. В качестве модельного микроорганизма была выбрана галобактерия *Hbt. salinarum* VKMM 013 [1174]. В качестве базовой минеральной среды использовалась модифицированная среда, предложенная Кестером и коллегами [1175], на которой культивировались модельные микроорганизмы в течение 40 часов при температуре 50°C. Исследователями были протестированы 27 различных веществ-добавок к базовой ростовой среде. Добавление растворимого крахмала (5 г/л) способствовало накоплению 0,42 г/л АСБ *Hbt. salinarum*. Внесение в среду казаминовых кислот (10 г/л) и желатина (10 – 15 г/л) способствовало накоплению 0,39 и 0,48 г/л АСБ соответственно. Добавление к минеральной композиции базовой среды хлорида калия (5 г/л) и сульфата магния (10 г/л) – естественных минеральных компонентов талассогалинных сред, также способствовало приросту биомассы, выход которой на момент окончания процесса культивирования достигал 0,43 и 0,46 г/л АСБ соответственно. На основе эксперимента с центральным композиционным планированием была составлена математическая модель, отражающая зависимость выхода биомассы галобактерий от 4 добавочных компонентов: растворимый крахмал, желатин, хлорид калия и сульфат магния, обеспечивающих максимальный прирост биомассы микроорганизмов. При культивировании галобактерий *Hbt. salinarum* на оптимизированной среде (модифицированная среда Кестера, 6,35 г/л KCl, 9,7 г/л MgSO₄, 13,38 г/л желатина и 12 г/л растворимого крахмала) прогнозируемый выход биомассы составлял 0,76 г/л. Реальный выход биомассы *Hbt. salinarum* составил 0,746 г/л. Для оценки уровня выхода биомассы производилось контрольное 56-часовое культивирование *Hbt. salinarum* на неоптимизированной среде JCM 168, демонстрировавшее начало экспоненциальной фазы роста культуры *Hbt. salinarum* на 16 часу культивирования, максимальная скорость роста составляла 0,091 ч⁻¹. Стационарная фаза роста культуры в ходе этого культивирования достигнута не была. Культивирование *Hbt. salinarum* на

оптимизированной среде демонстрировало достижение культурой экспоненциальной фазы роста на 8 часу процесса, а переход в стационарную фазу роста – через 24 после начала культивирования. Максимальная скорость роста *Hbt. salinarum* на оптимизированной среде составила $0,185 \text{ ч}^{-1}$, а конечное накопление биомассы в 2,4 раза превышало таковое при культивировании на среде JCM 168. Также экспериментаторами было произведено сравнение характеристик процессов культивирования галоархей *H. borinquense* VKMM 001, *Haloferax sp.* VKMM 026 и *Halorubrum sp.* VKMM 017 на среде оптимизированного состава и среде DSM 372. Результаты культивирования данных архей на оптимизированной среде свидетельствуют о более высоких в сравнении со средой DSM 372 максимальных скоростях роста и более быстром переходе культур к экспоненциальной и стационарной фазам роста. В результате культивирования *H. borinquense* VKMM 001, *Haloferax sp.* VKMM 026 и *Halorubrum sp.* VKMM 017 на среде оптимизированного состава наблюдалось увеличение накапливаемой биомассы в 3,3, 1,8 и 1,9 раз соответственно [1174].

1.9.1.2.2. Получение каротиноидов

Количества и типы продуцируемых галобактериями каротиноидов проявляют сильную зависимость от солености ростовой среды и природы доступных питательных субстратов. Культивирование галобактерии *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 на средах с соленостями 15 – 35% демонстрирует обратную зависимость концентрации каротиноидов от концентрации солей в ростовой среде [1135, 1176-1177]. Так, культивирования *H. mediterranei* ATCC 33500 в среде с абсолютным содержанием солей 15% способствовало накоплению в биомассе галобактерии 420 мкг бактериоруберинов на 1 г белка, в то время как содержание бактериоруберинов в биомассе, выращенной на средах с содержанием солей 20 – 35%, не превышало 80 мкг на 1 г белка [1176]. Культивирование *H. mediterranei* ATCC 33500 на среде, содержащей 5% NaCl и 8% MgSO₄, способствовало большему увеличению накопления каротиноидов [1178]. Аналогичная картина наблюдалась при культивировании *Haloferax volcanii* WFD11 (DSM 5716), *Halobacterium sp.* SP-2 и *Halorubrum sp.* SP-4 на средах с

разной соленостью [1179-1180]. Д'Сауза и коллеги выдвинули предположение, что увеличение биосинтеза бактериородопсинов с уменьшением солености окружающей среды является своего рода механизмом стабилизации клеточной мембраны галофилов в условиях низкого осмотического давления [1177]. Данное предположение было подтверждено в процессе исследования влияния солености ростовой среды на состав каротиноидной фракции биомассы *Haloferax alexandrinus* TM^T (JCM 10717^T) – экстремально галофильной архея, растущей в средах с абсолютным содержанием солей, превышающим 15%, и проявляющей оптимальный рост и накопление каротиноидов при солености 20% [1181]. Аскер и Охта установили, что увеличение солености ростовой среды способствует уменьшению доли бактериоруберина в каротиноидной фракции биомассы *H. alexandrinus*. При культивировании *H. alexandrinus* на ростовых средах с соленостью 15% бактериоруберин и его деривативы составляли порядка 72% всех клеточных каротиноидов галобактерии. Анализ биомассы, выращенной на средах с 20 – 25% содержанием минеральных солей, демонстрировал снижение доли бактериородопсинов на 8%, при этом доли β-каротина и кантаксантина возрастали до 10% и 30 – 40% соответственно [1182]. Увеличение солености ростовых сред *Hbt. salinarum* ATCC 33170 демонстрировало противоположный, положительный эффект на накопление каротиноидов в галобактериальной биомассе. При выращивании данного штамма *Hbt. salinarum* на средах с соленостью 15% образование каротиноидов не наблюдалось, однако увеличение солености до 20 – 35% демонстрировало накопление значительных количеств бактериоруберина, максимальное содержание которых превышало 1500 мкг на грамм белка [1176].

Зависимость биосинтеза каротиноидов от типа и концентраций питательных субстратов была обнаружена довольно давно. Гохнауер и коллеги исследовали влияние глюкозы и глицерина на продукцию каротиноидов *Hbt. salinarum* ATCC 33170 и *Hbt. salinarum* ATCC 43214. Они установили, что низкие концентрации глюкозы (0,5%) при культивировании на синтетической среде BSMK не влияют на ростовые характеристики культур, однако способствуют увеличению

максимального накопления каротиноидов, в то время как высокие концентрации (до 4%) ингибируют их образование. Добавление глицерина (0,1%) к среде BSMK стимулирует рост культуры, но способствует уменьшению накопления бактериоруберинов и увеличению накопления C₄₀-каротиноидов. Культивирование галобактерий на комплексной среде с содержанием казаминовых кислот и дрожжевого экстракта демонстрировало накопление меньших количеств каротиноидов. Добавление глицерина (0,1%) к комплексной среде не оказывало эффекта ни на рост, ни на концентрации каротиноидов в биомассе, однако внесение глюкозы (2%) стимулировало биосинтез каротиноидов [1183]. Позднее Кушваха и Катес установили, что глицерин стимулирует рост *Hbt. salinarum* (увеличение ростовых показателей до 10%), однако способствует значительному снижению содержания бактериоруберина (4-кратное снижение концентрации) и его производных. Также исследователи продемонстрировали, что низкие концентрации глицерина (0,1 – 0,5%) стимулируют биосинтез C₄₀-каротиноидов – внесение в ростовую среду глицерина способствовало 1,3 – 2,5-кратному увеличению содержания β-каротина и 9 – 11-кратному увеличению содержания ликопина [1184]. Опыт исследовательской группы Фанга по проведению двухфазных культиваций *H. mediterranei* ATCC 33500 для получения каротиноидов свидетельствует, что замена питательного субстрата на ацетат натрия после достижения культурой высокой плотности клеток способствует двукратному увеличению содержания каротиноидов в конечной биомассе [1178].

1.9.1.2.3. Получение бактериородопсина

Одним из наиболее интригующих продуктов биосинтеза *Hbt. salinarum* является трансмембранный светочувствительный белок бактериородопсин (БР). Данный белок обладает огромным потенциалом в области биоэлектроники и биоэнергетики (см. раздел 1.7.3), однако его низкое содержание в клетках продуцента и высокая сложность культивирования *Hbt. salinarum*, негативно сказываются на его себестоимости и препятствуют активной разработке и коммерциализации биоэлектронных устройств на основе БР, а также поиску других областей его применения. В научной литературе запатентовано

множество попыток повышения эффективности процесса получения БР, в том числе посредством оптимизации ростовых сред *Hbt. salinarum* с целью увеличения содержания БР в клетках.

Газеми и коллеги посредством метода Тагути осуществили оптимизацию комплексной ростовой среды для культивирования *Hbt. salinarum* PTCC 1685 с целью увеличения выхода БР [1185]. В качестве базовой среды использовалась модификация классической среда Гиббонса: казаминовые кислоты – 7,5 г/л; дрожжевой экстракт – 1 г/л; цитрат натрия – 3 г/л; NaCl – 250 г/л; MgSO₄*7H₂O – 20 г/л; KCl – 3 г/л; FeSO₄*7H₂O – 0,05 г/л; MnSO₄*7H₂O – 0,2 г/л. Исследователями было испытано несколько комплексных органических субстратов (триптоза, пептон, универсальный пептон, дрожжевой экстракт, сухой кукурузный сироп), углеводов источников углерода (лактоза, сахароза, фруктоза, глюкоза, мальтоза и ксилоза) и минеральных источников азота (хлорид, сульфат и гидрофосфат аммония) на предмет влияния на биосинтез БР *Hbt. salinarum*. Универсальный пептон и сухой кукурузный ликер способствовали максимальному накоплению БР в клетках продуцента – внесение в ростовую среду 40 г/л пептона и 50 г/л кукурузного ликера способствовало накоплению 98,2 мг/л и 126,6 мг/л БР соответственно, что 1,25 и 2,12 раз превышает содержание БР в биомассе, выращенной на базовой среде. Дальнейшая оптимизация ростовой среды методом Тагути, включающей сухой кукурузный ликер, казаминовые кислоты и два добавочных субстрата – мясной экстракт и глицерин, позволила установить состав среды, оптимизированной для обеспечения максимального выхода БР: сухой кукурузный ликер – 50 г/л; мясной экстракт – 10 г/л; казаминовые кислоты – 3,75 г/л; глицерин – 10 г/л; цитрат натрия – 1 г/л; NaCl – 250 г/л; MgSO₄*7H₂O – 10 г/л; KCl – 6 г/л; FeSO₄*7H₂O – 0,2 г/л; MnSO₄*7H₂O – 0,2 г/л. При культивировании на конических колбах *Hbt. salinarum* PTCC 1685 на среде такого состава максимальное содержание БР в биомассе после 96-часового процесса составляло 191,7 мг/л, что в 2,85 раз превышает выход БР при культивировании на базовой среде. Использование среды оптимизированного состава способствовало увеличению продуктивности процесса по БР с 0,6 мг/л*ч

до 2 мг/л*ч. Культивирование *Hbt. salinarum* РТСС 1685 в биореакторе объемом 15 литров в течение 96 часов с использованием оптимизированной ростовой среды демонстрировало накопление биомассы галобактерий 29,43 г/л и бактериородопсина 234,6 мг/л [1185]. В ходе статистической обработки результатов оптимизационных экспериментов Газеми и его коллегами было установлено, что основной вклад в увеличение выработки бактериородопсина вносится комплексными органическими субстратами, такими как сухой кукурузный ликер, мясной экстракт, казаминовые кислоты, а также глицерином, который обладает свойством стимулировать как рост галобактерий, так и биосинтез бактериородопсина [1185-1186]. Кукурузный ликер в своем составе содержит большие количества растворимых белков, полный набор протеиногенных аминокислот, ряд витаминов группы В, а также некоторые органические кислоты, что характеризует его как ростовой субстрат с высокой питательной ценностью и биостимулирующими свойствами [1187].

Коллективом Шу было произведено сравнение эффективности других комплексных субстратов - дрожжевого экстракта, триптона и пептона, как основных источников углерода и азота при биосинтезе БР. Минеральная основа ростовых сред была эквивалентна таковой классической среды Гиббонса. Максимальное накопление галобактериальной биомассы наблюдалось при культивировании *Hbt. salinarum* на дрожжевом экстракте. Максимальное накопление БР наблюдалось при культивировании культуры галобактерий на ростовых средах, содержащих триптон и пептон [1188]. Дрожжевой экстракт (10,9%) характеризовался более низким, относительно пептона (15,2%) и триптона (13,3%) содержанием азота, однако содержал большие количества свободных аминокислот и ростовых факторов, таких как витамины группы В, благодаря чему является прекрасным ростовым субстратом. Также, кроме аминокислот и пептидов, используемый дрожжевой экстракт в своем составе имел нуклеиновые и другие органические кислоты [1188].

Работа другой исследовательской группы свидетельствует о нескольких иных результатах. В данном случае экспериментаторы сравнивали эффективность

разных комплексных источников азота при их совместном применении с дрожжевым экстрактом в ростовых средах для культивирования *Hbt. salinarum*. В качестве минеральной основы для оптимизируемой среды, а также в качестве контрольной ростовой среды использовалась классическая ростовая среда Гиббонса. В качестве испытуемых источников азота были взяты гидролизат казеина, бактериологический пептон, триптон, мясной экстракт, мясной пептон и казеиновый пептон, которые в количестве 7 г/л вносились в среды, содержащие 5 г/л дрожжевого экстракта. Наибольшее содержание бактериородопсина достигалось в биомассе, выращенной на средах, содержащих мясной экстракт, бактериологический пептон и мясной пептон. На среде с мясным пептоном было получено максимальное количество БР [1189].

Аргинин и аспарагиновая кислота являются двумя важными аминокислотами, которые опосредуют механизм транспорта протона в процессе фотохимического цикла БР (см. раздел 1.7.3). Джеганатан с коллегами исследовали влияние этих аминокислот на эффективность биосинтеза БР. В качестве базовой среды также была выбрана ростовая среда Гиббонса, содержащая 10 г/л пептона в качестве питательного субстрата. Также исследователями использовались модифицированные среды, содержащие дополнительно 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1% аргинина, аспарагиновой кислоты и их смеси в разных пропорциях. Содержание БР в конечной биомассе демонстрировало прямую зависимость от концентраций обеих аминокислот в ростовых средах. Максимальное содержание бактериородопсина в биомассе было достигнуто на среде, содержащей 0,6% аргинина и 0,4% аспарагиновой кислоты, и в 4,46 раз превышало содержание бактериородопсина в биомассе, выращенной на базовой среде [1190].

1.9.1.2.4. Получение галоэнзимов

Галофильные археи и бактерии являются перспективными продуцентами широкого спектра гидролитических ферментов, проявляющих разнообразные активности. Галоэнзимы, в сравнении с мезофильными ферментами, обладают рядом преимуществ: являются полиэкстремотолерантными, что позволяет им

проявлять активность в реакционных средах, характеризующихся высокими соленостями, экстремальными рН, температурами и давлениями, а также, благодаря своей приспособленности к средам с низкой активностью воды, способны осуществлять катализ в нетрадиционных реакционных средах, таких как высококонцентрированные растворы органических веществ или безводные среды. Протеазы – наиболее востребованный класс ферментов в современной промышленности (см. раздел 1.8.2).

Благодаря своим уникальным свойствам, галоэнзимы могут в значительной степени повысить эффективность технологических процессов и расширить границы применения данных ферментов. Однако повсеместная интеграция галоэнзимов в первую очередь требует повышения эффективности их биотехнологического производства. Биосинтез белков является крайне ресурсозатратным процессом для клетки, поэтому основным фактором индукции биосинтеза и экспрессии гидролитических ферментов микроорганизмами служит наличие доступного субстрата определенного типа. Многие гидролитические ферменты способны повышать свою активность в присутствии одних и ингибироваться другими неорганическими ионами. Наличие или отсутствие определенных макро- и микроэлементов также часто является важным фактором, влияющих на эффективность экспрессии внеклеточных ферментов микроорганизмами.

Группой Аколкара было произведено исследование факторов, влияющих на ферментативную активность внеклеточной протеазы, продуцируемой *Halobacterium sp.* SP1 [1191]. Галобактериальные культуры выращивались на ростовой среде Гиббонса, в качестве базового и тестового органических субстратов были использованы дрожжевой экстракт и соевая мука соответственно. В результате эксперимента, спланированного в соответствии с методом Плакетта – Бермана, исследователями было установлено, что основное влияние на протеолитическую активность культуральной среды *Halobacterium sp.* SP1 оказывают такие компоненты ростовой среды, как соевая мука и хлорид железа. На основе полученных данных экспериментаторы предприняли попытку

оптимизации питательной среды для повышения эффективности продукции внеклеточной галобактериальной протеазы. Ими был разработан эксперимент в соответствии с методом центрального композиционного планирования (ЦКП), в результате которого были установлены оптимальные концентрации соевой муки (10 г/л) и хлорида железа (0,16 г/л) в ростовой среде. Культуральная среда *Halobacterium sp.* SP1, выращенной на среде оптимизированного состава, демонстрировала протеолитическую активность в 3,9 раза превышающую протеолитическую активность, достигаемую при культивировании галобактерий на базовой среде [1191].

Чапром и коллеги исследовали возможность повышения протеазной активности посредством оптимизации состава ростовой среды культуры *Halobacterium sp.* LBU50301, изолированной из буду – блюда тайской кухни, представляющего собой соленую ферментированную рыбу [1192]. Для получения галофильной протеазы галобактериальная культура выращивалась на среде состава (рН 8): желатин – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 1 г/л; NaCl – 250 г/л; MgSO₄*7H₂O – 10 г/л; KCl – 5 г/л; CaCl₂*2H₂O – 0,2 г/л. Поставленный в соответствии с методом Плакетта – Бермана эксперимент демонстрировал, что основное влияние на экспрессию галобактериальной протеазы оказывают желатин, MgSO₄*7H₂O, NaCl и рН. Протеазная активность культуральной среды увеличивалась с увеличением уровня каждого фактора. Дальнейшая оптимизация среды методом ЦКП позволила определить оптимальные концентрации компонентов и рН ростовой среды, которые составили: желатин – 18,62 г/л; NaCl – 279,5 г/л; MgSO₄*7H₂O – 9,13 г/л, рН 7,88. Оценка уровней экспрессии галофильной протеазы при культивировании *Halobacterium sp.* LBU50301 на колбах и в ферментере демонстрировала 8,8 и 13-кратное увеличение протеазной активности при использовании среды оптимизированного состава [1192].

Оптимизация ростовой среды галофильной археи *Halogeometricum sp.* TSS101 демонстрирует, что данная галофильная архея способна продуцировать протеазу в широком диапазоне температур и рН. Высокая протеазная активность была обнаружена при культивировании галобактерии на различных комплексных

субстратах с высоким содержанием белка, однако максимум экспрессии протеазы достигался при выращивании культур на обезжиренном сухом молоке (NaCl 20%, 40°C). Наличие в ростовой среде 200 мМ CaCl₂ усиливало способствовало усилению экспрессии протеазы [1193]. На экспрессию щелочной протеазы, продуцируемой умеренно галофильной бактерией *Marinobacter sp.* GA CAS9, влияние оказывают соленость среды, pH, концентрация солей меди, а также тип и концентрация органического источника азота. Максимальная протеазная активность достигалась на средах, содержащих экстракт говядины, пептон и сухое молоко, в то время как неорганические источники азота, аминокислоты, углеводы и жирные кислоты не способствовали экспрессии протеазы. Последующая оптимизация ростовой среды позволила добиться 3,3-кратного увеличения экспрессии протеазы бактерией *Marinobacter sp.* GA CAS9 [1194].

1.9.2. Культивирование галофилов в опытно-промышленных и промышленных масштабах

Культивирование экстремально галофильных микроорганизмов для промышленного получения продуцируемых ими соединений сопряжено с рядом трудностей. Несмотря на большое количество работ, направленных на культивирование экстремально галофильных бактерий и архей в биореакторах лабораторного типа [1176, 1178, 1182, 1185, 1188, 1192, 1194], на сегодняшний день известно мало удачных попыток масштабирования культивационного процесса до опытно-промышленного и промышленного масштаба. Основными факторами, ограничивающими масштабирование процессов культивирования галофилов, являются высокая коррозионность их ростовых сред и индивидуальные физиологические особенности штамма-продуцента. Высокая коррозионность ростовых сред галофилов ограничивает выбор конструкционных материалов для биореакторов для галофилов высокостойкими и, как следствие, дорогостоящими сталями или альтернативными материалами типа пластиков и композитов [806, 1195-1196].

Экстремально галофильные бактерии и археи в большинстве своем обладают уникальным метаболизмом, который способствует их выживанию в

условиях экстремальной солености. Такие индивидуальные особенности часто являются фактором, затрудняющим контроль состояния культуры в процессе культивирования, что сказывается на стабильности качества продуктов культивационного процесса (см. раздел 1.7). В качестве примера можно привести процесс культивирования генетически модифицированных штаммов *H. volcanii* для получения различных экстремоэнзимов. Особенностью данного вида галоархей является формирование биопленок, наличие которых в биореакторе не только влияет на точность показаний датчиков, но и сказывается на свойствах продуцируемых галоэнзимов [1195, 1197-1198].

Николь Махлер с коллегами предприняли попытку создания лабораторного реактора, обладающего потенциалом для дальнейшего масштабирования. Их реактор представлял собой барботажную колонну с рабочим объемом 15 литров, совмещенную с фильтрационным модулем, предназначенным для отделения биомассы продуцента от культуральной жидкости. Данная установка демонстрировала большую энергоэффективность и значительно лучшие массообменные характеристики в сравнении с классическими реакторами с мешалкой, повсеместно применяемыми в биотехнологических процессах, в том числе для культивирования галофильных микроорганизмов [1199].

На сегодняшний день также известно несколько попыток культивирования экстремальных галофилов в установках полупромышленного масштаба для получения ПГА. Коллер осуществил процесс культивирования *Haloferax mediterranei* в реакторе объемом 300 литров. В качестве источника углерода использовался ферментативный лизат пермеата молочной сыворотки – богатый лактозой отход процесса переработки молока. Используемый в рамках эксперимента Коллера пермеат содержал 200 г/л лактозы, в ростовую среду вносилось 50 мл пермеата на 1 л среды. По завершении 65-часового процесса культивирования было установлено, что выход биомассы составил 13,63 г/л, порядка 70% которых приходилось на долю ПГА [1200]. Чен и коллеги осуществили культивирование сконструированного ими штамма *Halomonas bluephagenesis* TD01, продуцирующего значимые количества ПГА, в

нестерильных условиях в биореакторе объемом 1000 литров. В качестве основного источника углерода использовались глюкоза и кукурузный ликер. В результате 48-часового процесса культивирования было получено 83 г/л биомассы продуцента, 61% которых приходился на долю ПГА, что соответствует производительности 1,04 г ПГА/(л*ч) [1201].

1.9.3. Сохранение биомассы микроорганизмов

Одна из главных проблем современной биотехнологии – обеспечивать длительную сохранность получаемых продуктов. Биоматериалы, вне зависимости от их природы или происхождения, как правило, сильно подвержены негативному влиянию факторов окружающей среды, что ведет к утрате их свойств и ухудшению качественных характеристик в процессе консервации и хранения. Биомасса микроорганизмов является одним самых распространенных объектов биотехнологии. Получение биомассы микроорганизмов – основной этап подавляющего числа биотехнологических производств. При этом наработанная биомасса может позиционироваться как конечный, промежуточный или побочный продукт производства. Высушивание биомассы микроорганизмов призвано в максимальной мере сохранить жизнеспособность микроорганизмов и, как следствие, целостность и свойства внутриклеточных компонентов в процессе сушки и дальнейшего хранения, необходимые для гарантии качества получаемого препарата, либо же для дальнейшей переработки биомассы. Производство пробиотиков, препаратов сельскохозяйственного назначения, сохранение различных культур методом высушивания и другие подразумевают необходимость получения продукта, содержащего достаточное количество клеток, способных реактивироваться в благоприятных условиях при применении препарата и возобновить популяцию.

Технологией дегидратации, гарантирующей максимальную сохранность высушиваемой биомассы и получение продукта высокого качества, является лиофильная сушка. Однако, дороговизна оборудования для лиофилизации, большие энергетические и временные затраты, делают ее в большинстве случаев нерентабельной. Другим распространённым промышленным методом

консервации биоматериалов, способным заменить лиофилизацию, на сегодняшний день является распылительная сушка. Данная технология характеризуется простотой, дешевизной и высокой производительностью. Однако, распылительное высушивание материала подразумевает его непосредственный контакт с сильно нагретым теплоносителем, что может негативно сказаться на термолабильных биоматериалах. Другими важными аспектами технологии распылительного высушивания являются возможность контролировать подавляющее большинство параметров процесса и широкий спектр аппаратных решений, позволяющие подобрать оборудование и оптимизировать процесс для осуществления дегидратации даже самого чувствительного материала [1202].

Сохранность микроорганизмов в высушенном препарате может зависеть от ряда параметров как самого процесса распылительного высушивания, так и от параметров процессов культивирования биомассы, ее концентрирования и дополнительной подготовки к высушиванию [1203].

В процессе распылительного высушивания клетки микроорганизмов подвергаются комбинации стрессовых воздействий, таких как повышенные температура, давление, высокая осмотическая активность среды, а также окислительное воздействие кислорода воздуха. В процессе изучения процесса распылительного высушивания рядом исследовательских коллективов было замечено, что микроорганизмы, подвергавшиеся аналогичным стрессовым воздействиям в процессе культивирования, значительно лучше переносят высушивание. Таким образом предварительное адаптированные биомассы *Lb. salivarius* при помощи длительного температурного стрессирования способствовало значительному увеличению числа жизнеспособных клеток в дегитратированной биомассе [1203]. Осмотическое стрессирование высушиваемой биомассы *Lb. casei* BL23 и *P. freudenreichii* ITG P20 в процессе их культивирования также способствовало уменьшению инактивации бактерий в процессе сушки. Положительное влияние на сохранности биомассы в процессе высушивания оказывают также воздействие повышенного давления, голод на

последней стадии культивирования, индуцирование оксидативного стресса воздействием H_2O_2 на биомассу [1204].

Фаза роста культуры также оказывает определенное влияние на сохранность биомассы в процессе сушки. Как правило, прекращение культивирования и сбор биомассы осуществляется на поздней экспоненциальной либо ранней стационарной фазе роста культуры, когда наблюдается максимальное накопление биомассы. Также, чаще всего, фаза роста выбирается индивидуально для каждой штамма и исходя из требуемых характеристик продукта, так как от нее зависит ряд свойств биомассы [1204]. Сбор биомассы в стационарной фазе роста культуры считается оптимальным ввиду того, что в стационарной фазе происходит голодание культуры, вследствие чего активируется система стрессового ответа, что способствует лучшей выживаемости клеток микроорганизмов в процессе сушки [1205]. В ряде случаев стрессирование в стационарной фазе роста может вызываться накоплением вторичных метаболитов культуры клеток. Высушивание биомассы, отобранной лаг-фазе, логарифмической и стационарной фазах роста культуры показало, что степень сохранности клеток культуры, находящейся в стационарной фазе, превышает 50%, в то время как сохранность клеток культуры в логарифмической фазе роста составляет 14% [1206].

Основным этапом распылительной сушки является распыление суспензии микроорганизмов в потоке нагретого сушильного агента. В процессе распыления микроорганизмы подвергаются воздействию повышенной температуры, перепадов давления и сильному оксидативному стрессу вследствие контакта с интенсивным воздушным потоком. Важную роль в травмировании клеток микроорганизмов играет тип распылительного устройства сушильной установки. Наиболее распространёнными являются форсуночные распылители ввиду их дешевизны и простоты устройства. Проходя через канал форсунки, клеточная суспензия подвергается сильному перепаду давления [1207]. Уменьшение давления на форсунке способствует повышению выживаемости микроорганизмов, однако понижение давления в распылителе способствует увеличению размера

капель суспензии, что нарушает режим высушивания и может привести к перегреву высушиваемой биомассы. Результаты, полученные коллективом других исследователей, также говорят о том, что степень уменьшения жизнеспособности микроорганизмов в процессе высушивания напрямую зависит от интенсивности распыления суспензии биомассы. При этом главным инактивирующим фактором является оксидативный стресс, негативный эффект которого может быть нивелирован добавлением различных антиоксидантов в суспензию биомассы. Устройство атоизатора при этом большой роли не играет – степень инактивации микроорганизмов атоизаторами различного устройства сопоставима [1208].

В процессе высушивания происходит испарение влаги, что приводит к формированию влажной частицы, состоящей из клеток микроорганизмов и других веществ, находившихся в питающем растворе [1209]. При дальнейшем высушивании, клетки, оказавшиеся на поверхности частицы, подвергаются интенсивному удалению влаги с их поверхности. Утеря гидратной оболочки компонентами клеточной мембраны приводит к денатурации мембранных белков и разрушению фосфолипидного бислоя, что было подтверждено при помощи сканирующей электронной микроскопии. При повышении температуры высушивания степень серьезности повреждений увеличивается [1210]. Добавление протекторных соединений углеводной природы к клеточной суспензии способствует снижению степени повреждению клеточных мембран в процессе сушки. Гидратная оболочка клеточной мембраны частично замещается молекулами углеводов, что способствует увеличению температуры ее фазового перехода и повышению сохранности в процессе сушки. Лучшими протективными свойствами обладают низкомолекулярные углеводы с высокой температурой стеклования [1211].

Температура сушильного агента и продолжительность сушки являются одними из ключевых факторов процесса распылительного высушивания, оказывающих большое влияние на качество конечного продукта. Как говорилось ранее, сушка капель распыленной суспензии протекает в несколько стадий. На первой стадии происходит испарение влаги из капли суспензии микроорганизмов

и формирование влажной твердой частицы из клеток и других составляющих питающего раствора. Далее происходит полное высушивание образовавшейся частицы. На первой стадии увеличения температуры капли не происходит, однако происходит активное охлаждение сушильного агента, обдувающего ее. После формирования твердой частицы, частица и сушильный агент моментально приходят к состоянию температурного равновесия. В случае, если начальная температура сушильного агента была слишком высокой, и он не успел охладиться в процессе испарения капель суспензии, то после образования твердых частиц происходит их перегрев, что негативно сказывается на состоянии клеток микроорганизмов в конечном продукте. Однако, если в процессе испарения капель суспензии сушильный агент переохладился, то это приведет к высокому содержанию влаги в сухом препарате и снижению его способности к длительному хранению. Оптимальной продолжительности хранения сухих препаратов бактериальных культур считается остаточная влажность ниже 7% [1203, 1205, 1210, 1212-1215].

Интересной особенностью галоархей является их способность длительное время выживать, будучи инкапсулированными в кристаллы галита. Так как галоархеи являются экстремофильными галофилами и обитают в гиперсоленых средах с концентрациями хлорида натрия близкими к концентрациям насыщенного раствора, что способствует активному кристаллообразованию в окружающей их среде, и, как следствие, образованию соляных кристаллов с включенными в них галобактериями [1216]. Многие из водных объектов, являющихся природным местом обитания экстремальных галофилов имеют сезонный жизненный цикл, включающий стадию пересыхания водоема. Типичными обитателями подобных водоемов на момент терминальной стадии высыхания являются галоархеи. Способность переносить полное удаление воды из окружающей среды в комбинации с устойчивостью по отношению к интенсивному солнечному излучению и эффективными системами геномной репарации и оксидативного стресса, позволяет части галобактериальной

популяции выживать и возрождать популяцию при наступлении благоприятных условий [64, 97, 1217].

Лабораторные опыты с выращиванием кристаллов галита, содержащих инкапсулированные клетки галобактерий, показали, что в процессе инкапсуляции с представителями некоторых видов галобактерий происходят морфологические изменения – палочковидная галобактериальная клетка «распадается» на три-четыре сферические клетки меньшего размера (0,4 мкм). Подобные морфологические преобразования являются реакцией галобактериальной клетки на утерю влаги в процессе инкапсуляции в кристалл [97].

В состоянии «карликовых» клеток галобактерии способны сохраняться годами будучи инкапсулированными в кристалл галита. Появление в среде питательных веществ способствует их обратной трансформации в палочковидную форму. Образование нескольких миниатюрных сферических клеток из одной галобактериальной клетки и последующая их трансформация в полноценные галобактериальные клетки свидетельствует о том, что в каждой из «карликовых» клеток присутствует копия галобактериальной хромосомы, а некоторые виды галоархей в нормальных условиях являются полиплоидами. Подобное поведение галобактерий является эффективной стратегией выживания в неблагоприятных условиях и быстрого восстановления популяции в случае попадания в оптимальные для роста условия [80].

Однако, разработка эффективного способа сохранения биомассы галобактерий до сих пор является актуальной задачей для биотехнологии. Сохранение галобактериальных клеток с применением глубокой заморозки с криопротекторами (глицерин, диметилсульфоксид), а также лиофилизация биомассы показали резкое снижение числа жизнеспособных клеток из-за воздействия низких температур [1218].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристики исходных и мутантных штаммов галоархей *Hbt. salinarum*

В исследовании использовались штаммы галоархей, депонированные в ВКПМ (Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов): штамм дикого типа, продуцент каротиноидов *Halobacterium salinarum* 353П (ВКПМ В-1739), продуцент каротиноидов *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794); продуценты бактериородопсина: *Halobacterium salinarum* ET-1001, *Halobacterium salinarum* D96N и штамм *Halobacterium salinarum* КСК-03307 (ВКПМ В-10286), полученный из ET-1001 модифицированным методом индуцированного мутагенеза с помощью облучения ультрафиолетом, с последующей селекцией на агаризованной среде.

Клетки представляют собой одиночные подвижные палочки 2-7×0,5-0,7 мкм, спор не образуют, газовых вакуолей не содержат, колонии на агаризованной среде полупрозрачные, гладкие с гладким краем, выпуклые, насыщенного красного (для продуцентов каротиноидов) или сиреневого (для продуцентов БР) цвета.

2.2. Бактериальные культуры для исследований карбонатогенеза

В качестве объектов исследования использовали:

– Микроорганизмы из коллекции кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева: *Bacillus subtilis* К, *Bacillus subtilis* М (медицинский штамм), *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*;

– Штаммы микроорганизмов, выделенные методом накопительных культур на среде с мочевиной из эко- и техногенных систем, в которых возможно присутствие уробактерий:

– навоз крупного рогатого скота, навоз песцов (звероферма), птицы (птицеферма);

- закрепленные пески Астраханской области;
- разрушенные цементные блоки домов в Москве;
- экстремально галофильные экосистемы, характеризующиеся высокой концентрацией солей и высоким рН среды (озеро Эльтон, Россия; озеро Аликес, Греция; озеро Шотт-эль-Джерид, Тунис).

Идентификация культур, обладающих высокой биокальцинирующей активностью, проведена с использованием стандартного анализа последовательности генов 16S рРНК [1219].

2.3. Модифицированный метод мутагенеза для получения и отбора мутантов

В глубинную культуру клеток *Hbt. salinarum* ET-1001, полученную в колбах и находящуюся в предстационарной фазе роста, добавлялся активированный уголь АГ-3 (АО "Сорбент", Россия) в количестве 30 г/л при перемешивании содержимого колбы. Через 6-8 ч после очистки от компонентов среды и метаболитов (выдерживания с углем) 2 мл суспензии клеток переносились из колбы в чашку Петри с агаризованной средой, в которой поверхностно были инкапсулированы в агар и распределены на расстоянии около 3 см друг от друга гранулы АГ-3. Суспензия вносимых клеток распределялась шпателем по поверхности агара. Облучение ультрафиолетом (λ 254 нм) проводилось с расстояния 15 см от поверхности агара в течение 3-5 мин. источником жесткого ультрафиолета PHILIPS TUV 30W/G30TB. Дальнейшее твердофазное культивирование облученных образцов на агаризованной среде проводилось при освещении. Отбор колоний производился визуально: насыщенная пурпурная окраска колоний коррелировала со способностью к большому накоплению БР по сравнению с красной или оранжевой окраской, обусловленной накоплением каротиноидов. Накопление биомассы, каротиноидов и БР клонами тестировались впоследствии в стандартных условиях глубинного культивирования в колбах.

2.4. Сравнение мутантов и коллекционных штаммов

Особенностью галоархей *Hbt. salinarum* является повышенная вариабельность их генотипа, фенотипически проявляющаяся в изменении окраски колоний отдельных клонов при высеве на твердые питательные среды.

Такую необычно высокую вариабельность можно связать с тем, что галобактерии, обитая в экстремальных условиях, за долгое время эволюции выработали разнообразные механизмы и чувствительные системы регуляции, позволяющие им успешно адаптироваться в галофильных и галотолерантных микроценозах к изменениям во внешней среде [1220-1222].

В предварительных опытах по оптимизации условий культивирования образцы исследуемых штаммов 353П и ЕТ-1001, выращенные глубинным способом в колбах при высоком содержании органических компонентов, уровне освещения и аэрации при посевах на твердую среду при освещении (500 Лк) мутировали с повышенной частотой, что фенотипически проявлялось в появлении белых, розовых, сиреневых колоний и колоний с промежуточными оттенками (Рисунок 2.1).

При выращивании же галоархей в колбах на жидкой среде, обедненной ростовыми факторами, в темноте и с низким уровнем аэрации частота мутаций при последующем выращивании в чашках в темноте была незначительной. Таким образом, устойчивость клеток галоархей в сильной степени зависит от условий роста, что важно учитывать при отборе клонов для последующего цикла культивирования.

Следует отметить, что дикий штамм 353П при глубинном культивировании в колбах, посевах показывал достаточно стабильные характеристики по выработке каротиноидов и БР. Пересевы ЕТ-1001 в аналогичных условиях вели к снижению выработки БР, нарастанию количества каротиноидов до некоторого установившегося соотношения выработки БР и каротиноидов.

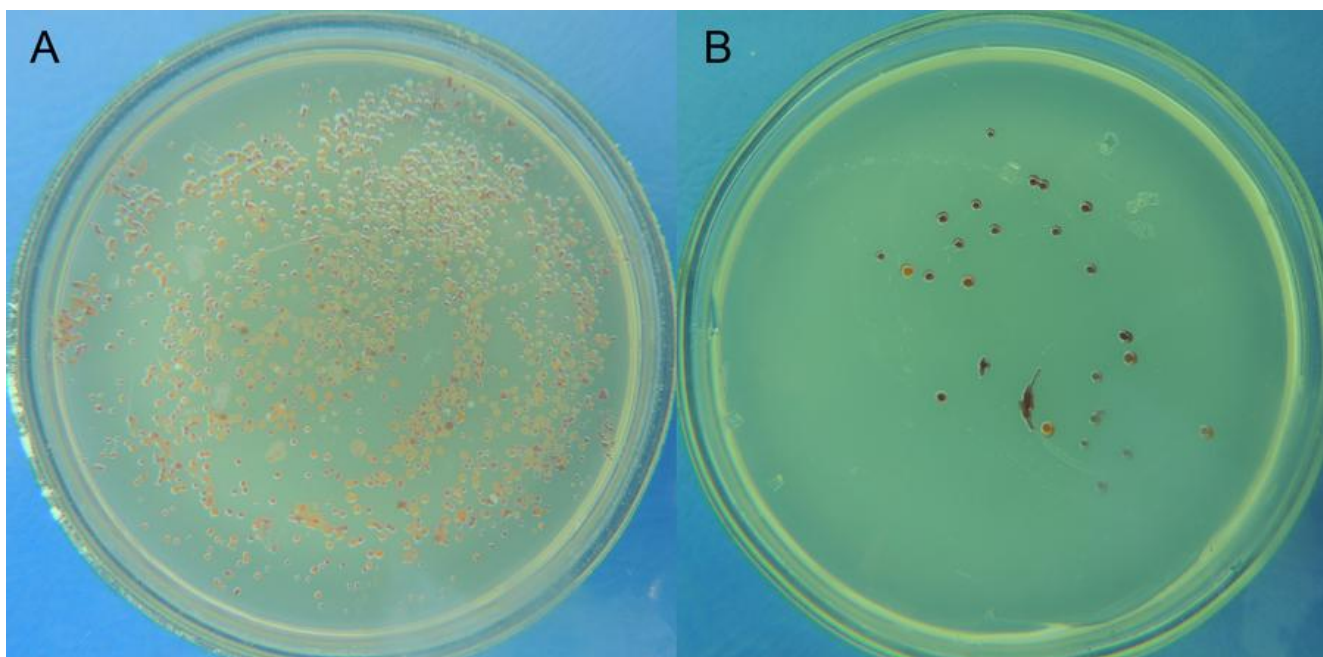


Рисунок 2.1. *Hbt. salinarum*353П (А) и ET-1001 (В) с высокой частотой мутаций при выращивании в неблагоприятных условиях в колбах и последующем пересеве на чашки Петри.

В этой связи, поскольку штамм ET-1001 перспективен как продуцент БР, было решено провести серию экспериментов по получению его мутантов с оценкой их устойчивости к мутациям, способности к росту, накоплению БР и каротиноидов на стандартной питательной среде (Таблица 2.1).

При индукции мутантов ультрафиолетом по стандартной процедуре клетки концентрированной суспензии галобактерий погибали за 5-10 секунд облучения и не реактивировались при последующем культивировании на твёрдой среде. Модифицированная процедура (с присутствием активированного угля АГ-3 на всех стадиях) позволила на порядок увеличить дозу облучения клеток (до 3-5 минут). На основании данных о столь существенном повышении устойчивости галобактерий к ультрафиолетовому облучению можно сделать вывод, что активированный уголь выполняет функцию очистки от метаболитов и компонентов среды после глубинного культивирования в колбах, а также создает градиент концентрации субстрата в агаризованной среде в зависимости от

расстояния до гранул активированного угля, что является дополнительным фактором отбора клонов.

Действительно, непосредственно над гранулами угля преимущественно встречались после реактивации оранжевые колонии, рядом с гранулами доминировали сиреневые клоны, вдали от гранул – белые. Последующий высев клонов, образующих сиреневые колонии, на чашки Петри показал, что в большинстве своем частота мутаций снизилась примерно в 100 раз.

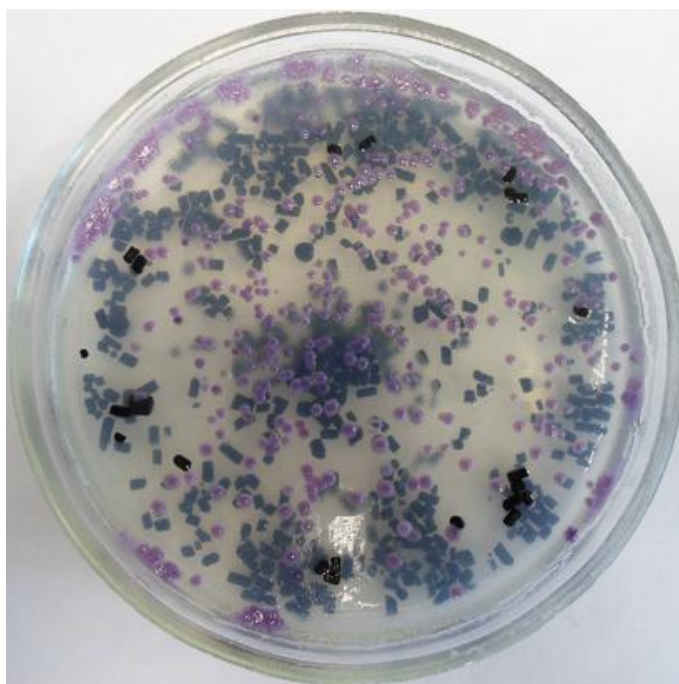


Рисунок 2.2. *Hbt. salinarum* КСК-03307 при выращивании в неблагоприятных условиях в колбах и последующем пересеве на чашки Петри.

Полученные результаты свидетельствуют, что в индукции мутаций могут участвовать некие компоненты/производные компонентов исходной питательной среды или продукты метаболизма, которые либо препятствуют реактивации галобактерий, либо напрямую оказывают токсическое действие на клетки, если не поглощаются активированным углем как в модифицированном варианте эксперимента.

Из отобранных и депонированных в ВКПМ штаммов наибольшую способность к синтезу БР при приемлемых ростовых характеристиках и

минимальном накоплении каротиноидов показал штамм КСК-03307 (Таблица 2.1, Рисунок 2.2).

Можно также отметить, что оранжевые клоны по своим характеристикам подобны штамму 353П: для них характерны более высокая скорость роста, уровень накопления биомассы и каротиноидов по сравнению с БР-продуцирующими вариантами. Скорее всего, различия обусловлены тем, что штаммы, накапливающие больше каротиноидов, менее чувствительны к неблагоприятным факторам окружения (в частности, к УФ), поскольку именно каротиноиды могут выступать как антиоксиданты, выполняющие защитные функции в отношении роста при оксидативном стрессе [624].

Таблица 2.1. Показатели роста и биосинтеза некоторых из мутантов при глубинном культивировании в колбах на стандартной среде.

Штамм/Мутант	μ_{\max}, ч⁻¹	Бактериоруберин, мг/100 г АСБ	Цвет суспензии	АСБ, г/л	БР, г/л
ЕТ-1001	0,054	1,1±0,1	Розово-сиреневый	3,00±0.13	0,045±0.005
КСК-03307	0,054	0,6±0,1	Ближе к сиреневому	3,04±0,31	0,075±0,003
Вариант 11	0.055	5,3±0,7	Розово-сиреневый	3,70±0,23	0,060±0,005
Вариант 21	0,056	9,6±1,2	Розово-сиреневый	3,40±0,26	0,025±0,003
Вариант 23	0,057	5,2±0,6	Розово-сиреневый	3,75±0,22	0,045±0,005
Вариант 44	0,055	3,5±0,7	Розово-сиреневый	3,40±0,27	0,055±0,006
Вариант 53	0,064	29,5±6,1	Оранжевый	5,60±0,23	–
Вариант 77	0,056	5,5±1,3	Розово-сиреневый	3,38±0.20	0,050±0,006
Вариант 79	0,042	–	Белый	2,50±0,18	–
Вариант 92	0,056	3,3±0,9	Розово-сиреневый	2,96±0,22	0,045±0,004
Вариант 93	0,062	18,3±4,3	Оранжевый	4,40±0,29	0.007±0,002

*Накопление биомассы и окраска оценивались по истечении 7 суток культивирования

2.5. Компоненты комплексных питательных сред для глубинного культивирования *Hbt. salinarum* и *Halomonas utahensis*

Основа среды – солевой раствор готовится заранее и может храниться продолжительное время; содержит в основном, минеральные компоненты, г/л: NaCl – 250, MgSO₄×7H₂O – 20, KCl – 3, цитрат Na – 3, CaCl₂ – 0,2, вода – дистиллированная.

Состав и содержание микроэлементов и органических компонентов среды варьировались. Оптимизация проводилась в колбах для максимизации экономических коэффициентов по биомассе, бактериородопсину и бактериоруберину с использованием планов Плакетта-Бермана и Бокса-Уилсона. [1223, 1224].

Модифицированная среда для синтеза галобактериями бактериородопсина (штаммы ET-1001, D96N КСК-03307) использовалась в дальнейшем для сравнительных экспериментов и включала, наряду с солевой основой, г/л: триптон Serva – 5, дрожжевой экстракт Organotechnie – 2, глицерин – 5 (4 мл/л), ZnSO₄×7H₂O – 0,001, MnSO₄×H₂O – 0,0003, FeSO₄×7H₂O – 0,005-0,030; pH 6,8-7,0 (подводилась NaOH). В среде для культивирования штаммов-продуцентов каротиноидов (353П, 353П-1), а также в экспериментах по нестерильному культивированию *Halomonas utahensis* SK7 содержание глицерина составляло 1,25 г/л (1 мл/л). В экспериментах с ферментолизатами зерновых в составе сред отсутствовали триптон и дрожжевой, содержание глицерина составляло 2,5 г/л (2 мл/л). В экспериментах с заражением *Hbt. salinarum* 353П вирусами среда отличалась только отсутствием цитрата натрия.

Использовались также триптоны (пептоны) Serva, Hispanlab, Difco, дрожжевые экстракты Hispanlab, Organotechnie, Difco. Влияние качества и, соответственно, марок триптонов, пептонов, дрожжевых экстрактов на выработку БР и каротиноидов приведено в сравнительных экспериментах.

Органические компоненты стерилизовались в солевом растворе отдельно 15 мин. при 121 °С, быстро охлаждались и смешивались в стерильных условиях с

концентрированным раствором микроэлементов (соли цинка, марганца, железа), который стерилизовался фильтрацией (шприцевой фильтр Teknokroma Nylon 0,2/25, Испания).

2.6. Компоненты синтетической среды для культивирования *Hbt. salinarum*

Состав исходной среды до оптимизации, г/л: D,L-аланин – 0,43; L-аргинин – 0,40; D,L-аспарагиновая кислота – 0,45; L-цистеин – 0,05; L-глутамин – 1,3; глицин – 0,06; D,L-гистидин – 0,3; D,L-изолейцин – 0,44; L-лейцин – 0,8; L-лизин – 0,85; D,L-метионин – 0,37; D,L-фенилаланин – 0,26; L-пролин – 0,05; D,L-серин – 0,61; D,L-треонин – 0,5; L-тирозин – 0,2; D,L триптофан – 0,05; D,L-валин – 1,0; АМФ – 0,1; УМФ – 0,1; NaCl – 250; MgSO₄×7H₂O – 20; KCl – 2; NH₄Cl – 0,5; KNO₃ – 0,1; KH₂PO₄ – 0,05; K₂HPO₄ – 0,05; цитрат Na – 0,5; MnSO₄*2H₂O – 3×10⁻⁴; CaCl₂×6H₂O – 0,065; ZnSO₄×7H₂O – 4×10⁻⁵; FeSO₄×7H₂O – 5×10⁻⁴; CuSO₄×5H₂O – 5×10⁻⁵; глицерин – 1,0 мл/л; биотин – 1×10⁻⁴; фолиевая кислота – 1.5×10⁻⁴, витамин B₁₂ – 2×10⁻⁵; pH 6,8-7,0. Основной объем питательной среды стерилизовался при 115 °С в течение 10 минут и быстро охлаждался. Концентрат микроэлементов, ростовые факторы и витамины стерилизовались фильтрацией и вносились в основной объем питательной среды. В некоторых экспериментах синтетическая питательная среда полностью стерилизовалась фильтрацией (шприцевой фильтр Teknokroma Nylon 0,2/25, Испания).

2.7. Питательные среды и культивирование уробактерий

Бактерии культивировали на агаризованных питательных средах и глубинно в 250-мл колбах на орбитальном шейкере Unimax 2010 (Heidolph, Германия) при 180 об/мин и 50-мл заполнении, а также в ферментере с рабочим объемом 7 л («Фермус-3», Россия) для наработки биомассы при температурах 30–37 °С на питательных средах следующего состава, г/л:

Среда LB: глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5, пептон – 10, NaCl – 5, MgSO₄×7H₂O – 0,2, KCl – 0,2, pH 7,0; водопроводная вода (использовалась для культивирования и хранения культур).

Среда Кристенсена: NaCl – 2-5, мочевины – 20, KН₂РO₄ – 1,2, глюкоза – 1, пептон – 2, pH 6,6–6,8; дистиллированная вода. Для получения индикаторной среды (оценка уреазной активности) добавляли водный раствор фенолового красного до конечной концентрации 0,012 г/л.

Среда Дика: пептон – 3, NaHCO₃ – 2,12, мочевины – 10, pH 7,5; дистиллированная вода [1225].

Среда Дика модифицированная: пептон – 3, NaHCO₃ – 2,12, мочевины – 10, KН₂РO₄ – 0,2 (1,2 – для культивирования в ферментере), глюкоза – 1 (7 – для культивирования в ферментере), pH 7,5; дистиллированная вода.

Компоненты среды стерилизовали при 121 °С в течение 25 мин. Несовместимые компоненты стерилизовали отдельно; растворы мочевины и фенолового красного стерилизовали фильтрацией.

Поверхностное культивирование уробактерий (для определения эффективности биоминерализации) проводили при температуре 30-37 °С на чашках Петри со средой Кристенсена с добавлением CaCl₂ в концентрации 7,5-20 г/л. Активность роста уробактерий определяли по оптической плотности суспензии на спектрофотометре Shimadzu UV-2600 (Shimadzu, Япония) при длине волны 540 нм. Биомассу концентрировали на центрифуге Eppendorf 5810R (Eppendorf, Германия) при 7500 об./мин. в течение 15 минут.

2.8. Твердофазное культивирование экстремально галофильных микроорганизмов в чашках Петри

Особенностями выращивания галоархей и галобактерий на агаризованной среде являлись наполнение чашек Петри на 2/3 от общего объема, 1,3-1,5% агар-агара (принималось во внимание высыхание при длительном росте и дальнейшем хранении), концентрация глицерина 1,25 г/л в отличие от модифицированной

среды для глубинного культивирования, освещение лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640 (500 Лк), температура 38,5 °С, повышенная влажность, которая создавалась, например, установкой открытой емкости с водой в прозрачный закрытый пластиковый мешок с чашками Петри. Культивирование продолжалось от 10 до 14 суток в стандартном варианте и до 90 суток для исследования реактивации высушенных образцов. Во время культивирования следили за отсутствием конденсата в чашках Петри.

2.8.1. Агаризованная питательная среда с градиентом от комплексной до синтетической для выявления быстрорастущих колоний

Высев исследуемых штаммов галоархей проводился на чашки Петри с агаризованной питательной средой, содержание питательных компонентов в которой варьировалось в зависимости от места на чашке. Градиент достигался за счет двухслойной среды, первый слой которой содержал полную комплексную питательную среду, второй – вариант синтетической.

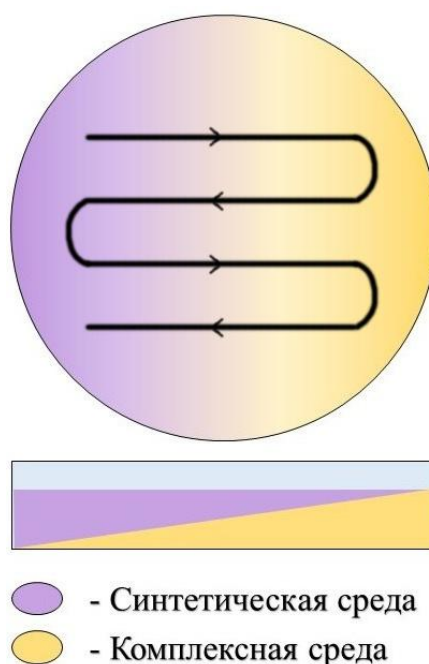


Рисунок 2.3. Вариант засева и расположение слоев питательной среды.

Первый слой с комплексной агаризованной средой заливался скошено, застывал, затем сверху заливалась агаризованная синтетическая среда, создавая плавный переход от полной комплексной среды до варианта синтетической (Рисунок 2.3). Благодаря такому подходу отбирались быстрорастущие и адаптированные к синтетической среде субпопуляции галоархей.

2.8.2. Агаризованная двухслойная питательная среда

В экспериментах с заражением *Hbt. salinarum* 353П вирусами для определения титра вируса и определения негативных колоний использовался также двухслойный агар: нижний слой – 1,8-2,0% агар-агара, верхний – 0,6%. Культивирование велось при 41-42 °С, для индукции вируса использовалось ежесуточное 30 минутное повышение температуры в термостате до 50 °С.

2.9. Глубинное культивирование галоархей и галобактерий в колбах

Культивирование в конических 100 и 250 мл колбах, накрытых колпачками из фольги для предотвращения чрезмерного испарения, проводили стерильно в периодических условиях на орбитальном шейкере G10 (New Brunswick Sci, USA) при 150 об./мин, освещении лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640 и HAGEN T8 Marine Glo 20Вт (500 Лк на уровне колб, интенсивность освещения изменяли в специфических экспериментах), температуре 38,5 °С, также применяли светодиоды и светодиодные матрицы разных длин волн различных производителей. Степень заполнения колб питательной средой составляла 50%, в некоторых случаях этот параметр изменяли для регулирования уровня аэрации культуры. Для засева колб использовали клетки, находящиеся в предстационарной фазе роста или начале стационара, объем посевного материала составлял 4-10% об. Инокулят в ряде опытов нормировали по оптической плотности до уровня 3,15 г/л клеточной массы.

Большое количество биомассы для последующего высушивания нарабатывали 7 суток в колбах объемом 250 мл или в биореакторе до достижения стационарной фазы и максимального содержания каротиноидов в биомассе. Множество колб использовали для получения в итоге несколько отличающихся субпопуляций в биомассе.

Культивирование для исследования реактивации галоархей после сушки проводили без адсорбента, продолжительностью до 3 недель при использовании колб объемом 100 мл. В высушенном посевном материале должно было содержаться в 10 раз больше клеток, чем при стандартном засеве, что рассчитывалось.

Для культивирования галоархей с использованием активированного угля АГ-3 (АО "Сорбент") на дно колбы вносились гранулы угля (30 г/л среды культивирования), которые заливались питательной средой без глицерина с агаром хорошего качества (не менее 4%) для фиксации гранул, после чего содержимое колб стерилизовалось и охлаждалось до застывания агара – уголь инкапсулировался для предотвращения разрушения при перемешивании, питательная среда для глубинного культивирования после стерилизации и охлаждения доливалась поверх слоя агара с углем. При культивировании на поверхности агаризованной среды вырастали колонии, которые служили дополнительными точками роста для глубинной культуры.

При использовании Hypersol-Macronet MN500 (Purolite, США) адсорбент-катионообменная смола (20 г/л среды культивирования) промывалась солевым раствором, снизившийся рН доводился с помощью NaOH до 6,8-7,0, после чего адсорбент стерилизовался в солевом растворе, стерильно добавлялись необходимые компоненты среды. Адсорбенты после культивирования регенерировались и использовались повторно, выдерживая не менее 40 циклов.

2.9.1. Характеристики адсорбентов, использовавшихся при культивировании

При разработке подхода к культивированию галоархей, устраняющего негативные последствия стрессовых воздействий испытывались различные адсорбенты: активированные угли различного происхождения и полимерные адсорбенты. При прямом контакте многих марок активированных углей с клетками галоархей рост последних незначителен, что свидетельствует, возможно, об ингибировании роста галоархей при прямом контакте с веществами ингибиторами, поскольку у поверхности угля их концентрация высока и токсична для клеток галобактерий, которые также адсорбируются на поверхности угля. Активированные угли получают из разных источников при специфической обработке и внутри материала зачастую остаются соединения, постепенно высвобождающиеся в среду в процессе длительного культивирования. Предотвратить это можно с помощью подходов, разработанных в гемосорбции [1226, 1227]. Инкапсулирование адсорбента в гемосорбции предотвращает разрушение форменных элементов крови, например, эритроцитов.

Были проведены эксперименты с различными активированными углями (БАУ, СКТ, АГ и др.) и вариантами инкапсуляции активированного угля в полиакриламид, желатин, кальций-альгинат. Наилучшие показатели культивирования обеспечил вариант угля АГ-3 (АО "Сорбент"), инкапсулированный в 4%-ный агар для предотвращения размывания и фиксации в колбочных опытах, оптимизированная норма расхода в варианте периодического культивирования 30 г/л питательной среды. Активированный уголь марки АГ-3 получают в виде гранул из каменноугольной пыли и связующих веществ методом обработки водяным паром при температуре 850–950 °С. Активированный уголь марки АГ-3 является универсальным для адсорбции различных органических соединений из жидких и газовых сред, механическая прочность угля обеспечивает длительный ресурс работы, его можно подвергать термической регенерации с высокой степенью восстановления первоначальных

свойств. Активированный уголь АГ-3 (Таблица 2.2) содержит огромное количество мезопор (от 2 до 50 нм), поэтому подходит для адсорбции в том числе крупных органических молекул, обладает высокой сорбционной способностью, используется для водоподготовки и в пищевой промышленности для осветления напитков.

Таблица 2.2. Основные характеристики активированного угля АГ-3.

Наименование показателя	Норма по ГОСТ ГОСТ 20464-75
Внешний вид	Цилиндрические гранулы темно-серого или черного цвета
Размер гранул:	
>3,6 мм, %, не более	0,4
3,6—2,8 мм, %, не более	3,0
2,8—1,5 мм, %, не менее	86,0
1,5—1,0 мм, %, не более	10,0
<1,0 мм, %, не более	0,6
Прочность на истирание, %, не менее	75
Массовая доля влаги, %, не более	5,0
Суммарный объем пор по воде, см ³ /г, не менее	0,8
Динамическая активность по бензолу, мин, не менее	40
Насыпная плотность г/дм ³	480–500

Впоследствии совместно с кафедрой кибернетики РХТУ им. Менделеева был разработан автоматизированный способ инкапсуляции АГ-3 в агар для использования в адсорбционных колонках с использованием установки псевдооживленного слоя Mini-Glatt (Glatt GmbH, Германия).

Другим подходящим для извлечения ингибирующих галоархеи соединений адсорбентом оказался сверхсшитый сульфокатионит Hypersol-Macronet MN500 (Purolite, США), который в сравнении с другими исследованными адсорбентами фирмы Purolite: MN202, MN200, MN150, A500P, NRW100 показал наилучшие результаты. MN500, как и АГ-3 также широко используется в очистке сточных

вод, водоподготовке, пищевом производстве, очистке ферментов. MN500 можно использовать без инкапсуляции, оптимальная концентрация для стандартного периодического культивирования 20 г/л.

Следует отметить, что в последнее время характеристики MN500, приведенные для партий 2010-2015 годов (Таблица 2.3) изменились не в лучшую сторону, видимо, в связи с изменением техпроцесса. Некоторые схожие по характеристикам адсорбенты, например, MN502, который также тестировался, не показывают хороших результатов.

Таблица 2.3. Основные характеристики адсорбента MN500.

Показатель	MN500
Применение	Адсорбционное разделение гидрофобных органических соединений – катионообменная матрица
Полимерная структура	Макропористый полистирол, сшитый дивинилбензолом
Внешний вид	Сферические гранулы
Функциональная группа	Сульфоновая кислота
Ионная форма	H ⁺
Полная обменная ёмкость, г-экв/л	0,8-1,0 (H ⁺ форма)
Остаточная влажность, %	52-57 (H ⁺ форма)
Средний диаметр, мкм	535±85
Кэф. однородности	1,4
Удельная поверхность, м ² /г	900
d50, мезо- и макропоры, Å	800
d50, микропоры, Å	15
Объем пор, мл/г	1-1,1
Удельный вес	1,19

Насыпной вес, г/л	750-785
Температурный лимит, °С	120

Оба адсорбента выдерживают многократную стерилизацию острым паром, их можно регенерировать кипячением в дистилляте с последующим замачиванием в течение суток в растворе 70%-ного этилового спирта с добавлением 3% NaOH, последующим подведением pH раствором HCl (2N) и промывкой дистиллятом. АГ-3 после этого высушивают и инкапсулируют, а MN500 перед применением промывают минеральной основой питательной среды.

2.10. Глубинное культивирование галоархей в биореакторе

Эксперименты в стеклянных лабораторных биореакторах Фермус-3 (НИЦ "Биоавтоматика", Нижний Новгород, Россия) с рабочими объемами 7,5 л (общий объем 10 л), 3,5 л (общий объем 5 л), Minifors (Infors, Швейцария) с рабочим объемом 3 л (общий объем 5 л) и BioFlo-110 (New Brunswick Sci, USA) с рабочим объемом 0,9 л (общий объем 1,3 л) проводили при 38,5 °С в стерильных условиях с автоматическим регулированием pH (поддерживался на уровне 7,5-7,8 подтитровкой NaOH и HCl), pO_2 , температуры при освещении лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640, HAGEN T8 Marine Glo 20Вт и светодиодными матрицами 465 нм и белого света через стекло биореактора, мощность облучения составляла не менее 70 мВт/л среды и контролировалась люксометром-УФ-радиометром ТКА-01/3 (ООО НТП "ТКА", Россия). Для управления процессом культивирования использовали разработано программное обеспечение "BioDrome 3.0".

Культивирование с рециклом культуральной жидкости с клетками (содержимого биореактора) через адсорбент проводилось с использованием дополнительных компонентов: стерилизуемой адсорбционной колонны, вмещающей максимально около 800 г активированного инкапсулированного активированного угля АГ-3 или 1200 г MN500, перистальтического насоса

LongerPump WT600-2J, проточной кварцевой кюветы (l 10 мм) с блоком сканирования цвета суспензии (см. п. 2.11 – экспресс-методику определения содержания БР в клетках галоархей), а в дальнейшем – с зондом обратного рассеяния R200-7-VIS-NIR (Ocean Optics, США).

В адсорбционной колонне уровень заполнения адсорбентом составлял не более 2/3 от объема, так как было необходимо хорошим протоком культуральной жидкости с клетками обеспечить перемешивание частиц адсорбента – своеобразный псевдооживленный слой (Рисунки 2.4, 2.5.) для улучшения массообмена.



Рисунок 2.4. Биореактор с рециклом культуральной жидкости с клетками через адсорбционную колонну с адсорбентом.

Для повышения выхода биомассы ГБ и содержания БР в реактор вносили субстратную подпитку, приготовленную на базе основного солевого раствора с увеличенным содержанием органических и минорных минеральных компонентов. (1П) – одна доза подпитки вносила в реактор дополнительно, г/л: триптона – 5, дрожжевого экстракта – 2, глицерина – 2,5, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,3, KCl – 0,1,

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,0003. Мощность облучения повышали до 200 мВт/л к концу культивирования клеток с высокой плотностью (45-47 г/л).

Высокоплотностное культивирование штаммов-продуцентов каротиноидов в мембранном биореакторе проводили с использованием половолоконного модуля Novospring NFY-4021S (молекулярно-массовое отсечение 50 кДа).



Рисунок 2.5. Полная версия автоматизированной системы культивирования *Hbt. salinarum* с адсорбционной колонной.

2.11. Экспресс-методика определения содержания БР в клетках галоархей

Для выяснения динамики накопления БР разработана экспресс-методика, основанная на цветовом анализе суспензии, не прибегая к непосредственному выделению БР. Для этого суспензия галоархей непрерывно прокачивается через кювету определенной толщины и сканируется с помощью CCD (Charge Coupled Device) матрицы сканера (Epson Perfection 1270). Цвет разлагается на компоненты (R, G, B) и сопоставляется с цветом эталонных вариантов образцов суспензии, полученных ранее. Обработка производится в автоматическом режиме с применением разработанного программного обеспечения “BioDrome 3.0” на базе инструментария LabVIEW фирмы National Instruments (США).

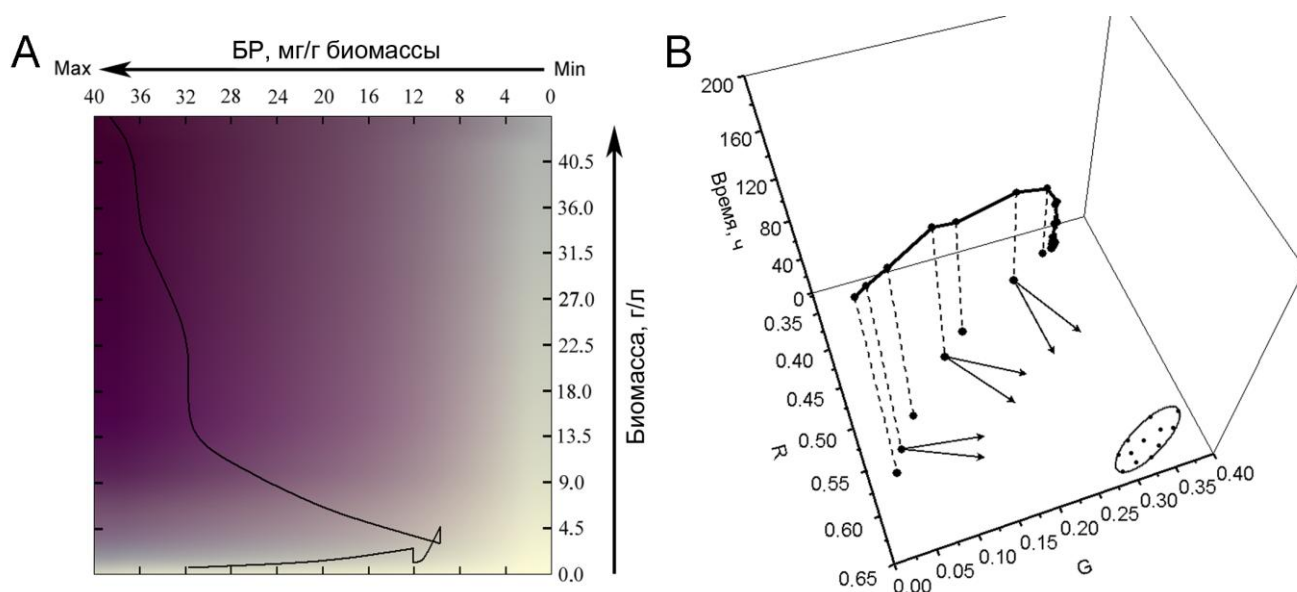


Рисунок 2.6. Изменение цвета в процессе культивирования с адсорбентом. (А) – градиентная цветовая карта для определения содержания БР, (В) – R-G диаграмма для мониторинга культивирования. Стрелками показано изменение направленности биосинтеза в сторону накопления каротиноидов при отработке адсорбента.

Градиентная карта цвета, полученная на базе эталонных вариантов суспензий галоархей (Рисунок 2.6А) обладает меньшей точностью при малых

оптических плотностях суспензии с погрешностью определения бактериородопсина при уровне биомассы до 1,2 г/л около 50%. С возрастанием уровня накопления биомассы точность анализа повышается: при содержании биомассы от 2 г/л до 3 г/л погрешность составляет около 35%, а при 5 г/л стабилизируется на уровне 10%, что скорее всего связано с уменьшением прозрачности среды с бактериями и снижением вклада цвета компонентов питательной среды в суммарный цвет суспензии.

Экспресс-методика была модифицирована для варианта применения зонда обратного рассеяния R200-7-VIS-NIR (Ocean Optics, США). В комплект с источником излучения USB-DT (Ocean Optics, США) и малогабаритным спектрометром USB4000-VIS-NIR (Ocean Optics, США) зонд объединяется с помощью волоконно-оптических кабелей. Обработка спектров возможна с помощью стандартного ПО SpectraSuite (Ocean Optics, США) или OmniDriver (Ocean Optics, США) – платформы для разработки спектроскопического ПО, которое имеет библиотеки для LabVIEW и успешно интегрируется с ПО “BioDrome 3.0”, где происходит спектральная обработка.

2.12. Характеристики биомассы, клеточной суспензии и высушенных образцов

Клеточный рост оценивался по изменению оптической плотности при λ 660 нм (спектрофотометр UV-2600 Shimadzu, Япония) с последующим пересчетом на сухой вес по калибровочной кривой (для палочковидных галоархей). Прямой подсчет клеток в малых объемах суспензии при разных разведениях проводили с использованием микроскопа с фазовым контрастом.

Для определения сухого веса галоархей разрабатывалась специальная методика, т.к. отмыть клетки от солей перед высушиванием невозможно – происходит лизис клеток. Галоархеи выращивались на агаризованной среде на чашках Петри, выросший воздушный газон аккуратно счищался с поверхности агара. Полученная биомасса тщательно перемешивалась до однородной

костистенции, т.к. влажность в разных чашках Петри могла отличаться. Часть биомассы шла на определение влажности, другая часть растворялась в стандартном для галоархей растворе минеральных солей, измерялась оптическая плотность и через влажность высчитывалось реальное содержание АСБ.

Прямое определение содержания БР осуществлялось по методике, разработанной Shand и Betlach [783], с помощью которой также осуществлялась и калибровка эталонов для экспресс-методики.

Непосредственное выделение БР в составе пурпурных мембран производилось согласно [1228] Концентрация БР в очищенных образцах определялась по формуле: $C_{БР} \text{ (г/л)} = L * A_{568} * 26700 / 63000$, где L (см) – толщина кюветы (1 см), A_{568} – оптическая плотность при 568 нм, 26700 (Да) – молекулярная масса БР, 63000 ($M^{-1} \text{ см}^{-1}$) – коэффициент экстинкции.

Высококачественный препарат БР в составе пурпурных мембран обладает следующими характеристиками: отсутствие пиков каротиноидов в спектре, соотношение белок/хромофор $A_{280}/A_{568} = 1,6-1,9$, соотношение $A_{568}/A_{350} > 3$.

Наличие БР и каротиноидов контролировалось по спектрам лизатов. Для этого клетки галоархей осаждались центрифугированием, ресуспендировались в бидистилляте с добавлением 10 мг/л ДНКазы (Sigma) при перемешивании. Полученный лизат центрифугировался при 7000 g 10 минут и анализировался на спектрофотометре со снятием спектра в диапазоне видимого света в интервале длин волн (λ) 400–620 нм или 250-700 нм. Анализ каротиноидов проводился согласно методике, приведенной Dummer et al. [645] с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1100 (Agilent, США) и аналитической колонки для обращеннофазной хроматографии Диасфер-110-С18 (4,6×250 мм, диаметр частиц 5 мкм) (ЗАО “БиоХимМак СТ”, Россия).

Фазово-контрастная микроскопия проводилась с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония), оснащенного камерой ProgRes SpeedXT (Jenoptic, Германия).

Остаточная влажность образцов после распылительной и лиофильной сушки определялась гравиметрически путем высушивания в вакуум-сушильном шкафу при 70 °С до достижения постоянного веса [1229].

2.13. Планирование экспериментов и статистическая обработка результатов

Эксперименты по оптимизации сред и условий культивирования проводились не менее чем в трех повторностях. Планы Плакетта-Бермана использовались для определения важных компонентов питательной среды по выбранным критериям отклика. После анализа переменных регрессии эти наиболее значимые факторы оптимизировались затем с помощью метода крутого восхождения Бокса-Уилсона для чего проводились ПФЭ или ДФЭ с рандомизацией экспериментов [1223, 1224]. Оценки коэффициентов регрессии с уровнями выше 95% ($P < 0,05$) включались в окончательные модели. Статистическая значимость полиномиальных моделей оценивалась с помощью F-теста, а значимость коэффициентов регрессии проверялась с помощью t-тестов. ПО STATISTICA 12 (StatSoft, Россия) использовалась для планирования и анализа экспериментов.

Образцы для экспериментов по сохранению биомассы были подготовлены и проанализированы не менее чем в трех экземплярах. MatLab R2014a использовался для статистического дисперсионного анализа (ANOVA) при уровне значимости $P \leq 0,05$.

2.14. Эксперименты с источниками излучения, обладающими разными спектральными характеристиками

Эксперименты с различными источниками освещения проводили в колбах на орбитальном шейкере G10 (New Brunswick Sci, США). Одиночные светодиоды стерилизовались 70%-ным спиртом и были закреплены внутри колбы для освещения поверхности культуральной жидкости, провода питания выводились

между пробкой и горловиной колбы. Перекрестное освещение исключалось оборачиванием каждой колбочки фольгой (Рисунок 2.7).

Контроллером можно было регулировать интенсивность свечения отдельного светодиода или объединенных в цепочку для статистической обработки результатов с нескольких колб.

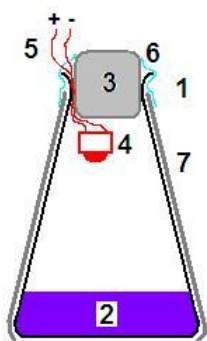


Рисунок 2.7. Освещение культур индивидуальным светодиодом: 1 – горловина колбы, 2 – культуральная жидкость с микроорганизмами, 3 – ватно-марлевая пробка, 4 – светодиод, 5 – провода электропитания светодиода, 6 – парафильм, 7 – фольга.

Светодиодные жгуты можно было непосредственно погружать в культуральную жидкость, предварительно простерилизовав 70%-ным спиртом (Рисунок 2.8). Каждая колба экранировалась фольгой во время эксперимента.

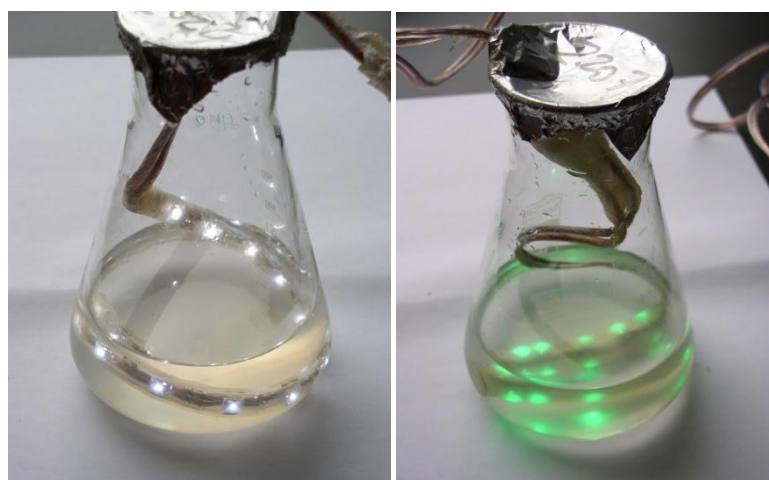


Рисунок 2.8. Колбы со светодиодными жгутами, излучающими белый и зеленый свет.

Интенсивность света в жгутах можно было регулировать как количеством светодиодов, так и контроллером управления. Интенсивность освещения контролировалась люксметром-УФ-радиометром ТКА-01/3 (ООО НТП “ТКА”, Россия). Спектральные характеристики светодиодов фиксировались с помощью сферы USB-ISP-50 (Ocean Optics, USA) и спектрометра USB4000-VIS-NIR (Ocean Optics, USA).

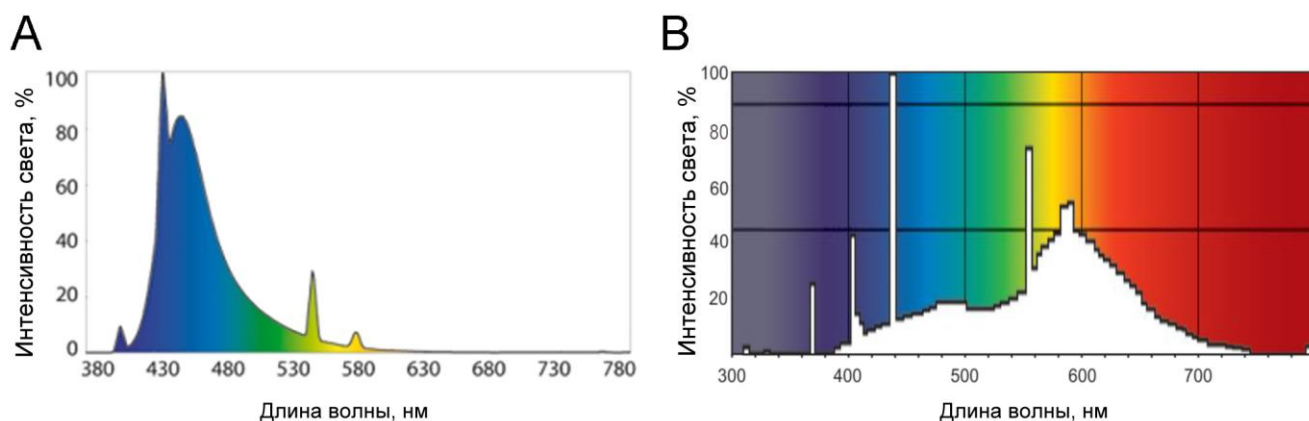


Рисунок 2.9. Спектр люминесцентных ламп. А – HAGEN T8 Marine Glo, В – PHILIPS TL-D 18W/33-640.

На рисунке 2.9 представлены паспортные спектральные характеристики использовавшихся люминесцентных ламп. Регулируя их количество, соотношение одной и другой и расстояние до поверхности, освещали колбы на орбитальном шейкере.

2.15. Ферментативные гидролизаты зерновых культур для культивирования галоархей

В качестве субстратов для культивирования *Hbt. salinarum* в предварительных экспериментах были выбраны гидролизаты зерновых культур (кукурузная, пшеничная и ячневая крупы). Перед гидролизом крупы проходили предварительную обработку – измельчение с помощью автоматической мельницы в течение 15 секунд. Крупы разводились водопроводной водой. Гидро модуль был

выбран в интервале 1:5 – 1:20, рН смеси подтитровывали до необходимого значения для каждого из используемых ферментов. Далее смесь отправляли на предварительную тепловую обработку в автоклав при изменении давления и времени в пределах 0,7-1,5 ати, время тепловой обработки варьировали от 10 до 40 минут. Затем смесь помещали на водяную баню для снижения температуры среды и последующего гидролиза.

Для ферментативного гидролиза использовали следующие ферментные препараты: Protex40E в концентрациях от 0,01 до 0,2% от массы крупы, Протосубтилин ГЗх (Таблица 2.4) в интервале 1-4% от массы крупы (концентрации подобраны в ходе предварительных экспериментов). Время гидролиза составляло 1-2 часа для всех ферментов и зерновых круп.

Для очистки проб от сгустков крупы гидролизаты центрифугировали 12,000 об./мин., 20 минут (центрифуга Eppendorf 5010R, Германия). Супернатант профильтровывали с помощью вакуумной фильтрации и дополняли компонентами питательной среды.

Таблица 2.4. Характеристики ферментных препаратов, рабочие параметры.

Фермент	Описание	рН	Т,°С
Protex 40E (Genencor, USA)	Бактериальная щелочная протеаза <i>Bacillus subtilis</i> , активатор – ионы кальция	8,6	55
Протосубтилин ГЗх (Сиббиофарм, Россия)	Комплекс, содержащий нейтральные и щелочные протеазы <i>Bacillus subtilis</i> и ряд сопутствующих ферментов: β-глюканазу, целлюлазу, ксиланазу, α-амилазу	6,5	50

2.16. Определение протеолитической активности по казеину

Данная методика является модификацией метода Kunitz M. et. al. [1230]

Исследуемый раствор объемом 2,0 мл, содержащий фермент, вносили в стеклянную пробирку и оставляли на водяной бане (Janke & Kunkel) в течение 10

минут при температуре 37 °С. Реакция протеолиза была инициирована добавлением 2,0 мл 2 % раствора казеина по Гаммерстену в фосфатном буфере (рН 8,0). Реакция протекала в течение 20-50 минут при той же температуре. Во время реакции протеолиза пробирку встряхивали с постоянной периодичностью. Реакция останавливалась путем добавления 4,0 мл 10 % трихлоруксусной кислоты. Через 15 минут реакционную смесь отфильтровывали. Оптическую плотность измеряли при 280 нм.

Расчет проводили по следующей формуле:

$$PU = D_{280} * \Sigma V * Ge / \tau * 1,2 * Ve * g,$$

D_{280} – оптическая плотность при длине волны 280 нм;

ΣV – общий объем анализируемого раствора, мл;

Ge – масса растворителя, г;

τ – время реакции, мин;

Ve – объем анализируемого раствора фермента, мл;

g – масса фермента, г;

1,2 – коэффициент пересчета оптической плотности в мМ тирозина.

Для определения мембран-ассоциированной протеиназной активности галоархей суспензию клеток объемом 10 мл отфуговывали при 7500 об./мин. в течение 15 минут (Eppendorf 5010R, Германия) и подвергали лизису в 8 мл дистиллированной воды с добавлением ДНКазы.

2.17. Определение аминокислотного состава образцов

Количественный анализ аминокислот проводили при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием колонок, заполненных сульфополистирольным катионитом. Детекцию аминокислот осуществляли реагентом, действующим компонентом которого является нингидрин. При взаимодействии α -аминокислоты с нингидрином образуется Шиффово основание, которое перегруппировывается, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден. Образовавшийся

аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина. Образовавшееся соединение превращается в окрашенную енольную форму, получившую название «сине-фиолетовый комплекс Руэмана». Регистрацию оптической плотности раствора, вытекающего из реакционной бани, проводили при двух длинах волн – 570 и 440 нм, что позволяло детектировать любые аминокислоты.

Обсчет и интерпретация хроматограмм производили при помощи программы МультиХром ЗАО «Амперсенд» (Россия). Программа автоматически осуществляла коррекцию небольших разбросов во времени выхода аминокислот.

Приготовление стандартной смеси аминокислот:

В пластиковую пробирку объемом 1,5 мл (фирма «Eppendorf», Germany) было помещено 40 мкл концентрированной стандартной смеси 18 аминокислот (Amino Acid Standard, AA-S-18-5ML analytical standard, SIGMA, pcode 1001357972, lot SLBC0408V) и 960 мкл 0,1 н соляной кислоты. Смесь была тщательно перемешана.

Пробоподготовку и проведение аминокислотного анализа осуществляли согласно [1231].

Определение триптофана.

А. Был проведен отдельный гидролиз образцов бн соляной кислотой, содержащей 4% тиогликолевой кислоты. Условия гидролиза: аликвоты растворов, взятые для гидролиза, концентрировали на вакуум-концентраторе досуха и добавляли по 125 мкл гидролизующей смеси. Гидролиз проводили в стеклянных микроампулах под вакуумом в течение суток при 105 °С. По окончании гидролиза ампулы вскрывали, досуха удаляли гидролизующую смесь.

Б. Навеску белка помещали в ампулу, растворяли в 4N растворе едкого натра и продували азотом. Ампулу запаивают и выдерживают при 105 °С в течение 5 часов [1232].

Определение цистина (метод окислительного гидролиза).

А. Приготовление надмуравьиной кислоты: к 900 мкл 98 % муравьиной кислоты добавляли 100 мкл воды при перемешивании. Из полученного раствора

брали 900 мкл и добавляли 100 мкл 30 % перекиси водорода при перемешивании. Смесь выдерживали во льду 1 час.

Б. Гидролиз образца: в пластиковую пробирку помещали навеску, добавляли 100 мкл надмуравьиной кислоты и полученную смесь выдерживали во льду 1 час. Далее упаривали на Centri Var Concentrator LABCONCO (США) при 30°C. Затем добавляли 100 мкл воды и упаривали досуха. Далее двумя порциями (по 100 мкл) гидролизной смеси растворяли осадок и переносили раствор в ампулу для гидролиза. Гидролиз и последующую обработку гидролизата проводили стандартным образом.

2.18. Подготовка биомассы для высушивания

Содержимое колб после культивирования сливали в единственную емкость, перемешивали и нормировали по оптической плотности до концентрации клеток 3,15 г/л.

Полученные суспензии галобактерий в варианте А (культивирование без адсорбента) и В (культивирование с адсорбентом) фуговали при 7500 об./мин. 15 мин. (центрифуга Eppendorf 5010R, Германия).

Супернатант в каждом варианте использовали для нормировки по оптической плотности содержания биомассы, а также для приготовления сильно концентрированной суспензии галоархей (1 объем отфугованной биомассы : 1 объем супернатанта), которая шла на высушивание.

2.19. Распылительная сушка

Образцы биосуспензии сушили на установке Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, Flawil, Switzerland) (Рисунок 2.10). Мини-распылительная сушилка B-290 имеет цилиндрическую коническую камеру (ширина 200 мм, высота 1000 мм). Сушильный агент и высушиваемый материал подаются в направлении сверху вниз. Исходный концентрат биомассы распылялся с помощью двухпоточной

пневматической форсунки с внутренним диаметром 0,7 мм. Суспензия подавалась перистальтическим насосом во внутренний канал сопла, а сжатый воздух (давление 5 бар) – во внешний. Сушильный агент предварительно нагревался до желаемой температуры с помощью электрического нагревателя. Выходная газовая смесь частиц разделялась циклоном. Использованный сушильный агент (воздух) проходил через фильтр и удалялся из сушилки.

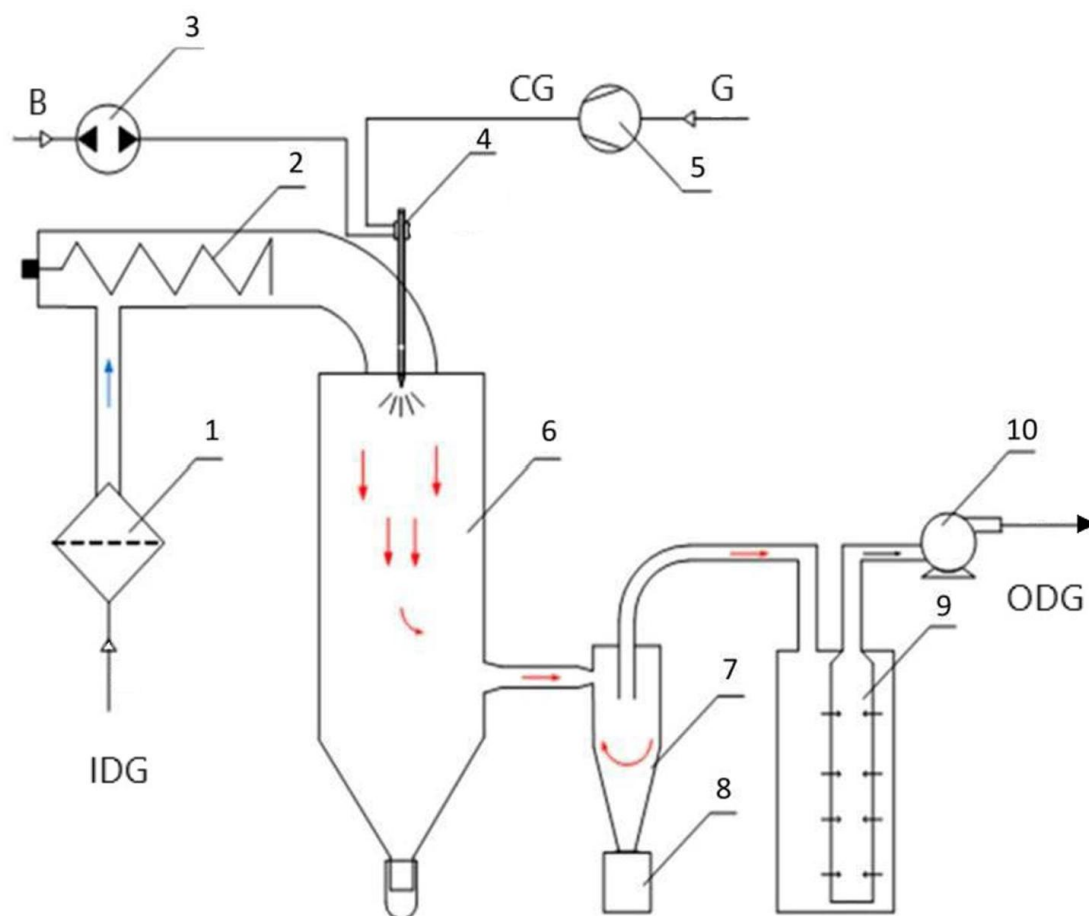


Рисунок 2.10. Схема распылительной сушилки Mini Spray Dryer B-290: 1 – фильтр газа на входе, 2 – электрический нагреватель, 3 – перистальтический насос, 4 – пневматическая форсунка, 5 – компрессор, 6 – распылительная камера, 7 – циклон, 8 – сосуд для сбора продукта, 9 – фильтр газа на выходе, 10 – aspirатор для отвода газа; В – суспензия биомассы, IDG – вход сушильного газа, ODG – выход сушильного газа, CG – сжатый газ.

При исследовании процесса сушки использовались следующие диапазоны рабочих параметров:

1 – температура сушильного агента (воздуха) на входе в аппарат (T_{da}) от 120 до 150 °С;

2 – расход сушильного агента (F_{da}) от 30 до 34 м³/ч;

3 – расход сжатого воздуха (F_{pa}) (давление 5 бар) от 667 до 1052 л/ч;

4 – расход биомассы, подаваемой на сушку (F_b) от 3,45 до 5,7 г/мин.

Варианты режимов распылительной сушки, использовавшиеся для более подробных исследований и оптимизации приведены в таблице 2.5.

Таблица 2.5. Режимы распылительной сушки для оптимизации с помощью искусственных нейронных сетей.

Режим	T_{da} , °С	F_{da} , м ³ /ч	F_{pa} , л/ч	F_b , г/мин.
1	150	34	1052	5,7
2	120	30	1052	5,7
3	150	30	667	5,7
4	120	34	667	5,7
5	150	30	1052	3,45
6	120	34	1052	3,45
7	150	34	667	3,45
8	120	30	667	3,45
9	150	30	1052	5,7
10	120	34	1052	5,7
11	150	34	667	5,7
12	120	30	667	5,7
13	150	34	1052	3,45
14	120	30	1052	3,45
15	150	30	667	3,45
16	120	90	667	3,45

2.20 Лиофильная сушка

Для сравнения вариантов высушивания также была проведена лиофильная сушка образцов на установке CoolSafe 55-4 (ScanVak, Дания).

Образцы предварительно замораживались в течение 12 часов при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего система вакуумировалась (30 Па). При сушке использовали следующие режимы подогрева полки: 12 часов полки не подогревали; 6 часов температура полки поддерживалась на уровне $5\text{ }^{\circ}\text{C}$; 6 часов – $10\text{ }^{\circ}\text{C}$; 6 часов – $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.21. Хранение биомассы

Хранение высушенных распылительной сушкой и лиофилизированных образцов осуществлялось при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в полностью заполненных стеклянных баночках, экранированных от света, с герметично завинчивающимися крышками. Полученные образцы хранились не менее 2 лет. В процессе хранения осуществлялся отбор проб непосредственно после высушивания, спустя 4, 6 и 12 месяцев с целью определения микробиологических и биохимических характеристик образцов.

2.22. Просвечивающая электронная микроскопия

Ультратонкие срезы и вирусные частицы исследовались на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100CX2 (JEOL, Japan) при ускоряющем напряжении 80 кВ (автор выражает благодарность ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН).

1.22.1. Приготовление ультратонких срезов высушенных клеток *Hbt. salinarum*.

Для приготовления ультратонких срезов высушенные образцы подрастворяли, клетки, вышедшие из кристаллов соли, в течение 1 часа при 4 °С фиксировали 2%-ным раствором глутарового альдегида в 0,05 М какодилатном буфере (рН 7,2), который содержал также, г/л: NaCl – 250, MgSO₄×7H₂O – 20, KCl – 3. Затем материал трижды промывали в 0,05 М какодилатном буфере (рН 7,2), который содержал также, г/л: NaCl – 250, MgSO₄×7H₂O – 20, KCl – 3 и дополнительно фиксировали 2%-ным раствором OsO₄ в том же буфере 4 часа при 18-20 °С. Обезвоженный материал в агаровых плиточках заливали эпоксидной смолой Epon 812. Срезы монтировали на сеточки для электронного микроскопа, контрастировали 30 минут 3%-ным раствором уранилацетата в 70%-ном этаноле и дополнительно контрастировали цитратом свинца [1233].

2.23. Сканирующая электронная микроскопия

Микроструктуру образцов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии на микроскопе JSM-6510LV (JEOL, Япония). Образцы крепили на столики с помощью токопроводящего двухстороннего углеродного скотча. Для снятия заряда с поверхности образцов их покрывали слоем платины толщиной 10 нм. Нанесение платины осуществляли на установке магнетронного напыления JFC-1600 (JEOL, Япония) при токе ионизации 30 мА и продолжительности нанесения 20 с. Изображения участков образцов получали при ускоряющем напряжении 15 кВ и различных увеличениях (автор выражает благодарность ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева).

2.24. Определение размеров частиц высушенных образцов

Средний гидродинамический радиус и распределение частиц по размерам определяли методом фотон-корреляционной спектроскопии на анализаторе Photocor Compact-Z (Photocor, Россия). Образцы диспергировали в 99,9%-ном изопропанолe (Panreac, Испания) при перемешивании на магнитной мешалке. В расчете распределения учитывались пять последовательных измерений.

1.21. Разработка нейросетевой модели

При разработке нейросетевой модели в качестве входных параметров (входных нейронов) задавались: 1 – температура сушильного агента на входе в камеру; 2 – расход сушильного агента; 3 – расход сжатого воздуха, подаваемого на двухпотокую форсунку; 4 – расход биосуспензии, подаваемой на сушилку; 5 – использовался ли при культивировании галоархей адсорбент (уровень «-1» соответствовал случаю, когда адсорбент не применялся; уровень «+1» – случаю, когда адсорбент применялся). Были рассмотрены нейронные сети с одним выходным нейроном, соответствующим концентрации каротиноидов в биомассе в какой-то один определенный период времени, и нейронные сети с тремя выходными нейронами, которые соответствовали концентрации каротиноидов в биомассе сразу после сушки, через 4, 6 месяцев и через год. Были взяты нейронные сети с одним и двумя скрытыми слоями. Основные характеристики выбранных нейронных сетей приведены в таблице 2.6.

Расчет количества весовых коэффициентов для сети с одним или двумя скрытыми слоями проводится согласно следующим соотношениям:

$$N = (N_{in} + 1) \cdot N_{HL1} + (N_{HL1} + 1) \cdot N_{out},$$

$$N = (N_{in} + 1) \cdot N_{HL1} + (N_{HL1} + 1) \cdot N_{HL2} + (N_{HL2} + 1) \cdot N_{out}.$$

Использованный в работе массив данных был разделен на обучающее множество и тестовую выборку, в которую вошли эксперименты №№ 4А, 10А,

3В, 6В (Таблица 3.5). Массивы данных предварительно шкалировались в диапазон значений от [-1,+1].

Одним из важнейших этапов работы модели на основе нейронной сети является обучение на выборке данных. В качестве алгоритма обучения использовался алгоритм обратного распространения ошибки, успешно применяющийся для многослойных перцептронов. В качестве функции активации нейронов использовался гиперболический тангенс.

Таблица 2.6. Основные характеристики рассмотренных нейронных сетей.

Количество нейронов на входе	Количество нейронов в скрытых слоях		Количество нейронов на выходе	Число весовых коэффициентов
	Скрытый слой 1	Скрытый слой 2		
5	1	3	1	16
	1	4		19
	2	3		25
	3	2		29
	1	-	3	12
	2	-		21
	1	2		19
	2	1		21
	2	2		27

Целью обучения сети при помощи алгоритма обратного распространения ошибки является такая подстройка ее весов, чтобы приложение некоторого множества входов приводило к требуемому множеству выходов. При обучении предполагается, что для каждого входного вектора существует парный ему целевой вектор, задающий требуемый выход. Вместе они называются обучающей парой.

Все приведенные в таблице 2.6 сети были обучены на обучающей выборке и протестированы на тестовой. Расчеты показали, что в случае использования сетей с одним выходным нейроном, такие сети не могут с одинаковой точностью предсказывать концентрацию каротиноидов в биомассе в разные моменты времени, т.е. для каждого из временных диапазонов необходимо использовать отдельную нейронную сеть, что неудобно. Поэтому для прогнозирования и оптимизации процесса была выбрана искусственная нейронная сеть с тремя нейронами в выходном слое, имеющая наименьшую ошибку, равную 0,953. Выбранная нейронная сеть имеет два скрытых слоя, первый из которых содержит 2 нейрона, второй – 1 нейрон. В сети использованы нейроны со смещением. Данная сеть схематично отражена на рисунке 2.11.

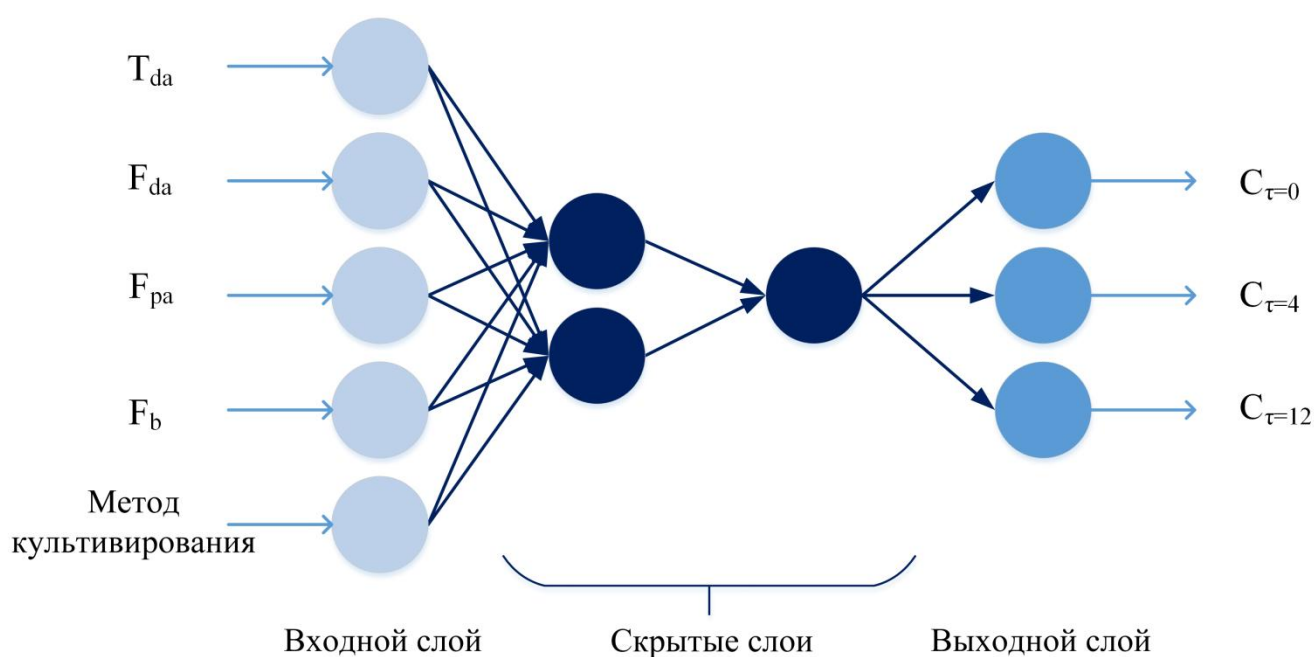


Рисунок 2.11. Выбранная нейронная сеть.

Нейронная сеть была использована для расчета неизвестных значений на всем диапазоне исследуемых параметров. Результаты расчета с применением пакета MatLab R2014a представлены для культивирования без (вариант А) и с (вариант В) адсорбентом (Приложение 2, Таблицы П2.1 и П2.2).

2. 25. Измерение ζ -потенциала

Измерение ζ -потенциала клеточной поверхности проводили с использованием Nano Submicron Particle Size Analyzer (Beckman Coulter Inc., США).

2.26. Определение таксономической принадлежности культур микроорганизмов

Выделение ДНК из биомассы микроорганизмов производили, используя технику Wizard (Promega, США) в сочетании с модифицированным методом Бирнбойма-Доли [1234]. В полученном препарате концентрация ДНК составляла 30–50 мкг/мл, РНК присутствовала в следовых количествах (<1%).

Универсальные праймерные системы (Univ11f-Univ1492r для бактерий и 8fa-1492r для архей; Евроген, Россия) были использованы для ПЦР и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК [1235, 1236]. Продукты ПЦР очищали электрофорезом в 1% агарозном геле с последующей экстракцией с помощью системы очистки ДНК Wizard PCR Preps (Promega, США), как описано в протоколе производителя.

ПЦР-фрагменты генов 16S рРНК секвенировали по методике Сэнгера с использованием набора реагентов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., США) на анализаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc., США) по стандартным инструкциям. от производителя. Анализ полученных последовательностей был произведен с использованием BLAST [1237].

Некоторые нуклеотидные последовательности занесены в GenBank, а также приведены в приложении 5.

2.27. Эксперименты с умеренными вирусами

Образцы из природных источников – гиперсоленых сред центрифугировали при 7300 об./мин. 15 мин. (центрифуга Eppendorf 5010R, Германия) для

осаждения клеток и отделения возможных свободных вирусных частиц. Супернатант, предположительно содержащий вирусы, инокулировали (10% об.) в колбу с культурой хозяином в экспоненциальной фазе роста.

Исследование оптимальных условий инфицирования и условий индукции вирусов проводилось для разных рН, температуры, фазы роста.

Инфицирование производилось в течение 24 часов непосредственно при глубинном культивировании в колбах, после чего образцы инфицированной культуры в серии разведений питательной средой без цитрата натрия высевались на твердую среду или в полужидкий агар по методу Грация [1238]. Таким образом определялся титр вируса и морфология негативных колоний (PFU/мл).

Для просвечивающей электронной микроскопии микробиологической петлёй отбирали материал негативной колонии, который ресуспендировали в малом объеме (15-50 мкл) базового солевого раствора без цитрата натрия, добавляли 2,5% глутарового альдегида, выдерживали 30 минут. В образец вносили 2% молибдата аммония, выдерживали 10-15 минут и наносили на сеточки для электронной микроскопии, где оставляли еще на 10 минут для адсорбции вирусных частиц. Далее поверхность промывали 3-5 раз нанося по 10-15 мкл дистиллированной воды, чтобы убирать избыток соли, после чего сеточки высушивали 15 часов.

2.28. ВЭЖХ образцов культуральной жидкости и экстрактов из адсорбентов

Для анализа образцов культуральной жидкости и экстрактов с адсорбентов использовался жидкостной хроматограф Agilent 1100 (Agilent, США) с диодной матрицей.

Экстракцию из адсорбентов производили смесью гексан/изопропанол (1:1). Колонка Kromasil 100 DMV (EKA Chemicals, Швеция), элюент гексан/изопропанол, расход: 1мл/мин, температура термостата: 20 °С, УФ детектирование на длинах волн 225, 254 и 270 нм.

Анализ культуральной жидкости проводили с использованием колонки Диасфер-110-С18 (4,6×250 мм, диаметр частиц 5 мкм) (ЗАО “БиоХимМак СТ”, Россия). Элюент 0,5% фосфорная кислота, расход: 1мл/мин, температура термостата: 20 °С, УФ детектирование на длинах волн 225, 254 и 270 нм.

2.29. Приготовление образцов цементного камня

Материалом для формования цементных образцов – балочек размером 1×1×3 см являлся портландцемент ЦЕМ I 42,5Н ГОСТ 31108–2003 производства "Подольскцемент". Для получения образцов цементного камня формовались образцы на основе портландцемента при В/Ц (водоцементное соотношение)=0,31. Твердение образцов проходило в воздушно-влажных условиях (22±2 °С и 100 % относительной влажности), испытания проводились на 7, 21 и 28 сутки. Испытание на прочность проводилось на машине ELE Auto со скоростью нагружения 0,15 МПа/с. Открытая пористость цементного камня определялась гравиметрическим методом с использованием керосина в качестве насыщающей жидкости. Коэффициент капиллярного водопоглощения оценивали стандартным методом как тангенс угла наклона на линейном участке зависимости $\Delta M = f(\tau)^{1/2}$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выбор и оптимизация питательных сред для промышленного использования при культивировании экстремально галофильных микроорганизмов

Экстремально галофильные археи *Halobacterium salinarum* являются признанным модельными микроорганизмами в разнообразных исследованиях, посвященных выживаемости в чрезвычайно изменчивых условиях своей среды обитания. Сезонные изменения влияют на высушивание, регидратацию, режим освещения, температуру поверхностей, иловой подложки и жидких сред, где присутствуют микроорганизмы. Все это влияет на ионный состав среды, доступность воды, композицию органики, которая зависит от состояния и метаболитов эндемичного сообщества, так и от привнесенных компонентов. Вспышки численности микроводорослей, сезонная миграция птиц могут кардинально менять соотношение биогенных элементов, состав органического субстрата, смещать сообщество в новое состояние [1239]. Феноменальное выживание некоторых галоархей и галобактерий в таких условиях объясняется отбором устойчивых субпопуляций, что, в свою очередь, определяется высокой частотой спонтанных мутаций, полиплоидностью, горизонтальным переносом генов, выработкой галоцинов, каротиноидов, функционированием фотосистемы, специфических ферментов и продуктов метаболизма, которые могут дать преимущество в сообществе микроорганизмов. Механизмы сохранения жизнеспособности клеток в кристаллах соли и последующего возобновления популяции являются многостадийными, т.к. происходит перестройка генетического аппарата и, в этой связи, также заслуживают внимания [64].

Склонность к спонтанным мутациям создает проблемы для устойчивого культивирования специализированных штаммов, особенно в вариантах непрерывного и высокоплотного культивирования. У многих штаммов *Hbt. salinarum* – продуцентов бактериородопсина чувствительность к изменению условий можно заметить по высевам на твердую питательную среду. В

нестабильных процессах, при чрезмерном освещении, перегревах, неоптимальной питательной среде в высевах наблюдается постепенное изменение соотношения сиреневых и красных колоний, переход к дикому типу. Иногда получаются и белые мутанты, что говорит об отсутствии синтеза пигментов. В глубинной культуре спонтанные мутации отражаются в уменьшении выхода бактериородопсина и увеличении синтеза каротиноидов клетками. Менее очевидны мутации, приводящие к изменению набора специфических энзиматических активностей или к появлению ауксотрофов. Такие изменения даже при наличии общего штамма-предшественника могут существенно влиять на потребности в компонентах питания у мутантов. Неоптимальные соотношения в компонентах питания (C:N:P, ростовых факторов и микроэлементов) вызывают очевидные изменения в метаболизме, некоторые компоненты могут способствовать синтезу ингибиторов, подвергаться трансформации самими микроорганизмами или абиотическими факторами. Вопросы, связанные с композициями питательных сред достаточно разобраны в общем плане, однако, штамм-специфичные требования практически не рассмотрены в литературе. Здесь следует также учитывать, что требования по питанию могут отличаться в периодическом и непрерывном режимах культивирования. В первом случае микроорганизмы проходят стадии развития, могут частично лизироваться и вырабатывают вторичные метаболиты. Непрерывные режимы фиксируют физиологическое состояние продуцента, но такие варианты оптимизации синтетических питательных сред в силу ряда причин редко рассматривают в литературе.

Сравнение состава синтетических и комплексных сред, а также природы метаболитов и продуктов трансформации в том и другом случае в процессе культивирования крайне важно для оптимизации состава комплексных питательных сред. Оптимизация полностью синтетических сред под конкретные штаммы-продуценты, выяснение минимальных требований по питанию и устранение избыточных, а, иногда, мешающих компонентов необходимо для разработки процесса культивирования промышленного масштаба.

3.1.1. Синтетические питательные среды для *Hbt. salinarum*, особенности субстратной специфичности разных штаммов

Основные работы, посвященные исследованию и разработкам синтетических сред для *Hbt. salinarum* датируются семидесятыми годами XX-го века [1167, 1168, 1121]. В них отражены общие требования по питанию без указания специфики выращиваемых штаммов – накопление биомассы было основным параметром оптимизации. В настоящее время для культивирования и поддержания культур экстремальных галофилов предпочитают комплексные среды, и переход к синтетическим может быть затруднен. Наблюдения показывают, что при пересевах в популяции отбираются наиболее приспособленные к используемой среде варианты, происходит своеобразный отбор. Прямой пересев колоний или рассев с глубинной культуры с комплексной на синтетическую среду в некоторых случаях невозможен. Использование достаточно богатой синтетической питательной среды с 18 аминокислотами (п. 2.6) при расеве *Hbt. salinarum* 353П (ВКПМ В-1739), ET-1001, D96N, КСК-03307 (ВКПМ В-10286) на агаризованную среду не приводило к существенному росту колоний или к росту оптической плотности в глубинной культуре. Некоторая активность культуры при первом засеве с комплексной среды объяснялась внесением компонентов исходной комплексной среды вместе с инокулятом и не проявлялась в дальнейшем при пересевах на синтетической. Примененная синтетическая среда использовалась в исследованиях *Onishi et al.* [1167] и с некоторыми модификациями *Мосиным et al.* [1240] для синтеза дейтерированного бактериородопсина. В последнем случае галоархеи, видимо, проходили цикл адаптации к дейтерированным аминокислотам, $^2\text{H}_2\text{O}$ и впоследствии показывали приемлемый рост. Адаптация штаммов галоархей в настоящей работе проводилась с использованием градиентного метода (п. 2.8.1). Последовательные пересевы – пассажи быстрорастущих колоний в такой системе позволили добиться значимого роста на агаризованной синтетической среде, а потом и в глубинной культуре для исследуемых штаммов за исключением КСК-03307.

На этапе предварительной оптимизации синтетической питательной среды был проведен скрининг лимитирования или ингибирования теми или иными компонентами на агаризованной среде и в глубинной культуре. Концентрации каждого из компонентов варьировались относительно исходных значений в 4, 3, 2, 1/2, 1/3, 1/5 раза, также компоненты полностью исключались из среды. Это было необходимо, в том числе, для уточнения пороговых значений (-1;+1) в плане Плакетта-Бермана. Оценивалась скорость роста колоний и накопление биомассы в глубинной культуре.

Установлена недостаточность питания по фосфору для всех тестируемых штаммов, особенно это было заметно по росту колоний при разных концентрациях KH_2PO_4 и K_2HPO_4 , и согласно рекомендациям *Grey* и *Fitt* [1168] концентрации были повышены в три раза. Влияние АМФ и УМФ на рост практически отсутствовало при достаточном количестве фосфора в среде, однако, отдельное исследование показало их роль и роль рибонуклеиновой кислоты до 0,35 г/л в среде (из дрожжей *Torula utilis*, более удобная и дешевая форма для использования в среде) в накоплении бактериородопсина и каротиноидов, а также в сохранении жизнеспособности культур. Фолиевая кислота, биотин, цианокобаламин важны на начальном этапе роста, что особенно видно на агаризованной среде, но не являются необходимыми компонентами, микроэлементы в составе солей находятся в среде в достаточной концентрации. Концентрация глицерина, который является дополнительным источником углерода, влияет на накопление биомассы, синтез каротиноидов и бактериородопсина, но по-разному для разных штаммов. Отсутствие ингибирования глицерином наблюдается вплоть до концентрации 4 мл/л среды у всех штаммов, при этом у каротиноидного штамма 353П концентрация 1 мл/л является оптимальной для синтеза каротиноидов, а 3 мл/л оптимальна для синтеза бактериородопсина у всех тестируемых штаммов на варианте исходной среды с повышенной концентрацией фосфатов и рибонуклеиновой кислотой.

Последовательное исключение компонентов из исходного варианта среды показало, что L-глицин, L-пролин, DL-серин, DL-треонин, KNO_3 не влияют на

накопление биомассы, синтез каротиноидов и бактериородопсина. DL-триптофан может даже отрицательно влиять на рост. DL-аспарагиновая кислота положительно влияет на накопление бактериородопсина, каротиноидов, но не биомассы у всех штаммов. Отсутствие в среде хотя бы в малых концентрациях одной из аминокислот: L-аргинина, L-глутамина, DL-изолейцина, L-лейцина, L-лизина, DL-метионина, DL-фенилаланина, L-тирозина, DL-валина ведет к полному отсутствию роста у рассматриваемых штаммов. В этом списке кроме 4-х незаменимых по *Onishi et al.* [1167] аминокислот: аргинина, лейцина, лизина, валина присутствуют еще 5 незаменимых для данных штаммов аминокислот.

Следует отметить, что штамм D96N далее не участвующий в оптимизации показывает схожие с ET-1001 отклики на производимые изменения в среде, у него можно отметить только сниженный относительно ET-1001 на 10-15% синтез бактериородопсина.

План Плакетта-Бермана использовался на следующем этапе оптимизации для выявления наиболее значимых аминокислот для накопления биомассы, каротиноидов и бактериородопсина.

Для накопления биомассы оказались значимы DL-аланин, L-аргинин, L-цистеин, L-глутаминовая кислота, DL-изолейцин, L-лейцин и DL-валин. Для накопления каротиноидов и бактериородопсина значимы DL-аланин, L-аргинин, DL-аспарагиновая кислота, L-цистеин, L-глутаминовая кислота, DL-гистидин, DL-изолейцин, L-лейцин, DL-метионин, DL-фенилаланин, L-тирозин, DL-валин. Для компонентов, оказывающих наибольшее влияние на переменные отклика, проводилась оптимизация с помощью метода Бокса-Уилсона. Таблица 3.1 демонстрирует все изменения, произведенные относительно среды, взятой за основу.

Среди аминокислот таблицы 3.1 наибольшие изменения по сравнению с базовой средой в абсолютных концентрациях коснулись аргинина и валина, а также глутаминовой и аспарагиновой кислот, которые положительно влияют на синтез каротиноидов и бактериородопсина. Особого внимания заслуживают изменения в концентрациях цистеина и метионина – мощных антиоксидантов,

которые вносят значимый вклад в накопление, в первую очередь, бактериородопсина. Ароматические аминокислоты – фенилаланин и тирозин необходимы для роста, но при длительном культивировании могут генерировать продукты фотоокисления [1241-1244], их оптимум для синтеза каротиноидов и бактериородопсина лежит ниже значений базовой среды.

Таблица 3.1. Оптимизированные среды для накопления биомассы (Б/м), каротиноидов (Кар.), бактериородопсина (БР) разных штаммов *Hbt. salinarum*.

№	Компоненты сред, г/л	В исходной среде, г/л	Компоненты оптимизированных сред для <i>Hbt. salinarum</i> , г/л			
			353П		ЕТ-1001	
			Б/м	Кар.	Б/м	БР
1	DL-аланин	0,43	0,33	0,37	0,27	0,35
2	L-аргинин	0,40	0,91	1,21	1,05	1,27
3	DL-аспарагиновая кислота	0,45	–	0,34	–	0,43
4	L-цистеин	0,05	0,07	0,14	0,10	0,15
5	L-глутаминовая кислота	1,3	1,08	2,80	1,20	2,91
6	L-глицин	0,06	–	–	–	–
7	DL-гистидин	0,30	0,30	0,44	0,30	0,53
8	DL-изолейцин	0,44	0,36	0,11	0,40	0,17
9	L-лейцин	0,8	0,66	0,39	0,53	0,31
10	L-лизин	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
11	DL-метионин	0,37	0,37	0,56	0,37	0,71
12	DL-фенилаланин	0,26	0,26	0,14	0,26	0,11
13	L-пролин	0,05	–	–	–	–
14	DL-серин	0,61	–	–	–	–
15	DL-треонин	0,50	–	–	–	–
16	L-тирозин	0,20	0,20	0,16	0,20	0,15
17	DL-триптофан	0,05	–	–	–	–
18	DL-валин	1,0	1,61	2,28	1,75	2,47
19	АМФ	0,1	–	–	–	–
20	УМФ	0,1	–	–	–	–

21	Рибонуклеиновая кислота	–	0,35	0,35	0,35	0,35
22	KNO ₃	0,1	–	–	–	–
23	KH ₂ PO ₄	0,05	0,15	0,15	0,15	0,15
24	K ₂ HPO ₄	0,05	0,15	0,15	0,15	0,15
25	Глицерин	1 мл/л	1 мл/л	1 мл/л	1 мл/л	3 мл/л
26	Биотин	1×10 ⁻⁴	*	*	*	*
27	Фолиевая кислота	1,5×10 ⁻⁴	*	*	*	*
28	Витамин B ₁₂	2×10 ⁻⁵	*	*	*	*

В наименовании столбцов указаны переменные отклика, оптимизация проводилась по накоплению: Б/м – биомассы, Кар. – каротиноидов, БР – бактериородопсина; * – компоненты не являются необходимыми.

Уже в работе *Gochbauer* и *Kushner* [1121] из состава среды была исключена ароматическая аминокислота – триптофан и причина этого не обсуждается в статьях далее. В настоящем исследовании было показано, что даже штамм дикого типа *Hbt. salinarum* 353П оказался чувствителен к концентрации триптофана 50 мг/л в базовой среде. Еще большей чувствительностью к триптофану обладал штамм ET-1001. Влияние продуктов фотоокисления ароматических аминокислот было проверено в условиях, аналогичных культивированию в колбах (500 Лк на уровне колб, 38,5 °С). Каждая из аминокислот – фенилаланин, тирозин, триптофан вносилась в минеральную основу синтетической среды, в концентрациях, предусмотренных базовой средой и на 7 суток без засева инокулята помещались на шейкер при освещении. После этого добавлялись оставшиеся компоненты базовой среды, и производился засев *Hbt. salinarum* 353П (10% v/v).

Во многих случаях с использованием в среде фотоокисленного триптофана галоархеи не росли вовсе или накапливали минимум биомассы – 5-10% от возможного уровня. Тирозин и фенилаланин менее чувствительны к фотоокислению, или же их фотопродукты оказались менее токсичны по отношению к галоархеям. Продукты фотоокисления тирозина приводили более к

индукции каротиноидов, некоторому ингибированию роста и существенному ингибированию синтеза бактериородопсина. Ароматические аминокислоты хорошо разделяются в простом варианте ВЭЖХ без дериватизации аминокислот, с элюентом – фосфорной кислотой и фиксируются детектором, настроенным на 254 нм. Была проведена серия опытов со штаммом 353П, который выращивался на варианте базовой синтетической среды без триптофана, но с тирозином и фенилаланином. Сравнение хроматограмм базовой “свежей” среды без засева (Рисунок 3.1), после 7 суток культивирования (Рисунок 3.2) и с фотоокисленным тирозином после 7 суток культивирования (Рисунок 3.3) показывает накопление фотопродуктов тирозина в диапазоне 5,2-6,9 минут [1245].

Эти же пики проявляются в опыте с фотоокисленным тирозином без засева культуры только в меньшей степени. Возможно, в среде с растущей культурой свободные радикалы образуются более интенсивно, и проходят процессы химического/фотохимического окисления, связанные не только с тирозином и фенилаланином.

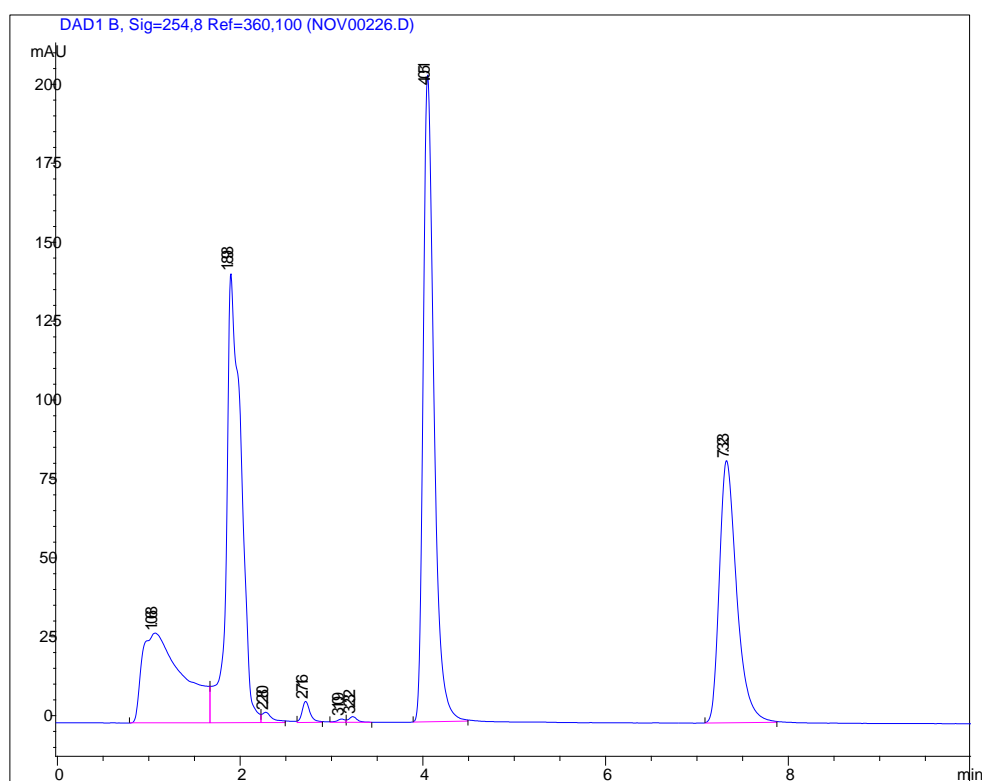


Рисунок 3.1. Свежеприготовленная синтетическая среда полного состава.

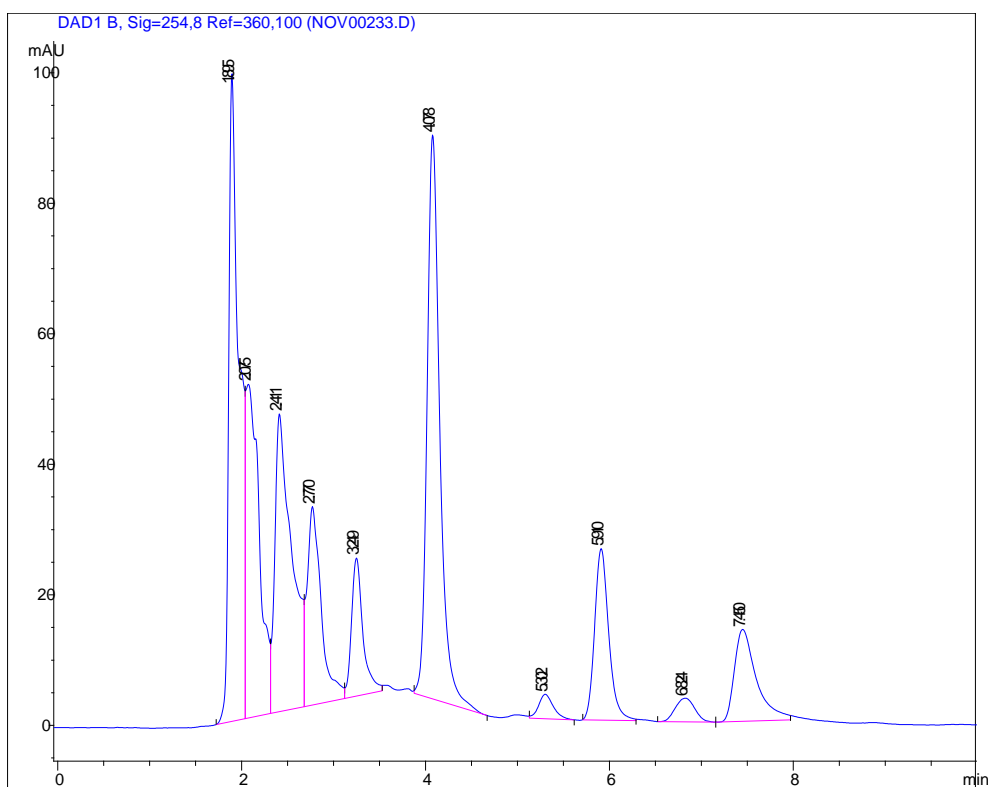


Рисунок 3.2. Культуральная жидкость на 7 день культивирования галоархей на синтетической среде.

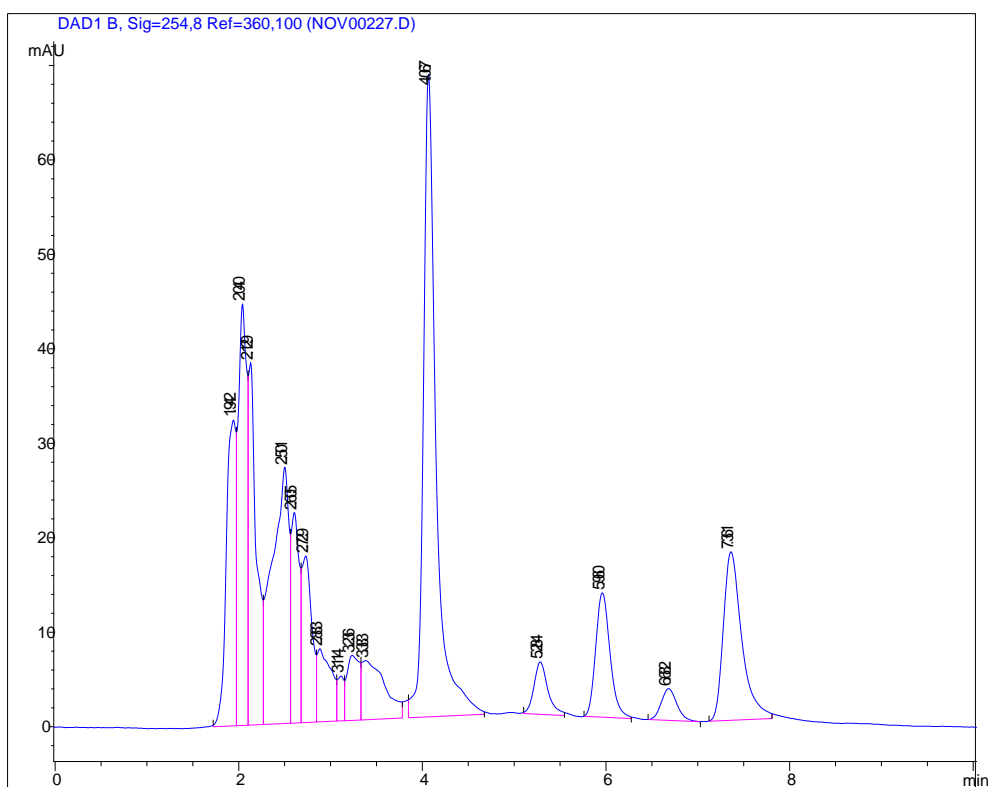


Рисунок 3.3. Культуральная жидкость на 7 день культивирования галоархей с предположительно частично окисленным тирозином.

Существенный вклад в нарушение сохранности среды вносит ее стерилизация паром, хотя это и не принималось во внимание *Onishi et al.* [1167], где стерилизация при 121 °С в течение 20 минут признана не влияющей на рост. Продукты химического/фотохимического окисления тирозина, как маркеры оксидативного воздействия, более явно проявляются в культуральной жидкости после культивирования и предварительной стерилизации среды даже при 115 °С в течение 10 минут, чем в среде после культивирования, предварительно подвергнутой стерилизации фильтрацией. Результаты культивирования в колбах для оптимизированных сред, подвергнутых предварительно стерилизующей фильтрации, представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 Влияние освещения на выработку каротиноидов, бактериородопсина и рост биомассы при культивировании на оптимизированных синтетических средах.

Вариант процесса	<i>Hbt. salinarum</i> 353П		<i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	
	Биомасса, г/л	Каротиноиды, мг/100 г АСБ	Биомасса, г/л	Бактериородопсин, мг/л
Базовая среда, освещение	2,1-2,3	16-17	1,05-1,2	8-11
Оптимизированная среда, в темноте	3,3-3,4	12-13	2,8-2,9	15-18
Оптимизированная среда, освещение	3,0-3,1	22-23	2,7-2,8	32-35

Опыты проводились как при освещении, так и в темноте, в том числе, для проверки влияния фотоокисления на компоненты оптимизированных сред. При незначительных отличиях в накоплении биомассы на свету и в темноте, за 7 суток при освещении на оптимизированных средах накапливается до 23 мг/100 г АСБ каротиноидов у штамма 353П и до 35 мг/л бактериородопсина у штамма ET-1001

при малой выработке каротиноидов (около 1 мг/100 г АСБ). Считая каротиноиды маркерами окислительного стресса можно с уверенностью говорить о нахождении золотой середины для штамма 353П между накоплением биомассы, не подверженной стрессу чрезмерно, и индукцией каротиноидов. Кроме этого, у штамма 353П накапливается до 15 мг/л бактериородопсина, хотя этот штамм и не считается хорошим его продуцентом, накапливая обычно 5-7 мг/л на комплексной среде. Повышение освещенности в 2-3 раза (1000-1500 Лк) не приводит к существенному увеличению накопления каротиноидов у штамма 353П – несколько падает содержание биомассы и до 5 мг/л содержание бактериородопсина. При таком повышенном освещении у штамма ET-1001 наблюдается снижение на 10-15% в накоплении биомассы, примерно на 1/3 снижается накопление бактериородопсина и повышается уровень накопления каротиноидов до 7-10 мг/100 г АСБ.

На основании наших данных, полученных в процессе оптимизации синтетической среды для разных штаммов *Hbt. salinarum* установлена степень влияния отдельных компонентов и роль продуктов фотохимического окисления в ростовых характеристиках и выработке целевых продуктов – каротиноидов и бактериородопсина. Особое внимание при разработке сред для галоархей необходимо уделить сохранности компонентов, как на стадии подготовки, так и на стадии культивирования. Для этого необходимо оптимизировать режимы и спектральные характеристики освещения, сократить время пребывания объема среды в реакторе (непрерывные методы культивирования), заменить стерилизацию среды острым паром фильтрующей стерилизацией.

Преимуществом разработанной синтетической среды, в отличие от комплексной, можно считать отсутствие посторонних примесей, контролируемый состав, что важно для выделения целевых продуктов и, особенно, бактериородопсина, т.к. белковые, липидные примеси комплексных сред усложняют его очистку до высокой степени чистоты. А бесспорным недостатком синтетических сред, в основе своей содержащих аминокислоты, является стоимость высокоочищенных аминокислот, т.к. аминокислоты кормового

качества для культивирования *Hbt. salinarum*, к сожалению, не подходят. К этому следует добавить, что некоторые штаммы обладают настолько специфическими потребностями в питании, что подобрать компоненты среды для них становится чрезвычайно затруднительно, и примером такого некультивируемого штамма на разработанной синтетической среде является КСК-03307 – сверхпродуцент бактериородопсина.

3.1.2. Комплексные питательные среды, особенности их компонентов и условий культивирования, влияющие на ростовые характеристики штаммов *Hbt. salinarum*, синтез бактериородопсина и каротиноидов

В немногочисленных статьях, посвященных культивированию *Hbt. salinarum*, основное внимание уделяется оптимизации состава среды культивирования с помощью методов математического планирования с целью повышения выхода целевых продуктов (главным образом, специфических ферментов и бактериородопсина) [1185, 1174, 1191]. Найденные таким образом композиции сред содержат глицерин, комплексные источники аминокислот (триптон, казеиновые кислоты, пептон, желатин), необходимые для роста галоархей, и ростовых факторов (мясной экстракт, дрожжевой экстракт) в концентрациях, согласующихся с потребностями различных штаммов. Галоархеи нуждаются в ионах микроэлементов: Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} и др., как кофакторах некоторых их специфических ферментных систем. Микроэлементы вносятся в среду в виде солей [1246, 1167, 619, 1247], однако основную потребность в микроэлементах обеспечивают, скорее всего, источники ростовых факторов. Иногда в среду культивирования вносят дополнительные компоненты: крахмал, бентонит, видимо, с целью связывания токсичных примесей, например, желчных солей в бакто-пептоне [3]. В других случаях применение в средах растворимого крахмала или кукурузной муки также приводит к положительным эффектам [1185, 1174]. Эти эффекты могут быть обусловлены прямым связыванием крахмалом, кукурузной мукой или бентонитом ингибиторов роста галобактерий

и/или вырабатываемых ими метаболитов. Устранение влияния подобных ингибиторов, присутствующих в комплексных источниках углерода и азота, возможно при использовании синтетических сред [1167, 1247], что не избавляет, тем не менее, от действия накапливаемых внеклеточных метаболитов. Неудовлетворительный рост некоторых штаммов *Hbt. salinarum* на синтетических средах, особенности стерилизации и высокая стоимость качественных компонентов питательных сред – источников аминокислот и витаминов, обуславливают маловероятность применения синтетических композиций в производственных масштабах.

3.1.2.1. Коммерческие препараты – компоненты комплексных питательных сред для *Hbt. salinarum*.

В данной работе была проведена серия стандартных экспериментов по подбору питательных компонентов комплексных питательных сред, условий аэрации и освещения для культивирования сверхпродуцента бактериородопсина КСК-03307 (ВКПМ В-10286) и штамма дикого типа – 353П (ВКПМ В-1739), в основном производящем каротиноиды.

Следует отметить, что галоархеи имеют высокую чувствительность к составу и качеству комплексной питательной среды, особенно органических компонентов – пептона или триптона. Технология производства этих составляющих среды от разных производителей, коммерческих препаратов разной ценовой категории может существенно варьироваться. О влиянии примесей в пептоне, в частности желчных кислот, на рост галоархей и других микроорганизмов упоминалось ранее. Еще более значимыми могут быть технологические операции с полупродуктами триптона/пептона, связанные с тепловой обработкой в воздушной атмосфере и окончательное высушивание. Определенное влияние компонентов комплексной среды от разных производителей было замечено ранее, исходя из наблюдения за ростом колоний на чашках Петри в присутствии и отсутствии активированного угля,

адсорбирующего ингибиторы. Поэтому, прежде всего, важно было проверить способность к росту штаммов галоархей и накопление ими бактериородопсина и каротиноидов на средах с различными коммерческими марками триптонов, пептонов и дрожжевых экстрактов.

На рисунке 3.4 представлена динамика накопления биомассы и синтеза бактериородопсина наиболее чувствительным к компонентам среды штаммом КСК-03307 для нескольких характерных композиций жидких питательных сред в колбах.

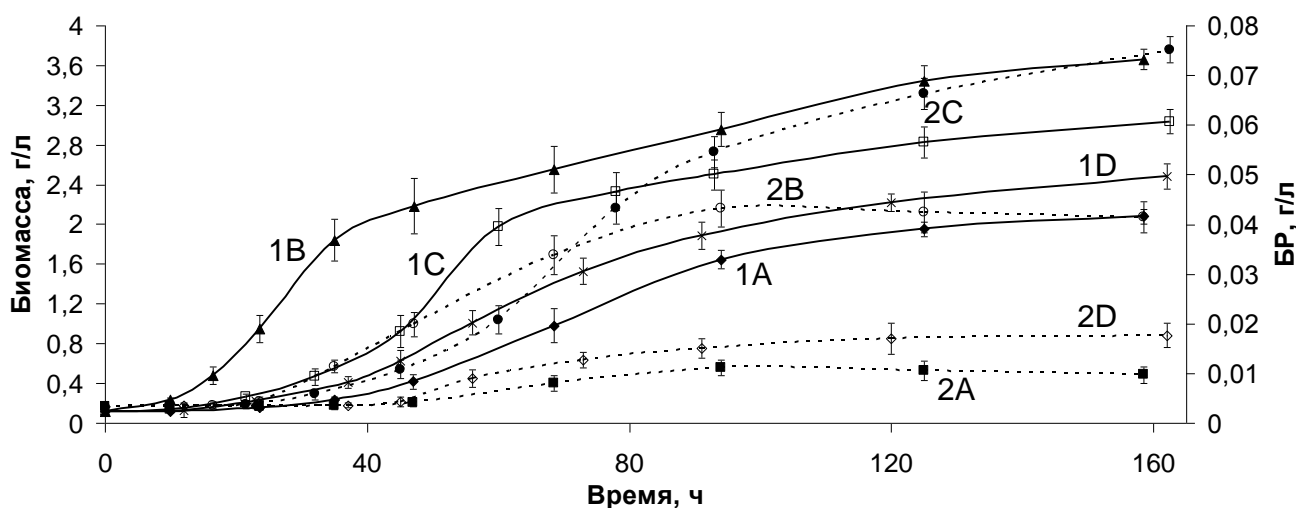


Рисунок 3.4. Накопление биомассы (1) и БР (2) штаммом КСК-03307 на среде с различным содержанием органических компонентов: (А) – 5,5 г/л дрожжевого экстракта (Organotechnie), 4 мл/л глицерина; (В) – 5 г/л триптона (Hispanlab), 2 г/л дрожжевого экстракта (Organotechnie), 4 мл/л глицерина; (С) – 5 г/л триптона (Serva), 2 г/л дрожжевого экстракта (Organotechnie), 4 мл/л глицерина; D – 5 г/л пептона (Difco), 2 г/л дрожжевого экстракта (Organotechnie), 4 мл/л глицерина¹.

Среды, содержащие 5 г/л триптона или пептона, 2 г/л дрожжевого экстракта и 4 мл/л глицерина, оказались наиболее предпочтительны для синтеза БР. Однако

¹ Марки компонентов питательной среды представлены без артикулов, изложение не преследует своей целью рекламу или антирекламу.

рост галоархей и синтез БР сильно зависели от марки используемых триптона или пептона. Перспективным среди рассмотренных оказался триптон фирмы Serva (Рисунок 3.4, вариант С), на среде с которым конечный уровень биомассы составил 3,04 г/л, максимальная удельная скорость роста – 0,054 ч⁻¹, максимальное накопление БР – 75 мг/л. На среде с триптоном Hispanlab выход биомассы был выше – 3,7 г/л, максимальная удельная скорость роста – 0,1 ч⁻¹, но накопление БР меньше – 43–44 мг/л. При использовании пептонов некоторых производителей у штамма КСК-03307 рост мог полностью подавляться. В то же время на среде с пептоном Difco (Рисунок 3.4, вариант D) биомасса накапливалась до 2,5 г/л, содержание БР доходило до 18 мг/л, а на среде с пептоном Costantino результаты культивирования были сравнимы с результатами культивирования на триптоне Serva.

Использование разных марок дрожжевых экстрактов (Hispanlab, Organotechnie, Difco) на рост галоархей существенно не влияло. Ростовые характеристики штамма ET-1001 на тех же питательных средах были аналогичны, однако накопление им БР составило лишь 55–60% от уровня штамма КСК-03307.

Как видно из рисунка 3.4, после достижения уровня накопления биомассы 1,9–2,1 г/л наступает стадия ее линейного роста, что обусловлено дефицитом в обеспечении среды кислородом в условиях культивирования в колбах. Однако такое лимитирование кислородом благоприятно для синтеза БР, но до определенного момента, после которого на некоторых средах может наблюдаться падение содержания БР (Рисунок 3.4, варианты А, В).

Качественные изменения в направленности биосинтеза хорошо прослеживались по спектрам лизатов. После 96–100 ч культивирования в спектрах начинали проявляться пики каротиноидов (λ 480–550 нм) (Рисунок 3.5). Пики были тем более выражены, чем дольше проводилось культивирование. Штамм КСК-03307 на 162 ч накапливал до 75 мг/л БР, а на 210 ч его содержание снижалось до 50–55 мг/л. При использовании триптона Hispanlab еще более выраженные пики каротиноидов проявлялись уже на 158 ч культивирования. Содержание БР к этому времени составляло 44 мг/л, а на 210 ч падало до 38 мг/л.

При использовании среды с дрожжевым экстрактом, но без триптона или пептона, пики каротиноидов проявлялись еще раньше.

Штаммы 353П и 353П-1 – продуценты каротиноидов менее чувствительны к качеству компонентов питательной среды, чем КСК-03307, их удельная скорость роста могла достигать $0,1 \text{ ч}^{-1}$, а лимитирование по кислороду наступало позже. В условиях, аналогичных опытам со штаммом КСК-03307, приведенным на рисунке 3.4, накопление биомассы и каротиноидов у штамма 353П при культивировании в 100 мл колбах с 50%-ным заполнением на среде с 5 г/л триптона Serva, 2 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie и 1 мл/л глицерина достигало 3,6 г/л и 25-33 мг/100 г АСБ соответственно, в этих условиях накапливалось также до 5-7 мг/л БР.

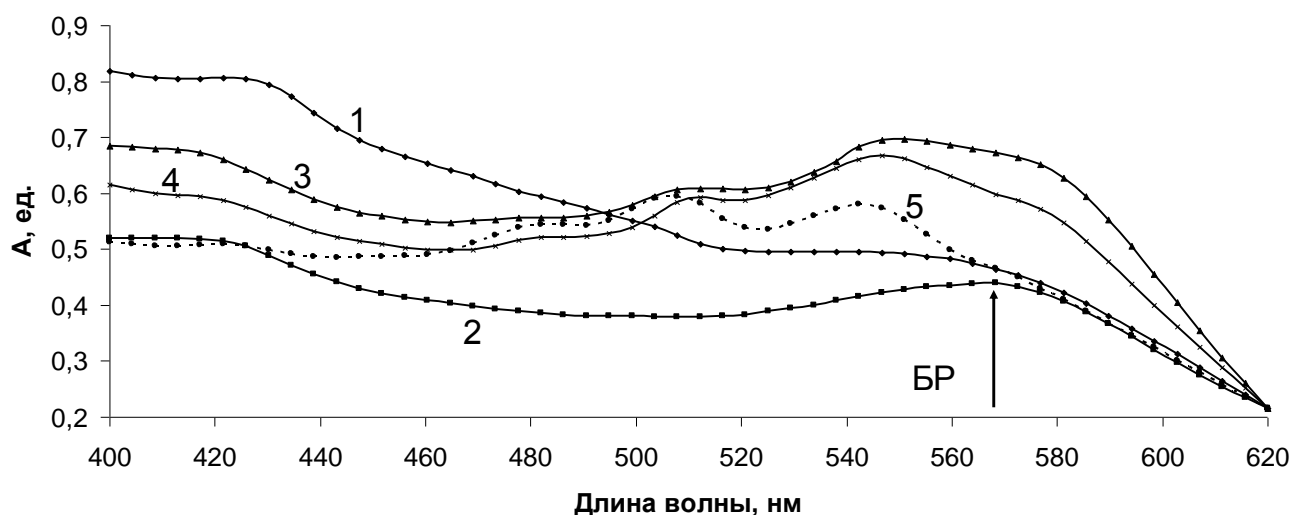


Рисунок 3.5. Изменения в спектрах лизатов при культивировании штамма КСК-03307. (1-4) – среда с триптоном Serva, 5 – среда с триптоном Hispanlab. Время культивирования: (1) – 45 ч; (2) – 93 ч; (3) – 162 ч; (4) – 210 ч, (5) – 158 ч.

3.1.2.2. Условия аэрации и освещения при культивировании *Hbt. salinarum*

С целью выявления значимости условий аэрации и освещения на рост БР-продуцирующего штамма КСК-03307 были проведены эксперименты в колбах и в ферментере в режиме периодического культивирования.

При культивировании в колбах при разном уровне их заполнения питательной средой максимальный выход БР составил 75 мг/л (Рисунок 3.4) при заполнении 1/2 объема колбы (100 мл). При увеличении объема среды длительность роста культуры возрастала, одновременно уменьшался и выход БР. Напротив, при снижении объема среды до 1/3 объема колбы лимитирование роста по кислороду не наблюдалось, биомасса быстро накапливалась, одновременно синтезировалось повышенное количество каротиноидов (до 5 мг каротиноидов/100 г биомассы) при меньшем содержании БР (40 мг/л).

Несколько неожиданным оказалось большее накопление биомассы в темноте по сравнению с ростом на свету. Такие результаты подтверждают высказанное предположение о повышенном образовании ингибиторов роста и биосинтеза при освещении, возможно, вследствие образования продуктов химического окисления компонентов среды или метаболитов, отрицательно влияющих на рост галоархей.

В периодических процессах в ферментере с удельной вводимой мощностью освещения на единицу объема 15-20 мВт/л существенного понижения скорости прироста биомассы не наблюдалось при уменьшении уровня содержания растворенного кислорода вплоть до 5% от насыщения. Повышение уровня освещения до 70 мВт/л приводило к увеличению выхода БР, дальнейшее увеличение вводимой мощности освещения усиливало синтез каротиноидов. В случае высоких уровней растворенного кислорода (30% и выше) удельное содержание БР в биомассе ожидаемо падало при одновременном увеличении выхода биомассы и содержания каротиноидов.

Таким образом, синтезу БР штаммом КСК-03307 без существенного образования каротиноидов, как и для других штаммов, способствуют низкие концентрации растворенного кислорода и оптимальный уровень освещения, в процессе культивирования важно контролировать процессы химических и/или фотохимических трансформаций в ферментационной среде.

В этой связи, для штаммов–продуцентов каротиноидов 353П и 353П-1 важны не только уровни накопления биомассы и каротиноидов, которые при отсутствии лимитирования (1/3 объема заполнения колб средой), даже некоторого избытка кислорода в течение всего культивирования могли достигать 4,6 г/л и 42 мг/100 г АСБ соответственно, но и сохранность компонентов биомассы при хранении. Чрезмерный стресс приводил после культивирования к быстрому отмиранию части клеток и "обесцвечиванию каротиноидов" до среднего уровня 12-15 мг/100 г АСБ с дальнейшей медленной деградацией, что наблюдалось также после отмывки от компонентов среды и лиофильного высушивания таких образцов. Хороших результатов по сохранности биомассы и каротиноидов удавалось достичь как раз при 50%-ном заполнении колб средой, когда лимитирование наступало у рассматриваемых штаммов при накоплении биомассы 80-90% от максимального. При культивировании в биореакторе в периодическом режиме, когда концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне 15-20% в режиме индукции каротиноидов, большое влияние имела вводимая мощность освещения, которую можно было увеличивать в процессе культивирования до 210 мВт/л без существенного повреждения биомассы и каротиноидов при дальнейшем хранении. Поддержание уровня аэрации выше 50%, вводимой мощности освещения выше предельной, особенно на завершающем этапе культивирования, приводило в дальнейшем при хранении к быстрой деградации каротиноидов.

Это также косвенно свидетельствовало в пользу предположения о процессах химических и/или фотохимических превращений в культуральной жидкости и в клетках, особенно интенсивных при высокой концентрации растворенного кислорода и освещении.

3.1.2.3. “Старение” комплексной питательной среды экстремально галофильных микроорганизмов

Предположение о неблагоприятном влиянии продуктов химической и фотохимической трансформации подтвердилось в ходе исследований эффекта “старения” питательной среды. Это определение описывает всю сумму процессов, которые в частном случае исследованы в синтетической среде на примере ароматических аминокислот. При культивировании в комплексной питательной среде с триптоном Serva, которая хранилась при комнатной температуре, а также при дневном освещении в течение 2-х суток, наблюдалось уменьшение как накопления БР, так и ухудшение роста наиболее чувствительного штамма галоархей КСК-03307.

В данном случае ингибиторы биосинтеза могли образовываться непосредственно из компонентов питательной среды, как при ее длительном хранении, так и в ходе культивирования. Такое “старение” может быть обусловлено протеканием процессов окисления с образованием свободных радикалов и перекисных соединений в качестве интермедиатов [1126, 1248]. Аналогичные, но более интенсивные процессы старения среды могут протекать, очевидно, и в ходе культивирования галоархей (5–7 суток роста при освещении, температуре 37–39 °С и аэрации). Известно, что такие соединения как липиды, которые могут входить в состав примесей используемых органических субстратов или экскретироваться, могут подвергаться перекисному окислению [624]. Аминокислоты, нуклеиновые кислоты и другие соединения также становятся мишенью активных форм кислорода [1249]. Образовавшиеся продукты окисления могут оказывать токсическое действие на клетки, вызывать в них состояние окислительного стресса и индуцировать синтез веществ-антиоксидантов, участвующих в ответе бактерий на стресс-факторы. В частности, у галоархей такими антиоксидантами являются каротиноиды, которые при лизисе клеток и последующей деградации образуют токсичные продукты [624, 653]. Перекисно

окисленные мембранные липиды галоархей после лизиса части клеток могут только усугубить ситуацию.

С целью выяснения роли старения среды провели специальные эксперименты, в которых стерильную среду выдерживали в колбах на качалке без засева 2, 4, 6 суток при аэрации и освещении, после чего вносили инокулят штамма КСК-03307 (Рисунок 3.6).

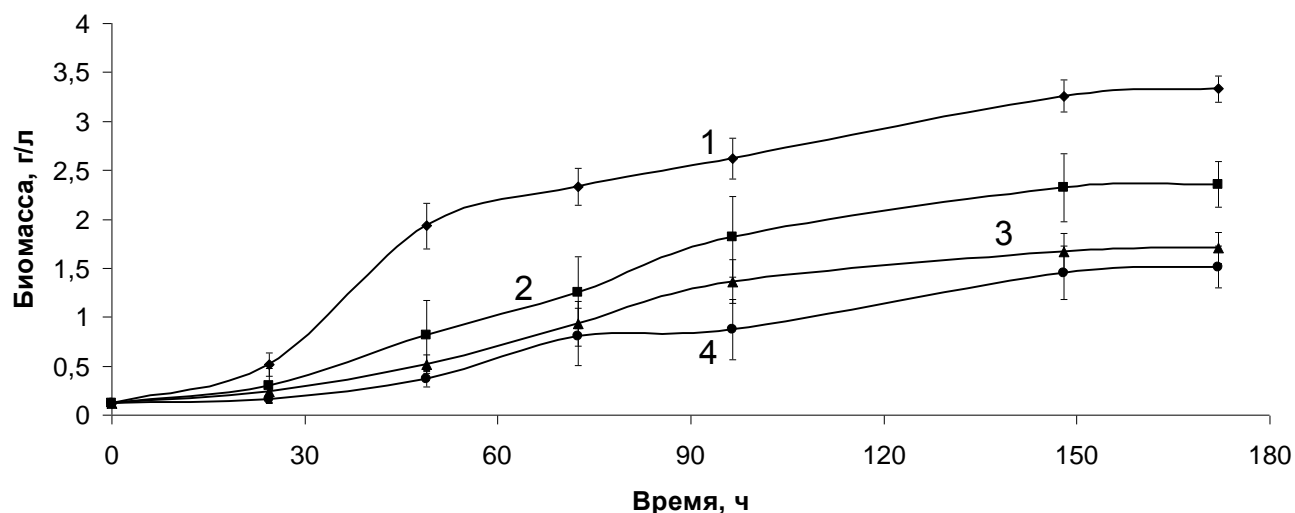


Рисунок 3.6. Влияние состояния питательной среды на накопление биомассы штамма КСК-03307, инокулят вносили в: (1) – свежеприготовленную среду, (2) – после 2-х суток аэрации и освещения, (3) – после 4-х суток аэрации и освещения и (4) – после 6-ти суток аэрации и освещения.

Как видно из представленных данных, уровень накопления биомассы закономерно снижался по мере “старения”, ухудшения качества среды перед засевом. К концу культивирования на шестисуточной среде накопление биомассы составило лишь около 50% по сравнению с использованием свежеприготовленной среды. Содержание БР после 160 часов культивирования галоархей составило 72, 37, 22 и 14 мг/л для свежеприготовленной, двухсуточной, четырехсуточной и шестисуточной питательной сред соответственно.

Таким образом, в питательной среде протекают процессы химического или фотохимического окисления ее компонентов, приводящие к ингибированию роста галоархей, синтеза ими БР и индукции синтеза каротиноидов, что определяется по

более раннему проявлению пиков каротиноидов в спектрах лизатов биомассы. Можно предположить, что продукты окисления участвуют в регуляции синтеза каротиноидов и БР, стимулируя синтез каротиноидов и репрессируя синтез БР.

3.1.2.4. Культивирование *Hbt. salinarum* с внесением отработанной культуральной жидкости (режим рецикла среды)

Накопление окисленных продуктов – ингибиторов роста и биосинтеза БР является важной, но, по-видимому, не единственной причиной ингибирования биосинтеза. Другим фактором может являться накопление метаболитов, ингибирующих биосинтез, что характерно для микробиологических процессов. На рисунках 3.7, 3.8 представлены результаты опытов с внесением отработанной культуральной жидкости (ОКЖ) в питательную среду. ОКЖ – супернатант, полученный отделением клеток галоархей от культуральной жидкости центрифугированием, после семи суток культивирования в колбах с освещением.

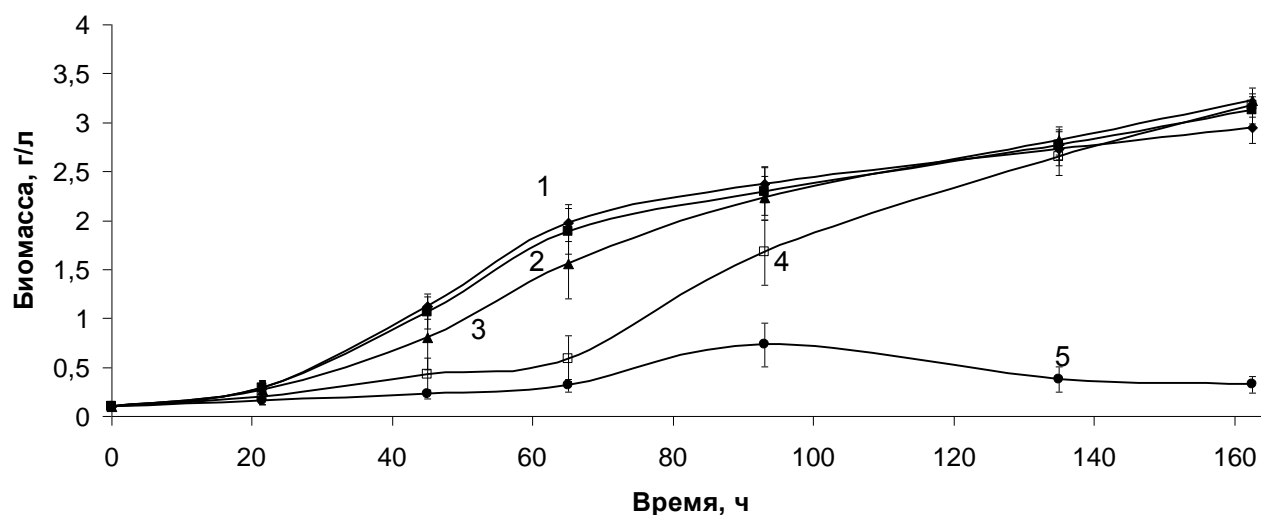


Рисунок 3.7. Динамика накопления биомассы штамма KSK-03307 при внесении отработанной культуральной жидкости в питательную среду: (1) – контроль, без внесения ОКЖ, (2) – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, (3) – 2/5 объема, (4) – 3/5 объема, (5) – 4/5 объема. Во всех вариантах в среды с добавлением ОКЖ вносилось такое же количество органических компонентов исходной питательной среды, как и в контроле.

Существенное замедление роста наблюдается, когда содержание ОКЖ в исходной питательной среде составляет больше половины общего объема среды (Рисунок 3.7). Падение уровня накопления БР заметно уже при внесении ОКЖ в объеме 1/5 от общего объема питательной среды. Спектры лизатов клеток в этих вариантах демонстрируют, что с увеличением доли внесенной ОКЖ увеличивается содержание каротиноидов по отношению к содержанию БР (Рисунок 3.8).

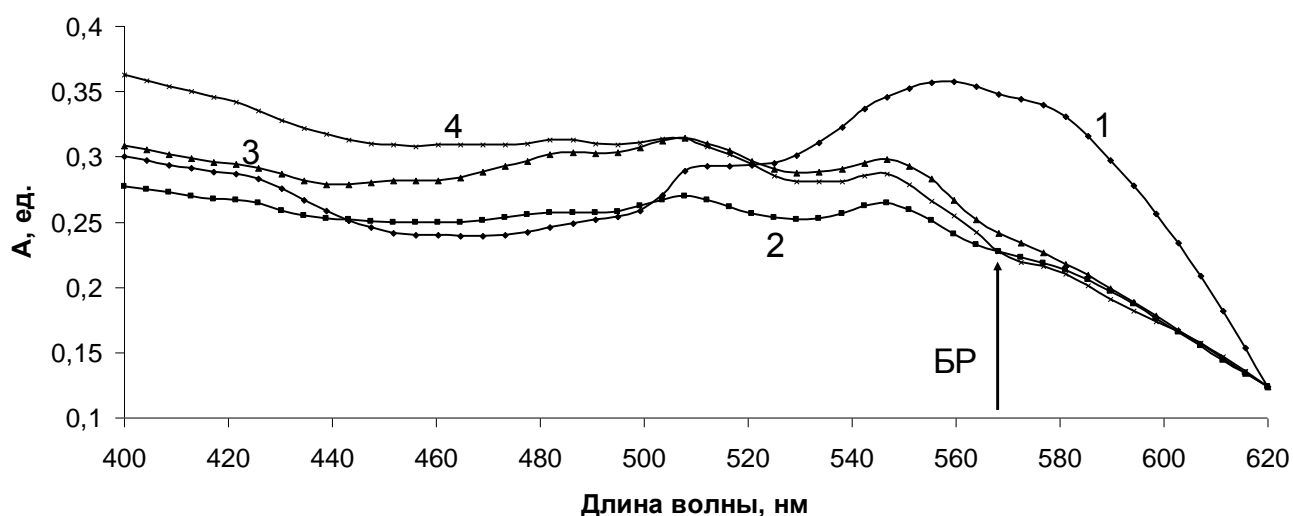


Рисунок 3.8. Спектры лизатов биомассы штамма КСК-03307 при культивировании с внесением отработанной культуральной жидкости в питательную среду: 1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема, 5 – 4/5 объема.

Конечно, в такой постановке опыта трудно однозначно разделить влияние продуктов трансформации и химического/фотохимического окисления компонентов среды от влияния метаболитов и результаты опыта являются суммарной мерой оценки токсического воздействия. Разница в подавлении роста между фотоокисленной средой и ОКЖ в том, что с внесением значимых количеств ОКЖ увеличивается продолжительность лаг-фазы, за которой следует взрывной рост, сопровождаемый усиленным синтезом каротиноидов. При всем

этом не происходит замещение исходного штамма диким типом, что подтверждается пересевами на агаризованную среду или в глубинную культуру со свежеприготовленной питательной средой. Менее чувствительный штамм дикого типа 353П способен расти на среде, приготовленной полностью на ОКЖ. В этом случае наблюдалась длительная – до 2-х суток лаг-фаза, а после периода роста – лизис клеток. Биомасса после такого культивирования непригодна для хранения, т.к. происходит быстрая деградация каротиноидов.

В ряде микробиологических производств предпринимались попытки заместить часть среды ОКЖ для уменьшения количества стоков. К сожалению, наши данные указывают на то, что для производства и БР и каротиноидсодержащей биомассы галоархей такой подход нецелесообразен.

3.2. Разработка способов культивирования *Hbt. salinarum* в условиях контролируемого окислительного стресса

Результаты вышеописанных экспериментов свидетельствуют о важной роли процессов химической и фотохимической трансформации компонентов среды культивирования в протекании биосинтеза. Поскольку подобная трансформация – это, как правило, процессы окисления с образованием продуктов, оказывающих стрессовое воздействие на клетки, то набор подходов к культивированию с их контролем и управлением был назван “контролируемым окислительным стрессом”.

Основываясь на полученных данных о негативном воздействии ингибиторов биосинтеза, образующихся по ходу культивирования галоархей в результате абиотических и биотических процессов, как варианты контролируемого окислительного стресса были апробированы методы культивирования, уменьшающие или полностью устраняющие отрицательные воздействия стресса:

1) подготовка посевного материала с целью уменьшения степени подавления роста галоархей и синтеза БР продуктами, содержащимися в посевном материале;

2) культивирование в режимах разбавления: доливном режиме (в режиме долива свежеприготовленной средой), непрерывном режиме (с протоком свежеприготовленной среды);

3) культивирование с контролем растворенного кислорода на возможно низком уровне для уменьшения количества ингибиторов, образующихся при окислении органических компонентов питательной среды;

4) извлечение ингибиторов биосинтеза сорбентом в процессе роста и культивирование в мембранном биореакторе;

5) оптимизация условий освещения (стимулирование роста, выработки БР при одновременном уменьшении фотохимического воздействия на среду);

6) внесение антиоксидантов.

3.2.1. Подготовка посевного материала при культивировании экстремально галофильных микроорганизмов

Клетки галоархей, выращиваемые в качестве посевного материала, подвергаются воздействию продуктов химического или фотохимического окисления компонентов питательной среды. В результате в таких клетках индуцирован определенный уровень синтеза каротиноидов и, в определенной мере, репрессирован синтез БР, что важно для штаммов-продуцентов БР.

Учитывая стимулирующее влияние продуктов окисления на синтез каротиноидов и появление оранжевых клонов в той или иной мере для разных штаммов, а также тот факт, что такие продукты могут поглощаться из питательной среды добавляемыми сорбентами, в частности, активированным углем, целенаправленно были проведены эксперименты с выращиванием и предобработкой посевного материала с добавлением адсорбентов в среду культивирования.

Серия экспериментов с активированными углями разных марок и ионообменными смолами, которые также являются адсорбентами на основе сверхсшитых полимерных материалов позволила выбрать активированный уголь АГ-3 (АО “Сорбент”) и адсорбент Hypersol-Macronet MN500 (Purolite, USA), функциональная группа которого представлена сульфоновой кислотой (п. 2.9.1).

Выбранные адсорбенты подходят для эффективной сорбции высокомолекулярных органических веществ с положительным зарядом и липофильными свойствами, их преимуществом является способность к многократной регенерации, возможность стерилизации совместно с питательной средой и устойчивость во время культивирования.

Культивирование галоархей с внесением адсорбентов повышало выход биомассы до $5,15 \pm 0,3$ г/л, выход БР – до 125 ± 5 мг/л и μ_{\max} до $0,092$ ч⁻¹ для штамма КСК-03307.

Очевидно, в присутствии адсорбента в среде проходят процессы многокомпонентной адсорбции-десорбции: большая часть компонентов среды адсорбируется, в жидкой фазе остается около 10-15 % органических веществ в течение всего процесса культивирования, что подтверждается анализом общего азота и ХПК. Потребление компонентов из жидкой фазы клетками галоархей смещает равновесие в сторону десорбции. Метаболиты и продукты окисления накапливаются в адсорбенте, их равновесная концентрация в жидкой фазе не мешает существенно росту галоархей.

Важно, что при использовании адсорбентов в спектре лизата биомассы галобактерий практически отсутствуют пики каротиноидов и проявляется только ярко выраженный пик БР, что в дальнейшем позволяет существенно облегчить выделение БР из биомассы, очистку от каротиноидов и обеспечить получение относительно недорогих препаратов БР.

Полученный таким образом посевной материал использовался для экспериментов в биореакторе, а при хранении с адсорбентом сохранял жизнеспособность длительное время при комнатной температуре, освещении и при высыхании – внедрении клеток в солевой кристалл (Рисунок 3.9). К

настоящему моменту срок хранения подобных кристаллов с жизнеспособными клетками достигает 15 лет.

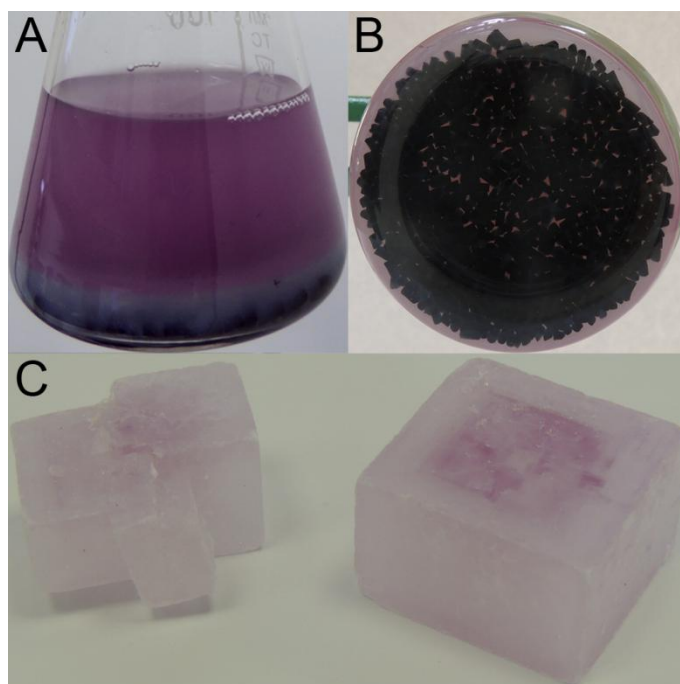


Рисунок 3.9. (А и В) Приготовление инокулята с использованием активированного угля АГ-3, инкапсулированного в агаре; (С) Кристаллы соли с инкапсулированными галоархеями, полученные при естественном высушивании суспензии клеток, полученной после культивирования с активированным углем.

3.2.2. Культивирование *Hbt. salinarum* в доливном и хеостатном режимах

В доливном режиме в биореактор со свежеприготовленной питательной средой вносили инокулят (штамм КСК-03307), подготовленный с применением инкапсулированного активированного угля. После суток культивирования в реактор добавили такой же объем свежеприготовленной простерилизованной питательной среды (Рисунок 3.10) Далее среду доливали такими же порциями каждые сутки. В этом режиме содержание кислорода в жидкости поддерживалось на уровне 5–10% от насыщения.

По ходу культивирования в таком режиме наблюдалось постепенное снижение скорости роста с $\mu_{\text{сред.}} 0,054 \text{ ч}^{-1}$ перед первым доливом до $0,049 \text{ ч}^{-1}$ после 1-го долива и до $0,025 \text{ ч}^{-1}$ после 2-го. Третий долив привел к еще большему замедлению роста, после 4-го содержание клеток начинало снижаться. В накоплении БР прослеживались те же тенденции, что и в накоплении биомассы. В целом, результаты культивирования показали, что доливной режим приводит лишь к относительно небольшому повышению накопления биомассы и БР. Максимальный уровень накопления БР наблюдается лишь ограниченное время на третьей сутки после 2-го долива и составляет 90 мг/л . По сравнению с вариантом культивирования в периодических условиях при том же режиме аэрации галоархеи накапливают больше биомассы, с большим экономическим коэффициентом выхода от субстрата.

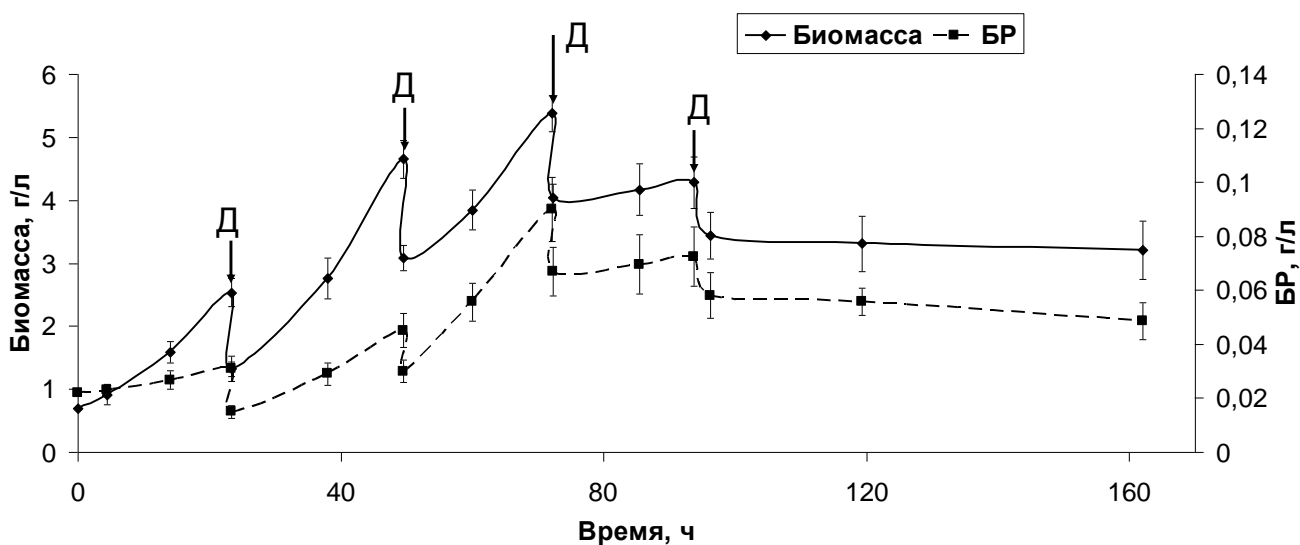


Рисунок 3.10. Культивирование в доливном режиме. Д — долив свежеприготовленной питательной среды.

Для реализации хемостата биомассу (КСК-03307) сначала накапливали до 2-2,5 г/л в периодике, после чего включали проток питательной среды через биореактор перистальтическим насосом, степень разбавления постепенно доводили до $D=0,025 \text{ ч}^{-1}$, содержание растворенного кислорода поддерживали на уровне 5% от равновесного, параметры фиксировали в установившемся

состоянии. Процесс проводили в течение 3-х недель при колебаниях в уровне биомассы в пределах 3,5-4 г/л, бактериородопсина – 70-90 мг/л. Трудностью проведения процесса в лимите по кислороду, который способствует синтезу БР, является невозможность прямой оценки уровня лимитирования. Именно поэтому культивирование проводили на грани лимита по кислороду по показаниям датчика. При культивировании использовались светодиодные прожекторы со светодиодной матрицей голубого света (λ 465 нм), вводимая мощность освещения 140 мВт/л.

Проведение хемостата с *Hbt. salinarum* 353П – продуцентом каротиноидов начиналось с накопления в периодике 3 г/л биомассы и включения протока, который доводили до $D=0,035 \text{ ч}^{-1}$, при содержании растворенного кислорода 15-20% и вводимой мощности освещения 210 мВт/л прожекторами со светодиодными матрицами голубого (λ 465 нм) и белого света (распределение вводимой мощности 50/50). Такой режим освещения был подобран экспериментально и способствовал синтезу 23-29 мг/100 г АСБ каротиноидов и 7-10 мг/л БР при уровне биомассы 4,2-4,6 г/л.

3.2.3. Культивирование *Hbt. salinarum* с извлечением ингибиторов биосинтеза из ростовой среды адсорбентом

Эксперименты с доливом видеоизменили прокачиванием ферментационной среды, отбираемой из биореактора, через колонку с адсорбентом на 3-и сутки культивирования с последующим её возвратом в реактор. Такой процесс с рециклом культуральной жидкости с клетками галобактерий через адсорбент осуществляли с внесением концентрированных субстратных подпиток. В данном варианте культивирования также использовался штамм КСК-03307.

Для наблюдения за ходом роста клеток галобактерий и синтезом целевого продукта – бактериородопсина в режиме ферментации с прокачкой культуральной жидкости через адсорбент был использован описанный выше экспресс-метод анализа содержания БР, позволяющий сравнивать показатели

текущего процесса культивирования с эталонным вариантом (п. 2.11). Экспресс-методика, разработанная нами ранее, позволила не только определять ориентировочное содержание бактериородопсина в ходе культивирования, но и своевременно принимать решения для управления процессом и заменять отработанный адсорбент. В дальнейшем экспресс-методика была модифицирована – спектральные характеристики суспензии, содержащей окрашенную биомассу галоархей регистрировались напрямую с помощью зонда обратного рассеяния R200-7-VIS-NIR (Ocean Optics, USA).

На рисунке 3.11 показана динамика накопления биомассы штамма КСК-03307 и БР в режиме культивирования с прокачкой культуральной жидкости через колонку с активированным углем АГ-3, а на градиентной карте (Рисунок 2.6А) – соответствующая линия эволюции цвета суспензии по ходу культивирования галобактерий.

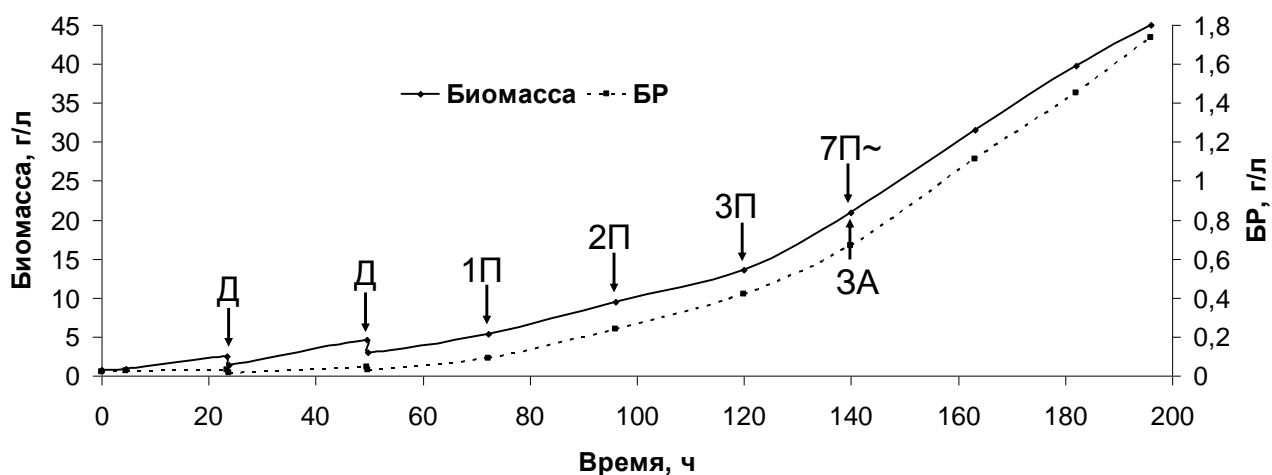


Рисунок 3.11. Накопление биомассы при выращивании штамма КСК-03307 в биореакторе в режиме культивирования с извлечением ингибиторов биосинтеза адсорбентом. Д – долив среды, (n)П – количество внесенных подпиток, ЗА – замена адсорбента.

Через 8 суток культивирования удалось достичь конечного уровня накопления биомассы 45 г/л при суммарном содержании бактериородопсина 1750

мг/л. В данном случае замена адсорбента происходила на 140 час от начала ферментации, при этом решение о замене адсорбента принимали на основании использования разработанной экспресс-методики. Такая заблаговременная замена позволяет предотвратить выработку каротиноидов и поддерживать метаболизм галобактерий в состоянии устойчивого синтеза бактериородопсина.

Кривые эволюции цвета могут несколько различаться и находиться в определенном коридоре разброса в зависимости от вариаций в составе и количестве питательной среды, свойств адсорбента, питательной ценности компонентов, параметров стерилизации и т.д. Поэтому для принятия решений необходимо оперировать областью цветов для каждого момента времени, соответствующей оптимальному и предельно допустимому течению процесса с учетом точности экспресс-методики. Выход цвета из этой области, который происходит всегда в сторону уменьшения В составляющей цвета (и, соответственно возрастания R и/или G компонент в RGB-модели), свидетельствует о начале выработки галоархеями каротиноидов и, следовательно, о необходимости замены адсорбента.

Многочисленные эксперименты позволили подобрать искомые цветовые области для разной продолжительности культивирования (и вариаций в состоянии культуры) и отработать принципы управления процессом. Чтобы наглядно представить изменение цвета в ходе процесса наряду с градиентной картой можно воспользоваться R-G диаграммой (Рисунок 2.6В), третьей координатой которой является время.

На диаграмме (Рисунок 2.6В) изображен тот же ход биосинтеза, что и на градиентной карте (Рисунок 2.6А). Возможный небольшой дрейф в сторону точки белого цвета (Рисунок 2.6А) с учетом показаний оптической плотности ферментационной среды может указывать на недостаток компонентов питания. Отклонение процесса выше допустимого от оптимальной точки в определенный момент культивирования (показано условно стрелками на диаграмме, фиксируемое как уменьшение В составляющей цвета) на данной диаграмме также

свидетельствует о начале выработки каротиноидов и необходимости замены адсорбента.

Высокоплотностное культивирование галобактерий с извлечением ингибиторов роста адсорбентом завершено в рассмотренном случае не только из-за массообменных ограничений используемого ферментера. Остановка роста при концентрациях биомассы 44-46 г/л, возможно, происходила из-за чрезмерного механического и оксидативного стрессов, приводящих к лизису клеток. В идеале – адсорбционные процессы и культивирование должны совмещаться в одном объеме при оптимальных массообменных условиях и системе подвода освещения, что является задачей создания фотобиореактора нового поколения.

Разработанный подход позволяет снизить количество отходов и существенно повысить выход биомассы галобактерий с контролируемым составом.

Накопление существенных концентраций ингибиторов в адсорбентах с известными характеристиками упростит дальнейшее выделение и идентификацию этих веществ. В качестве примера можно привести ВЭЖХ смесью гексан/изопропанол экстрактов из адсорбента MN500, который отбирался из колб в ходе культивирования (Рисунок 3.12).

Заслуживает внимания пик в области 4,2 мин. Экстракты смесью гексан/изопропанол с адсорбента MN500, полученные на 2,4,6,8 сутки культивирования галоархей показывают явное увеличение площади этого пика в процессе культивирования.

Попытки культивирования других галофильных микроорганизмов, таких как *Halomonas utahensis*, *Halorubrum litoreum*, *Salicola marasensis* и *Haloferax alexandrinus* и др. с применением адсорбентов также позволяют накопить высокую плотность клеток, что свидетельствует об универсальности подхода.

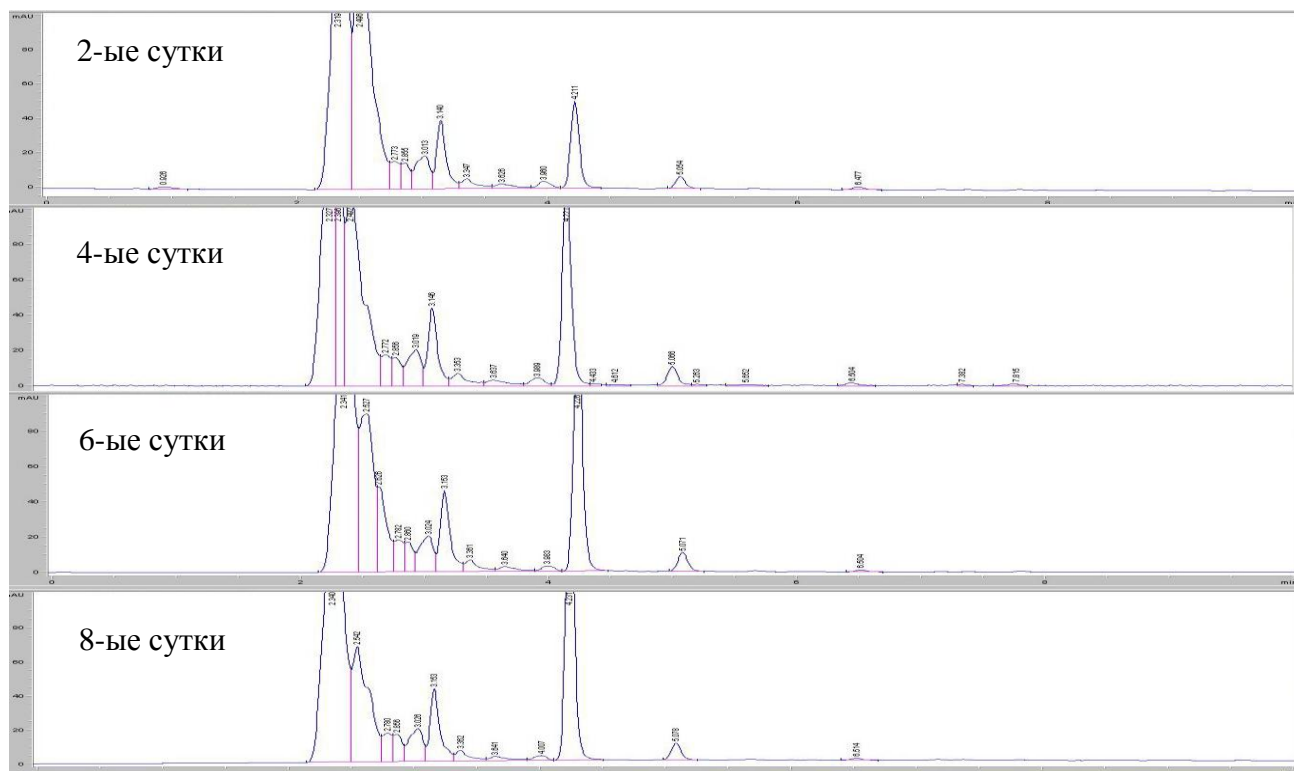


Рисунок 3.12. Изменения в составе экстрактов из адсорбента MN500 в ходе культивирования *Hbt. salinarum*.

3.2.4. Оптимизация условий освещения при культивировании экстремально галофильных микроорганизмов

В экспериментах со штаммом-продуцентом БР КСК-03307 было отмечено, что накопление биомассы при пересевах в темноте на 7-10% могло опережать накопление биомассы при освещении. Такие результаты можно объяснить либо ингибированием дыхания светом [1250, 1251] (уровень такого ингибирования зависит от содержания БР в клетках по ходу культивирования и в инокуляте – в темноте его синтезируется меньше), либо стимулированием образования ингибиторов роста на свету. Последнее предположение согласуется с предположением об образовании продуктов перекисного окисления компонентов среды, отрицательно влияющими на рост галоархей.

Независимо от механизмов воздействий света, кислорода и компонентов питательной среды на биосинтез у галоархей необходимо учитывать, что:

- 1) свет может непосредственно стимулировать синтез бактериородопсина;

2) свет может индуцировать образование продуктов фотохимического окисления части веществ, содержащихся в питательной среде, и этим опосредованно стимулировать синтез каротиноидов как компонентов антиоксидантных систем и репрессировать синтез бактериородопсина;

3) кислород благоприятно влияет на накопление биомассы, а при большом содержании в ферментационной среде, непосредственно репрессирует синтез БР;

4) кислород может индуцировать образование продуктов химического окисления части веществ, содержащихся в питательной среде, и этим опосредованно стимулировать синтез каротиноидов как компонентов антиоксидантных систем и репрессировать синтез бактериородопсина.

Совокупный результат сочетанного воздействия света и кислорода может определяться всеми четырьмя отмеченными воздействиями, преобладанием одних изменений над другими. Исследовать влияние компонентов спектра можно с использованием монохроматических источников. Следует отметить, что эксперименты *до оптимизации освещения* проводились с использованием ламп PHILIPS TL-D 18W/33-640, обладающих широким спектральным диапазоном (Рисунок 2.9).

В последнее время в качестве источников излучения все чаще используют светодиоды. Они обладают малым энергопотреблением, высоким КПД, светимостью и длительным сроком службы. В последнее время появились светодиоды высокой мощности. Кроме того, они излучают в узком диапазоне длин волн, что используется в экспериментальных работах с фототрофными микроорганизмами для изучения воздействия монохроматического света.

С целью изучения возможности оптимизации облучения галоархей как варианта уменьшения скорости образования ингибиторов биосинтеза и стимуляции роста проводились *тестовые опыты в колбах без адсорбента* с использованием светодиодов, излучающих на разных длинах волн: красного (λ 642 нм), желто-зеленого (λ 568 нм), светло-зеленого (λ 529), зеленого (λ 513 нм), голубого (λ 465 нм) света. Дополнительно использовались немонохроматические светодиоды белого света. Эксперименты проводились вначале с одиночными

светодиодами, затем с объединенными в жгуты и матрицы для увеличения мощности освещения. Светодиодные жгуты могли стерилизоваться 70%-ным спиртом и погружаться непосредственно в среду культивирования (п. 2.14). Матрицами светодиодов освещали содержимое колб через стекло².

Большой прирост биомассы в конце активного роста и на участке замедленного роста при лимитировании кислородом по сравнению с другими отмечен при освещении светло-зелеными (λ 529) и желто-зелеными (λ 568 нм) светодиодами, что можно связать с нарабатываемым в этот период БР. Увеличение вводимой мощности от 10 мВт/л до 70 мВт/л приводило к устойчиво выраженному эффекту ускорения роста на этом участке, однако по сравнению с освещением люминесцентными лампами выход БР был снижен на 28-30%, по финальному накоплению биомассы наблюдалось незначительное снижение из-за замедленного роста в начале культивирования.

Эксперименты со светодиодной матрицей голубого света (λ 465 нм) показали наилучшие результаты среди вышеуказанного набора светодиодов, а также использованных в работе люминесцентных ламп. При освещении ферментационной среды светодиодной матрицей с λ 465 нм выход биомассы в периодическом режиме культивирования повышался на 10%, а БР – на 22% по сравнению с контрольными опытами при освещении лампами дневного света PHILIPS TL-D 18W/33-640 с интенсивностью облучения 70 мВт/л. В этом варианте в начале культивирования уменьшалась лаг-фаза, быстрее наступала фаза активного роста, что возможно связано также и с активностью фотозависимых ферментов репарации [109].

Опыты с комбинацией диодов голубого и желто-зеленого света, которые проводились с нарастанием доли одного и падением доли другого участка спектра показали, что соотношение 50/50 при суммарной вводимой мощности 70 мВт/л позволяет сократить время периодического культивирования на 10-15%. Аналогичные результаты получались при комбинации по вводимой мощности

² Светодиодные матрицы были изготовлены и предоставлены НТЦ-44 ГУП НПО «Астрофизика», а также Складневым Д.А., эксперименты проводились совместно.

70/30 диодов голубого (λ 465 нм) и белого света. Интенсивность падающего света при облучения светодиодами варьировалась далее в рамках от 70 мВт/л до 140 мВт/л и в этом диапазоне не приводила к заметным изменениям в выходе биомассы галоархей и БР. Повышение вводимой мощности более 140 мВт/л усиливало синтез каротиноидов и не рекомендуется для штамма КСК-03307 – продуцента БР. При культивировании в колбах с адсорбентом при оптимальном режиме освещения для этого штамма удавалось получить до 140 мг/л БР.

Оптimumом для выработки каротиноидов у штамма 353П стала вводимая мощность облучения 200-210 мВт/л и соотношение 50/50 диодов голубого (λ 465 нм) и белого света. Дальнейшее увеличение вводимой мощности освещения в обычном периодическом процессе без использования адсорбента приводит к чрезмерному повреждению каротиноидов и быстрой их деградации в процессе хранения биомассы. Спектральные характеристики и повышенная интенсивность облучения белыми светодиодами способствуют более синтезу каротиноидов. В оптимальном для синтезе БР режиме штамм 353П может накапливать до 10 мг/л БР.

Светодиоды белого света, используемые для экспериментов могут сильно отличаться в зависимости от производителя. Принято различать теплый и нейтральный белый свет (Рисунок 3.13А), для галобактерий подходят белые светодиоды, близкие к нейтральному белому. К этому следует добавить, что их характеристика должна быть ближе к варианту 1 на рисунке 3.13В. Вариант 2 и, вообще, светодиоды, с характеристиками приближенными к теплому белому свету могут приводить к замедлению на завершающем этапе роста. Как показали эксперименты по оптимизации ростовых характеристик и синтеза БР, необходимо усилить голубую составляющую (плечо) спектра в 2-3 раза по сравнению с желто-зеленой областью светодиодов нейтрального белого света. Повышением доли и интенсивности желто-зеленого света или интенсивности облучения светодиодами белого света можно регулировать синтез каротиноидов.

Хороший результат для синтеза БР клетками также показали специальные люминесцентные лампы HAGEN T8 Marine Glo (узкий спектральный диапазон,

синий свет) в сочетании с лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640 в соотношении 70/30 при суммарной вводимой мощности 70 мВт/л (п. 2.14). Эти лампы удобно использовать при освещении поверхностей с колбами при подготовке инокулята. Светодиоды удобно использовать в составе прожекторов – матриц с отражателями для введения светового потока в биореактор (Рисунок 3.16).

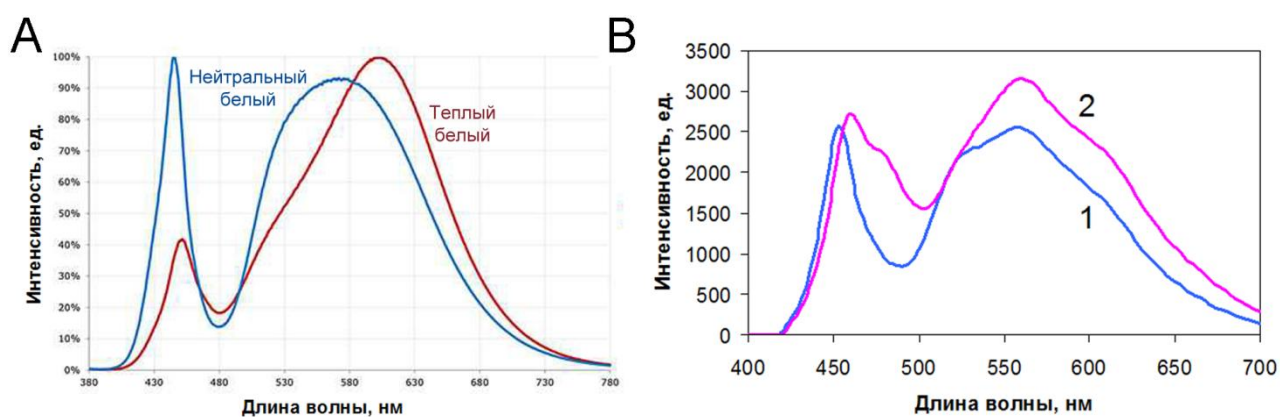


Рисунок 3.13. Спектральные характеристики диодов белого света. (А) – идеальные источники, (В) – данные получены для диодов белого света, использованных в эксперименте.

Таким образом, облучение монохроматическим голубым светом светодиодной матрицы положительно влияет на выход биомассы и БР и это *прямое влияние* проявляется выражено на начальном участке культивирования и может быть связано также с активностью систем фоторепарации, что необходимо детально исследовать в дальнейшем. Опосредованное влияние, возможно, обусловлено тем, что монохроматическое освещение определенной длины волны, а не широкого спектра, как у люминесцентных ламп, уменьшает скорости протекания процессов фотохимического окисления компонентов питательной среды в течение всего процесса культивирования. Желто-зеленый свет эффективно работает на участке лимитирования кислородом. Вклад в образование каротиноидов у этого участка спектра значительно выше, чем у голубого, при повышении интенсивности облучения.

3.2.5. Применение антиоксидантов при культивировании *Hbt. salinarum* для снижения окислительных повреждений ростовой среды

Внесение антиоксидантов было призвано уберечь уязвимые компоненты среды от химического/фотохимического воздействия при длительном культивировании галоархей. Антиоксиданты не должны были оказывать ингибирующее действие на сами клетки и быть достаточно стабильными, т.к. известно, что многие из них после деградации обладают уже прооксидантными свойствами. Антиоксиданты вносились вместе с инокулятом в концентрациях от 0,5 до 2 г/л для первоначальной проверки эффекта возможного ингибирования роста и биосинтеза. Варьирование в пределах этого диапазона не приводило к значимым изменениям результатов, представленных в таблице 3.3.

Затем концентрации антиоксидантов были оптимизированы до минимальных уровней, при которых сохранялся эффект прироста накопления БР в диапазонах, приведенных в таблице 3.3. Для цистеина, токоферола и аскорбиновой кислоты эти концентрации составили 200, 45 и 150 мг/л соответственно. При уменьшении концентрации аскорбиновой кислоты произошло падение выработки каротиноидов и накопления биомассы. Большие концентрации аскорбиновой кислоты, хотя и несколько стимулируют синтез БР, но обладают явно выраженным прооксидантным эффектом. Некоторая стимуляция выработки БР при больших концентрациях аскорбиновой кислоты происходит в начале культивирования, затем она стабилизируется и начинают вырабатываться каротиноиды – маркеры окислительного стресса, что может указывать на влияние продуктов трансформации аскорбиновой кислоты, обладающих прооксидантным действием [1252]. Совместное действие нескольких исследованных антиоксидантов также приведено в таблице и не превышает эффект одного цистеина, роль которого в выработке БР показана уже при оптимизации синтетической среды. Совместный эффект антиоксидантной защиты становится заметен при повышении мощности облучения люминесцентными

лампами выше 140 мВт/л и выражается в меньшем проявлении пиков каротиноидов и сохранении синтеза БР.

Таблица 3.3. Влияние антиоксидантов на накопление биомассы, каротиноидов и БР *Hbt. salinarum* КСК-03307.

Вещество, г/л	Накопление БР, прирост в % к контролю	Влияние на накопление каротиноидов (сравнение с контролем)	Накопление биомассы, прирост в % к контролю
Цистеин, 0,2 ; 0,5-2,0	+ 15-18%	полное исчезновение пиков каротиноидов, отчетливое проявление пика БР	Уровень контроля
Токоферол (витамин Е), 0,045 ; 0,5-2,0	+ 7-10%	уменьшение проявления пиков каротиноидов, пик БР более выражен	+ 23-28%
Аскорбиновая кислота, 0,5-2,0	+ 5-8%	ярко выраженные пики каротиноидов	+ 30-33%
Аскорбиновая кислота, 0,15	+ 5-8%	пики каротиноидов на уровне контроля	+ 7-12%
Цистеин, 0,2; токоферол, 0,045; аскорбиновая кислота, 0,15	15-20%	полное исчезновение пиков каротиноидов, отчетливое проявление пика БР	30-35%
Контроль	70 мг/л БР	слабо выраженные пики каротиноидов	3,2 г/л АСБ

Результаты экспериментов в колбах дали основание полагать, что при оптимизированном освещении и внесении антиоксидантов в среду можно ожидать снижения расхода адсорбентов до 15% при культивировании и стабильно высокого синтеза БР уже в биореакторе, что и подтвердилось впоследствии увеличением срока службы одной загрузки адсорбента в адсорбционную колонну.

Подтвержденное действие набора антиоксидантов важно для сохранения биомассы галоархей при последующей сушке и длительном хранении.

3.2.6. Высокоплотностное культивирование штаммов-продуцентов каротиноидов в мембранном биореакторе

Для получения высокоплотностной культуры галоархей с высоким содержанием каротиноидов проводилось культивирование с мембранным модулем в модернизированном биореакторе (п. 3.2.7). В качестве модельных культур использовали штаммы *Hbt. salinarum* 353П (ВКПМ В-1739) и *Hbt. salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794). На первой стадии в ферментер вносился инокулят, подготовленный в колбах (10% об.) и культивирование проводилось до накопления около 3 г/л биомассы при освещении диодами голубого и белого света в соотношении 50/50 и вводимой мощности около 70 мВт/л. Затем включалась подача питательной среды в биореактор и отбор фильтрата через мембранный модуль с одинаковой скоростью, которую увеличивали по мере нарастания биомассы. Оптимальная скорость подачи питательной среды в реактор для устойчивого накопления биомассы найдена экспериментально и описывается эмпирической формулой для протока $D = C_{\text{БМ}} \times 8,3 \times 10^{-3} \text{ ч}^{-1}$. При этом концентрация растворенного кислорода поддерживалась на уровне 5-10%, pH саморегулировался и поддерживался при рекомендованном разбавлении в диапазоне 7,5-7,8. При концентрации биомассы галоархей около 20-21 г/л концентрацию растворенного кислорода поднимали до 15-20%, вводимую мощность освещения увеличивали до 300 мВт/л и через некоторое время биомасса начинала интенсивнее накапливать каротиноиды. Мощность освещения повышали далее на 60 мВт/л на каждые 5 г/л накопленной биомассы, и в конце культивирования она составляла около 600-630 мВт/л. За 7 суток культивирования содержание биомассы достигало 46-48 г/л при содержании каротиноидов от 23 до 29 мг/ 100 г биомассы для штамма 353П и от 27 до 35 мг/ 100 г биомассы для штамма 353П-1. На этом этапе можно было часть протока,

который шел исключительно через мембранный модуль направлять на слив биомассы с $D=0,033-0,035 \text{ ч}^{-1}$ и накапливать ее в резервуаре для последующей переработки. Однако, характеристики биомассы с высокой концентрацией ухудшаются при длительном простое, и более целесообразным методом являлся слив и переработка половины рабочего объема суспензии из биореактора примерно каждые сутки. Показатели высокоплотного культивирования штаммов *Hbt. salinarum* 353П и 353П-1 были почти аналогичны, но из-за большей устойчивости последнего к вирусному поражению культивирование с ним возможно было проводить дольше (до 3-х недель) в условно стерильном варианте. Как показала практика нестерильных непрерывных процессов и культивирования с мембранным модулем *Hbt. salinarum* 353П и 353П-1 возможно замещение целевых культур посторонней микрофлорой и поражение вирусами.

3.2.7. Разработка универсального высокоавтоматизированного комплекса для культивирования микроорганизмов (с учётом особенностей экстремальных галофилов) с программным обеспечением “BioDrome 3.0”

Культивирование микроорганизмов, высокочувствительных к изменению ростовых условий, требует создания универсального гибко настраиваемого комплекса с программным обеспечением, обладающим широкими адаптивными возможностями. Такая система, используя заложенные в ней алгоритмы должна позволять хорошо масштабировать получение микробной биомассы и целевых продуктов из лабораторного в производственный вариант исполнения, а также обладать возможностью быстрой модернизации, удаленным доступом для отслеживания и регулирования характеристик процессов культивирования через интернет и ведения длительных непрерывных процессов культивирования.

Непрерывное наблюдение за экспериментом или производственным процессом позволит принимать своевременные решения, регулировать, видоизменять условия культивирования. С развитием коммуникаций появилась возможность удаленного анализа и управления исследуемым процессом. Решение

таких задач упростилось благодаря унификации стандартов на оборудование и передачу информации, благодаря использованию модульного принципа построения систем и появлению технологий программирования, ориентированных на инженерных работников (LabVIEW).

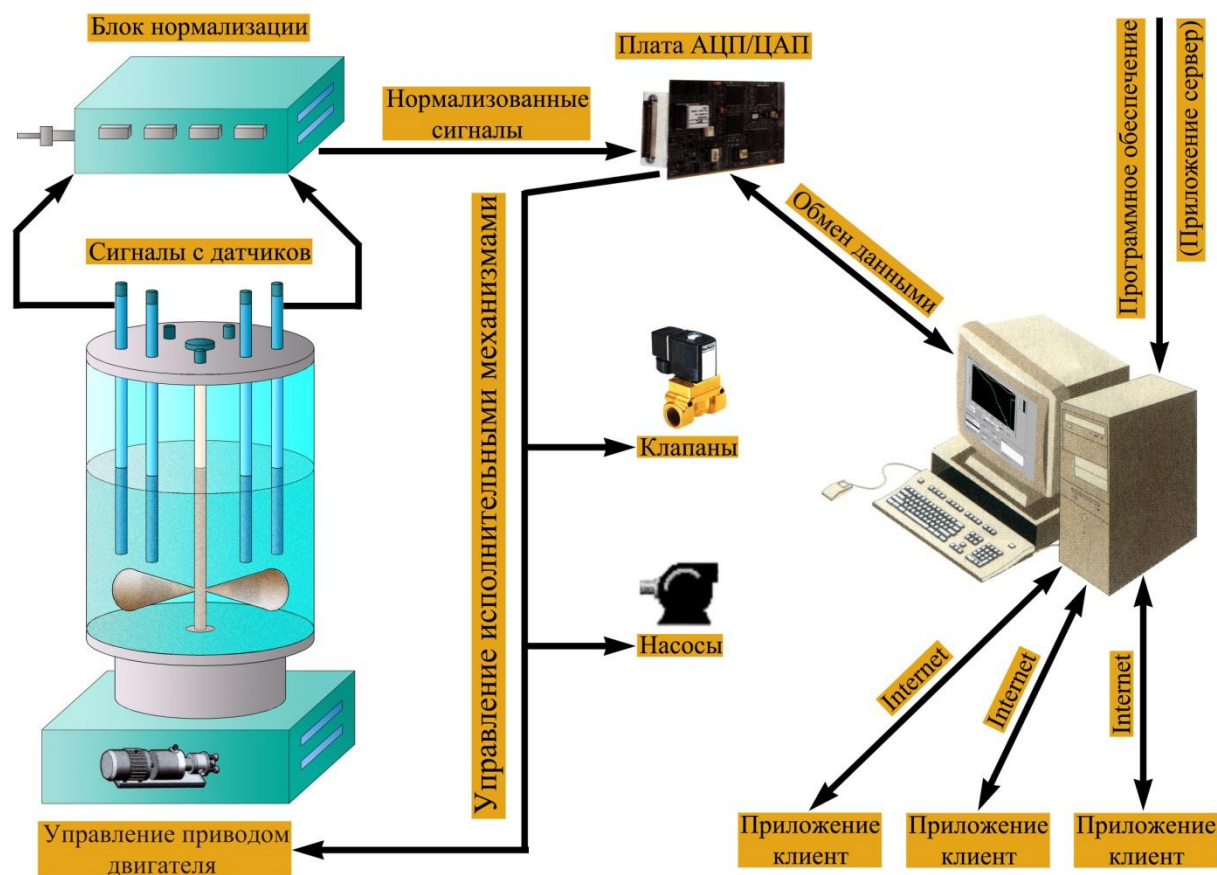


Рисунок 3.14. Общая компоновка высокоавтоматизированного комплекса для культивирования микроорганизмов.

Требования к современной установке заключаются в следующем: относительная простота аппаратного оформления, надежность, наглядность программного обеспечения, привлекательность для ознакомления и обучения принципам культивирования микроорганизмов. Общая организация высокоавтоматизированного комплекса культивирования представлена на рисунке 3.14.

Выбор управляющих элементов и компонентов регистрации сигналов комплекса, представленного в общем виде на рисунках 3.14 и 3.15, определялся вариантом процесса культивирования, ресурсом службы и точностью компонентов, поэтому далее описывается только один из вариантов. В качестве первичных преобразователей могут быть выбраны стерилизуемые датчики рН, еН, рО₂ (растворенного кислорода) и температуры. Сигналы от датчиков преобразуются с помощью блока нормализации сигналов и поступают на аналоговые входы АЦП (аналого-цифровой преобразователь). После соответствующей обработки поступивших данных, программное обеспечение может управлять перистальтическими насосами и клапанами: подкислять или подщелачивать среду, добавлять субстрат, прокачивать среду культивирования через кювету для измерения оптической плотности, другие выносные модули, подавать воздух, охлаждающую воду с помощью имеющихся блоков управления насосами и клапанами. Управление исполняющими устройствами осуществляется с помощью платы ЦАП (цифро-аналоговый преобразователь). Для регулирования оборотов двигателя постоянного тока применяется тиристорный привод или частотный преобразователь. С помощью привода (увеличение, уменьшение оборотов) и подачи воздуха через клапаны регулируется содержание кислорода в культуральной жидкости.

Возможности высокоавтоматизированного комплекса позволяют:

- отслеживать ход ферментационного процесса, регистрируя такие параметры, как Т°, рН, рО₂, еН, оптическая плотность суспензии клеток культивируемого продуцента;
- регулировать рН, рО₂, Т°, управлять подачей питательной среды, расходом подаваемого воздуха, приводом электродвигателя ферментера, фильтровать помехи;
- калибровать датчики с поправочными зависимостями (например, рН, рО₂ от температуры);
- снимать данные, как в программном режиме, так и в режиме прямого доступа к памяти (ПДП);

– работать в изменяемых режимах: периодическом, периодическом с подпиткой субстратом, с обратной связью по показаниям датчиков, непрерывных режимах включая культивирование с мембранным модулем или внешним контуром с адсорбционной колонкой.

Подробное описание компоновки высокоавтоматизированного комплекса, который быстро можно настраивать под конкретное применение, приведено на рисунке 3.15 и в таблице П4.1, а сам комплекс для высокоплотного культивирования галоархей изображен на рисунке 3.16.

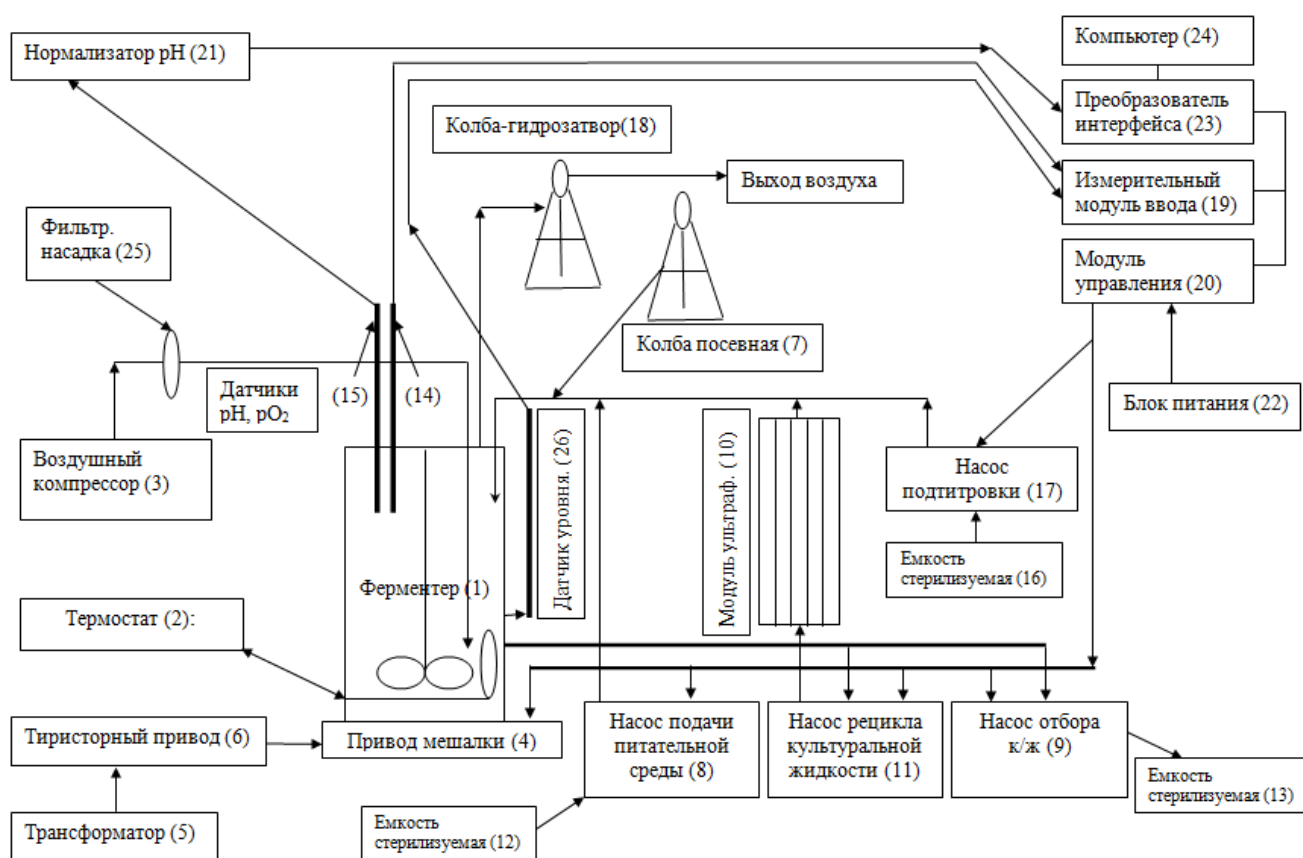


Рисунок 3.15. Схема высокоавтоматизированного комплекса для высокоплотного культивирования микроорганизмов.

Лабораторный биореактор с боковой поверхностью из стекла (для проведения светозависимых процессов), общим объемом 10 л выполнен из химически стойкой нержавеющей стали с системой теплообменников, которые обеспечивают термостатирование, может полностью стерилизоваться в автоклаве.

Химически стойкие клапаны с регулируемым зазором, примененные в комплексе, можно использовать для регулирования подачи кислот, щелочей, субстратных подпиток, регулирования подачи воздуха. Важно, что каналы клапанов выдерживают стерилизацию, выполнены из химически- и термостойких материалов. Перистальтические насосы, примененные в комплексе, могут использоваться в длительных процессах и имеют систему внешнего управления с помощью стандартных сигналов. Комплекс имеет модульную структуру и легко перестраивается. Сигналы с датчиков после нормализации и исполнительные устройства (клапаны, насосы) имеют стандартные для промышленности диапазоны и обрабатываются оборудованием фирмы “Овен” (Россия), которое объединено в сеть RS-485. Для управления приборами, организованными в сеть, используется OPC-сервер фирмы “Овен”. Первичная настройка и проверка работы приборов организована в конфигураторах оборудования и поставляется вместе с модулями фирмы “Овен”. Выбранная компоновка и оборудование позволяет снимать данные и управлять исполнительными устройствами с периодичностью 100 мс, что на порядок выше необходимых для биотехнологических процессов характеристик, обеспечивается высокая надежность и длительный ресурс.

Непрерывная работа в течение нескольких лет подтвердила правильность выбранной концепции для создания высокоавтоматизированного комплекса культивирования. Испытанные подходы и разработанное программное обеспечение были внедрены, а затем также протестированы на производственном участке при полупромышленном уровне производства.

Важнейшим элементом высокоавтоматизированного комплекса является управляющее программное обеспечение, которое разработано на базе системы LabVIEW фирмы National Instruments (США). Визуальный язык программирования (G) системы LabVIEW интуитивно понятен для инженерного персонала и легко осваивается, что важно для быстрой адаптации программного обеспечения под конкретное применение, собственно, персоналом.



Рисунок 3.16. Пример комплектации автоматизированной установки для высокоплотного культивирования микроорганизмов.

LabVIEW – система разработки программ по своей логической структуре близкая к объектно-ориентированным языкам программирования, таким как C++. Этот пакет обладает одним отличительным свойством. Он разрабатывался специально для инженеров с целью скорейшего овладения навыками программирования персоналом предприятий. LabVIEW является универсальным пакетом, пригодным и для новичка, и для профессионального программиста.

LabVIEW является (подобно C++) системой программирования общего назначения с обширными библиотеками функций и подпрограмм для любой задачи. Однако, LabVIEW отличается от других систем еще и тем, что является графическим языком программирования (в отличие от текстово-ориентированных, таких как Си, Паскаль и т. п.). В своей основе он использует графический язык G, позволяющий создавать исходный текст программ в виде блок-диаграмм.

Реализации программ на LabVIEW называются виртуальными приборами или виртуальными инструментами, поскольку их внешнее графическое

представление и способ функционирования могут имитировать работу реальных физических устройств и результаты измерений контролируемых системой реальных характеристик.

Интерактивный интерфейс пользователя представлен в LabVIEW в виде передней панели, имитирующей панель физического прибора и содержащей ручки и кнопки управления, графические индикаторы и другие средства управления и индикации. Ввод данных при этом осуществляется посредством мыши или клавиатуры. Результаты выводятся на экран компьютера.

Для построения блок-диаграммы программируемой задачи используют так называемую функциональную панель. При этом блок-диаграмма отображает графическое представление программируемой задачи, а также служит исходным кодом реализации виртуального прибора. Программная реализация виртуальных инструментов использует в своей работе принципы иерархичности и модульности. Виртуальный инструмент, содержащийся в составе другого виртуального инструмента, называется прибором-подпрограммой (SubVI).

Настраиваемое программное обеспечение “Biodrome 3.0” полностью написанное на базе LabVIEW фирмы National Instruments осуществляет управление биотехнологическими процессами в соответствии с выбранным режимом работы или заданием характеристик вручную по ходу процесса.

Программное обеспечение включает приложение-сервер (устанавливается в лаборатории) и приложение-клиент (для просмотра информации о проводимом процессе на удаленном компьютере). Измерительная система интегрируется в Интернет с помощью программной технологии DataSocket, упрощающей передачу данных. Для управления с удаленного компьютера разработан дополнительный модуль, соответствующий модулю управления в основной программе, но обеспечивающий соединение с сервером с помощью TCP/IP функций LabVIEW, идентификацию пользователя, прав доступа. Просмотр хода эксперимента возможен и без устанавливаемого на удаленном компьютере программного обеспечения, так как используется WEB-сервер LabVIEW.

Программа “Biodrome 3.0” представлена четырьмя основными модулями (Рисунок 3.17): “Руководство пользователя”, “Установки оборудования”, “Анализ данных”, “Эксперимент” (включая управление).

В модуле установок (Рисунок 3.18.) задаются: тип платы (модулей) АЦП/ЦАП, количество сканируемых каналов, тип подключения, описание величин, единиц измерения, коэффициенты усиления (для каждого канала), настраивается стиль вывода графиков, сетевые настройки, режимы ввода данных, параметры управления, а также множество других параметров.

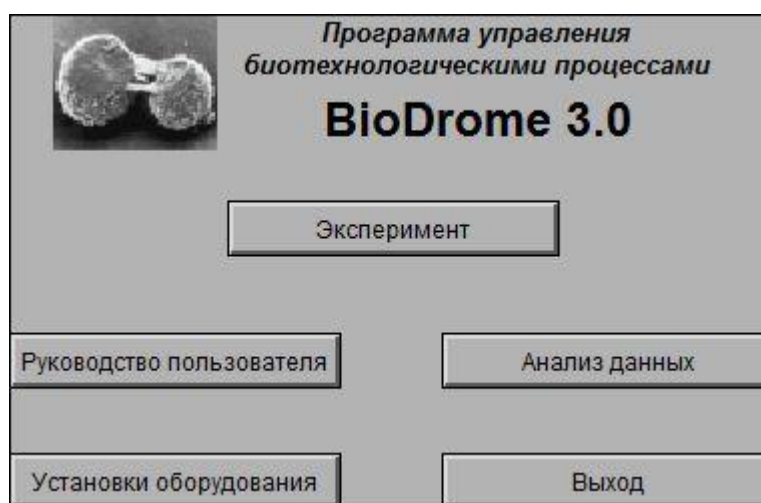


Рисунок 3.17. Главное окно программы.

В разделе режимов работы настраиваются основные параметры управления устройствами, объединенными в комплекс, что позволяет сопоставить регулируемые параметры исполнительным устройствам, настроить диапазоны и тип регулирования. Например, показания датчика растворенного кислорода можно связать с регулирующим каналом клапана расхода воздуха и/или с регулирующим каналом управления частотой привода мешалки реактора. В этом разделе задается также вариант управления (ШИМ, ПИД, управление с ограничением). В ходе культивирования можно изменять параметры принудительно, вручную, здесь же настраиваются только автоматические режимы работы комплекса.

Для доступа в сеть и удаленного управления комплексом используется раздел идентификация, где настраиваются права пользователя для управления процессом ферментации.

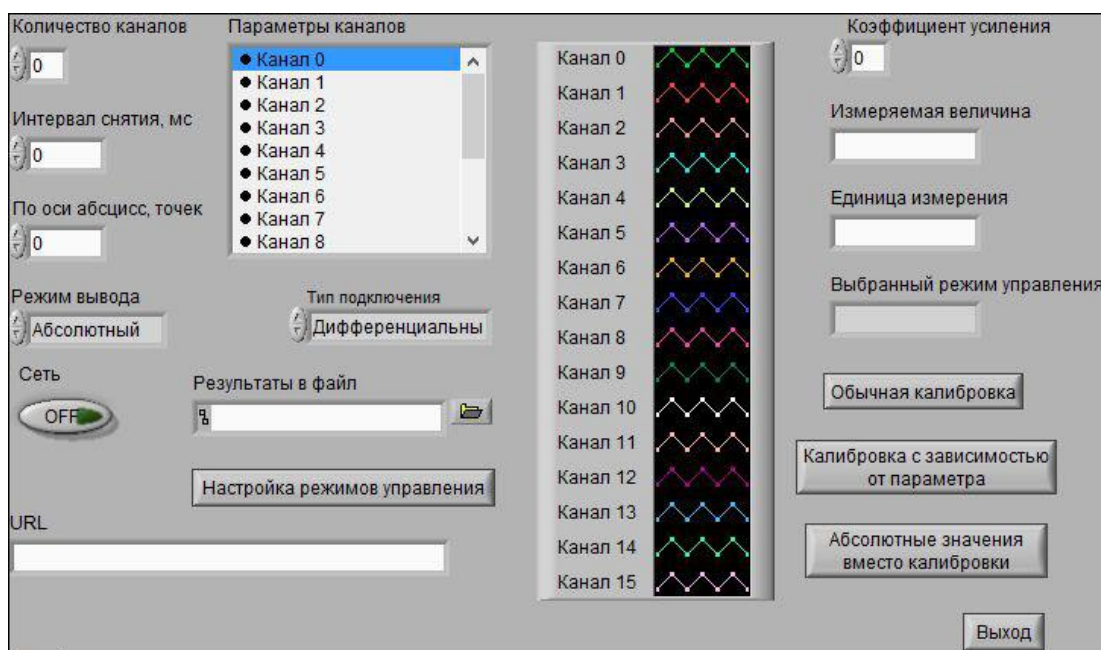


Рисунок 3.18. Окно модуля установок.

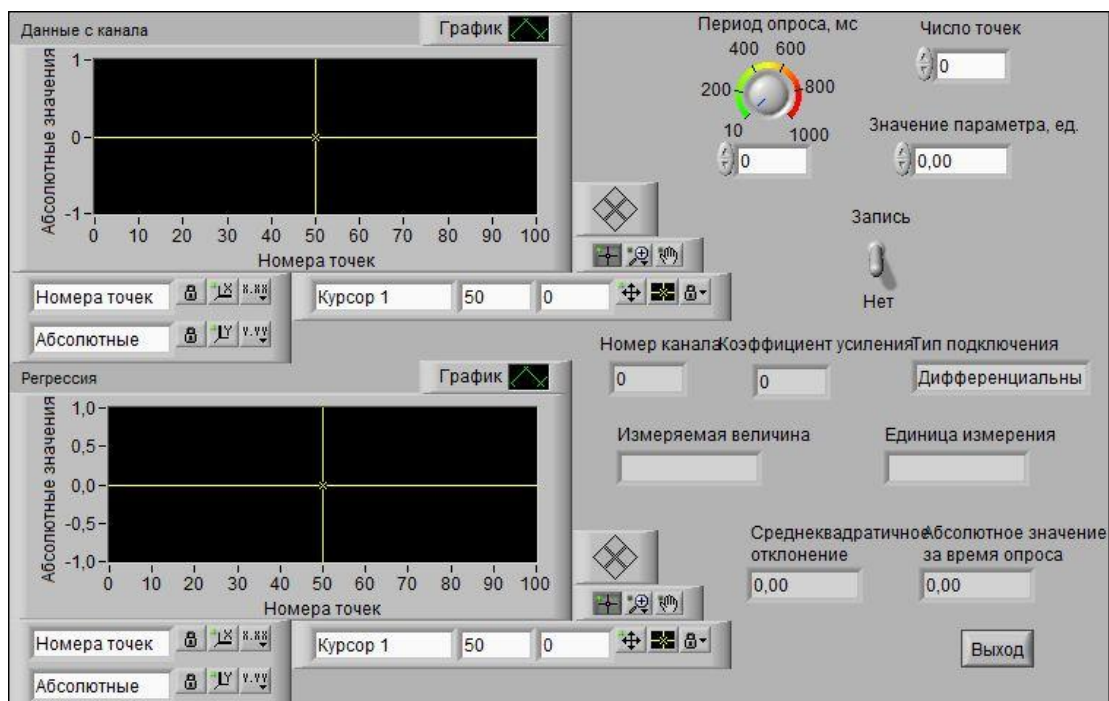


Рисунок 3.19. Окно калибровки датчиков.

Из окна, изображенного на рисунке 3.18 можно перейти к различным видам калибровки датчиков (Рисунок 3.19). Параметры конкретной калибровки вводятся через всплывающие диалоговые окна. Доступна калибровка датчиков в зависимости от других параметров. Так рН и растворимость кислорода зависит от температурной поправки, которую можно ввести, если в качестве первичного преобразователя присутствует термосопротивление или термопара.

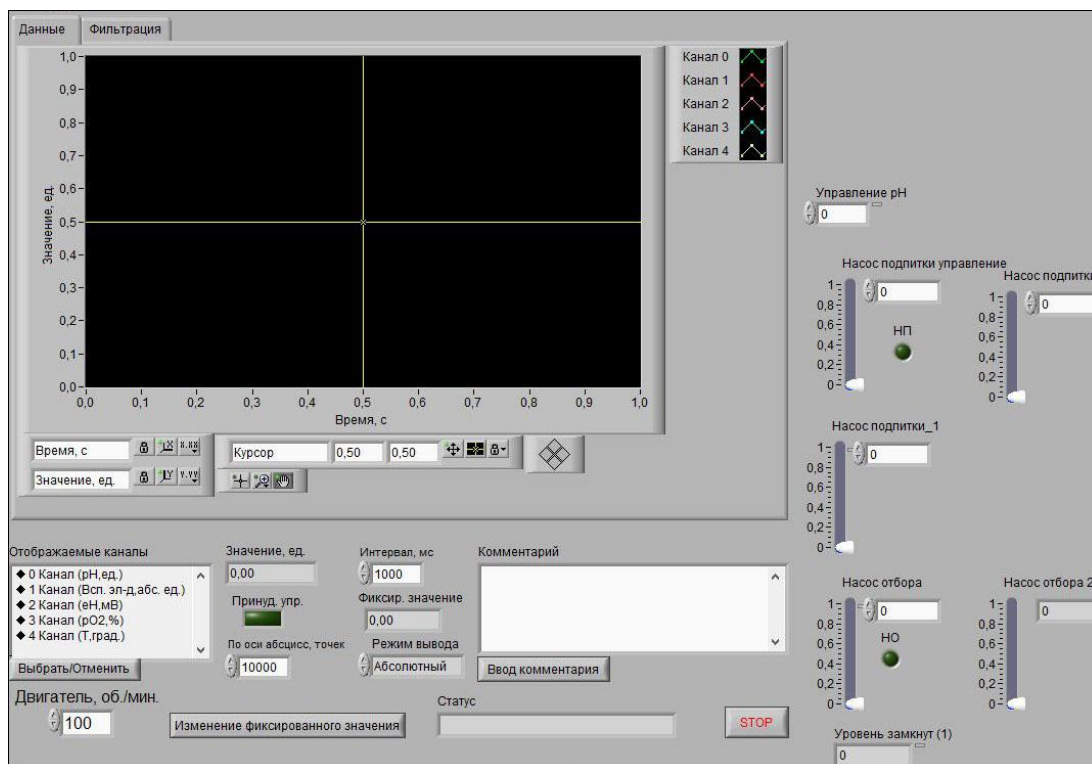


Рисунок 3.20. Передняя панель модуля "Эксперимент".

В модуле эксперимента (Рисунок 3.20) отображаются данные в реальном времени с выбранных в списке каналов. Их можно убирать, выключая определенные каналы (нажимая кнопку “Выбрать/Отменить”), совмещать в относительных единицах в процессе эксперимента, менять параметры управления, интервал снятия данных с каналов и число точек по оси абсцисс. Для выбранного канала отображается текущее значение. Возможен просмотр, масштабирование любой части графика, привязка к точкам с помощью инструментария внизу графика, реализована программная фильтрация сигнала. Предусмотрен ввод комментариев. Результаты эксперимента записываются в

В программе предусмотрен анализ полученных данных без загрузки дополнительного программного обеспечения (модуль “Анализ данных”), что делается средствами LabVIEW (Рисунок 3.21).

3.3. Ферментативные гидролизаты зерновых для культивирования и производства биомассы *Hbt. salinarum*

Гидролизаты зерновых культур и отходов зернового производства широко используются для выращивания микроорганизмов и получения продуктов на их основе. Процессы получения биоэтанола, пробиотических композиций на основе лактобактерий, бифидобактерий и микробной биомассы, обогащенной белком, витаминами и микроэлементами, во многих случаях базируются на зерновом сырье [1253-1256]. Питательная ценность зерновых ограничивается доступностью их компонентов для микроорганизмов, а также ингибирующими веществами, одним из которых является фитат, связывающий ионы металлов и ингибирующий некоторые ферменты. Тем не менее, минеральный, углеводный, белковый контент зерновых вполне подходит в качестве полноценного комплексного субстрата для развития микроорганизмов [1257]. В последнее время для увеличения доступности питательных компонентов зернового сырья использование химического гидролиза стараются сократить и в биотехнологическом производстве все больше используют ферментативные гидролизаты растительного сырья [1258]. Такие гидролизаты показывают хорошие результаты для культивирования микроорганизмов с комплексными требованиями по питательным веществам. Существенное удешевление культивирования способствует оптимизации и внедрению таких процессов для разных культур микроорганизмов [1259, 1260].

Использование источников аминокислот и ростовых факторов растительного происхождения может оказаться эффективным и для выращивания биомассы *Hbt. salinarum*. Для культивирования галоархей используются среды, содержащие дорогостоящие триптон, пептон, дрожжевой экстракт. Эти среды в

процессе культивирования накапливают в той или иной степени токсичные метаболиты, угнетающие развитие микроорганизмов. Ингибирование роста устраняется культивированием с применением мембранных методов или удалением метаболитов с помощью сорбентов или связующих материалов. Причем в этих случаях может получаться культура с высокой плотностью клеток, что способствует в дальнейшем экономичному отделению биомассы и выделению целевых компонентов.

Для кормовых целей и для использования в качестве продукта функционального питания культивирование галоархей на гидролизатах зерновых имеет несомненное преимущество. Некоторые углеводы могут, видимо, связывать ингибиторы роста галобактерий [1174], а в культуральной жидкости после культивирования останутся углеводы различной степени полимеризации.

Получение ферментоллизатов из зерна пшеницы, кукурузы, ячменя приведено в ряде статей и патентах [1261, 1262]. Особо отмечаются варианты сред на основе гидролизатов кукурузы для культивирования животных клеток, роль низкомолекулярных пептидов в ростовых свойствах, качестве среды [1263]. Различие в подходах обусловлено ферментными композициями, степенью гидролиза протеинов и высокомолекулярных углеводов, вариантами тепловой и химической предобработки. Продукты содержат свободные аминокислоты, олигопептиды, углеводы разной степени полимеризации. Последующая очистка перед использованием может приводить к вымыванию микроэлементов и дополнительных ростовых факторов. От микроэлементов зависит собственная протеолитическая активность галобактерий [1264], которая играет роль в усвоении протеина. В данном разделе ставятся задачи: подобрать ферментные препараты, режимы обработки зернового сырья, оценить потребность в микроэлементах и собственную протеолитическую активность галоархей, а также провести контролируемое культивирование на разработанных композициях.

3.3.1. Ферментные препараты и режимы предобработки зерновых

В природных сообществах галоархеи находятся, в основном, в слабощелочной среде. В сообществе присутствует множество микроорганизмов, среди которых особое положение занимают микроорганизмы рода *Bacillus*. Высокогалотолерантные бациллы выживают и успешно развиваются в экстремально соленой среде, галотолерантные, умеренные галофилы и негалофильные могут размножаться исключительно совместно с экстремально галофильными бактериями и водорослями, которые служат источниками осмопротектров.

Как показали эксперименты, вспышка развития бактерий рода *Bacillus* происходит в галофильных сообществах при внесении практически любого источника углерода. Эксперименты с внесением образцов зерновых в сообщества, отобранные из соленых озер Шотт-эль-Джерид, Аликес, Масазыр и Эльтон показывают прирост биомассы бацилл при совместном культивировании в экстремально галофильных сообществах. При этом даже негалофильные бактерии успешно расщепляют компоненты зерновых в слабощелочных условиях при высокой солености, что свидетельствует о работе специфических ферментов этих микроорганизмов. Множество активно размножающихся при совместном культивировании бактерий рода *Bacillus*, выделенных из экстремально соленых сред, обладают широким диапазоном устойчивости к NaCl, а некоторые и возможностью роста (от минимальной концентрации до 15%) в монокультуре. Бациллы, обладающие высокими протеолитическими активностями, были выделены и идентифицированы как *Lysinibacillus macroides*, *Bacillus badius*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* (Приложение 5). Некоторые из них обладали также высокой уреазной активностью и использовались в дальнейшем в опытах по биокальцинированию (п. 3.7). Супернатанты отобранные из вариантов совместного культивирования этих бацилл с *Halomonas utahensis* (п. 3.6) и при культивировании монокультур с размолотыми зерновыми стерилизовались фильтрацией и тестировались как препараты для ферментолиза зерновых с

последующим выращиванием *Hbt. salinarum* 353П на полученных ферментализатах. Ростовые характеристики галоархей в некоторых вариантах были сравнимы с культивированием на средах с триптоном и дрожжевым экстрактом.

Подобные процессы можно реализовать в качестве стадии приготовления питательной среды на производстве, однако, затраты на дополнительные стадии, площади, и использование бацилл рядом с основной культурой, которая идет и на кормовые цели посчитали нецелесообразным и сконцентрировались на разработке ферментализа с использованием нейтральных и щелочных протеаз именно из бактерий рода *Bacillus*. Следует отметить, что некоторые коммерческие протеолитические препараты изготавливают как раз с использованием галотолерантных бацилл. Препараты с малым расходом и/или низкой стоимостью были предпочтительны для промышленного применения. Анализ затрат и предварительные эксперименты позволили выбрать ферментные препараты Protex 40E и Протосубтилин ГЗх (п. 2.15) для дальнейшей оптимизации режимов энзиматического гидролиза. Критерием оптимизации при применении препаратов было накопление биомассы, каротиноидов галоархей в колбах при последующем культивировании с использованием полученных ферментализатов.

Для повышения доступности компонентов зерновых предварительно исследовались варианты тепловой обработки перемолотых круп, смешанных с водой в определенном соотношении. Тепловая обработка острым паром течение 20 мин. при 120 °С перед энзиматическим гидролизом оказалась оптимальной для разрушения структуры зерновых круп. Перемолотые зерновые крупы предпочтительнее муки, т.к. дополнительная очистка и подготовка зерна перед помолом ведет к потере питательных компонентов. Кроме этого, из муки в процессе тепловой обработки образуется тестообразная вязкая смесь, с которой трудно работать.

Соотношение растворителя (воды) к сухой массе зерновых также имело значение. При предпочтительном для высокой концентрации протеина в получаемых ферментализатах соотношении 5:1 получалась чрезмерно вязкая

субстанция, с которой было трудно осуществлять дальнейшие манипуляции. С учетом этого момента для последующих опытов соотношение растворителя к сухой массе зерновых составляло 10:1. Вместе с этим оптимизировались концентрации ферментных препаратов, время ферментативной обработки (оптимум составил 1,5 часа), а также концентрации солей металлов по собственной протеолитической активности и выходу биомассы галоархей *Hbt. salinarum* 353П после 7 суток культивирования в колбах (Таблица 3.4).

Протеолитическая активность при культивировании на полученных энзиматических гидролизатах была максимальна через сутки после начала эксперимента и связана, прежде всего, с внутриклеточными или мембран-ассоциированными протеазами галобактерий. Протеолитическая активность в супернатанте практически не обнаруживалась.

Таблица 3.4. Результаты культивирования *Hbt. salinarum* 353П в колбах с использованием различных ферментоллизатов зерновых.

Зерновые, ферменты, добавки	АСБ, г/л	Каротиноиды, мг/100 г АСБ	Протеазная активность по казеину на 24 час, PU/г АСБ
Пшеница, Протосубтилин ГЗх (2% w/w)	2,7-3,1	17	7,7
Кукуруза, Протосубтилин ГЗх (2% w/w)	1,9-2,1	12	7,1
Ячмень, Протосубтилин ГЗх (1% w/w)	2,5-2,8	11	12
Пшеница, Протосубтилин ГЗх (2% w/w) + соли металлов	4,3-4,4	23	11,2
Кукуруза, Протосубтилин ГЗх (2% w/w) + соли металлов	2,3	13	15
Ячмень, Протосубтилин ГЗх (1% w/w) + соли металлов	4,1-4,2	19	14,2

Пшеница, Protex 40E (0,1% w/w)	2,1	2	8
Кукуруза, Protex 40E (0,1% w/w)	2,2-2,4	11	–
Ячмень, Protex 40E (0,1% w/w)	0,3-0,5	2	–
Пшеница, Protex 40E (0,1% w/w) + соли металлов	2,3	3	10,5
Кукуруза, Protex 40E (0,1% w/w) + соли металлов	3,2	13	3
Ячмень, Protex 40E (0,1% w/w) + соли металлов	0,5-0,7	2	12,3

Соли марганца, цинка, железа существенно влияют на ассоциированную с клетками протеолитическую активность и, соответственно, на выход биомассы. Оптимальные концентрации солей $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $MnSO_4 \times H_2O$, $FeSO_4 \times 7H_2O$ в среде культивирования составили 1; 0,3; 5-30 мг/л питательной среды соответственно для всех зерновых. Потребление аминокислот из очищенных вакуумной фильтрацией гидролизатов приведено в приложении 1.

При использовании тепловой обработки и ферментного препарата Протосубтилин ГЗх получены энзиматические гидролизаты на основе пшеницы и ячменя. На этих гидролизатах как источниках аминокислот и ростовых факторов *Hbt. salinarum* 353П накапливает биомассу и каротиноиды практически также как и на комплексных субстратах, включающих дорогостоящие триптон, пептон, дрожжевой экстракт. Штамм КСК-03307 на самом лучшем для него ячменном гидролизате способен накапливать до 2,5 г/л биомассы и 30 мг/л БР.

Показана роль микроэлементов в собственной протеолитической активности галоархей, которая способствует более полному усвоению белка зерновых и высокому выходу биомассы.

Культивирование в ферментере с мембранным модулем на энзиматических гидролизатах пшеницы и ячменя с добавками микроэлементов проходит с характеристиками, аналогичными культивированию на среде с триптоном и

дрожжевым экстрактом (п. 3.2.6). Отмечено меньшее ингибирование роста галоархей, чем на традиционных комплексных субстратах, однако, и в этом существует предел прироста биомассы, который составляет 46-48 г/л.

3.4. Хранение биомассы *Hbt. salinarum*, регидратация после высушивания и оптимизация сохранения внутриклеточных каротиноидов

Массовое производство препаратов на основе галоархей, например, биологически активных добавок для человека и животных [853, 1265-1267] требует разработки эффективной, экономически целесообразной процедуры высушивания биомассы с целью длительного сохранения компонентов клетки в состоянии, приближенном к нативному.

Для сохранения клеток галобактерий в коллекциях микроорганизмов используют как методы глубокого замораживания с введением протекторных веществ (глицерин, ДМСО), так и лиофильную сушку, отмечая при этом, что замораживание отрицательно влияет на выживаемость клеток [1268, 1269]. Эксперименты по глубокой заморозке и лиофильной сушке показывают резкое снижение числа жизнеспособных клеток [1218], и для длительного хранения предлагается "liquid drying" (L-drying) метод без замораживания материала [1268], который хорошо себя зарекомендовал для сохранения штаммов в кристаллах (Рисунок 3.9), но не подходит для производственных масштабов.

На первый взгляд, парадоксальным может показаться то, что для микроорганизмов, признанных эталонными по выживаемости в экстремальных условиях, трудно обеспечить высокую сохранность клеток длительное время. Однако, в природных условиях выживает, скорее всего, наиболее устойчивая часть популяции (субпопуляция), которая в дальнейшем при благоприятных условиях становится посевным материалом.

Выживаемость галофилов при изменении условий окружающей среды зависит от физиологического статуса клеток. Наличие некоторых ионов, деривативов бактериоруберина, активность репарирующих систем влияют на

адаптацию к стрессам, переработку метаболитов – источников АФК и устранение повреждений, вызванных интермедиатами активного кислорода [1270-1272].

Высушивание и регидратация – процессы, определяющие жизненный цикл галоархей, происходящие в природе с разной скоростью и зависящие от множества факторов. Отмечено, что галитные кристаллы формируются при активном участии галобактерий [1216], образующиеся структуры могут сильно отличаться и, соответственно, по-разному выполнять защитную функцию. Данные по выделению чрезвычайно древних галофилов и эксперименты в лаборатории свидетельствуют о роли пигментов, структуры кристаллов с инкорпорированными галобактериями, жидких включений, полиплоидии в выживаемости клеток при высушивании/облучении [3, 64, 1218, 1273-1275]. Условия регидратации галофилов обсуждаются недостаточно, в основном, приводятся варианты питательных сред с различным содержанием ионов при стандартных условиях культивирования.

Хорошо изученные варианты высушивания пробиотических культур, термолабильных веществ могут быть полезны для проведения подобных процессов высушивания и с галобактериями. Среди методов высушивания распылительная сушка выделяется экономической эффективностью, быстротой и воспроизводимостью результатов [1205, 1213, 1276]. Распылительная сушка успешно применяется даже для высушивания ферментов, каротиноидов и чувствительных к перегреву культур благодаря малому времени контакта высушиваемого материала и нагретого сушильного агента, высокой скорости испарения влаги. Таким образом, предотвращается или снижается перегрев/повреждение термолабильных компонентов при правильно выбранных условиях ведения процесса [1213, 1277-1281]. Для галоархей такой метод сушки может быть приемлемым, ввиду природной особенности этих микроорганизмов длительное время сохранять жизнеспособность и структуры клетки при высушивании и включении в кристаллы соли.

Учитывая достижения в области распылительной сушки можно ожидать, что галоархеи в стационарной фазе роста будут наиболее устойчивы к быстрому

высушиванию и при хранении благодаря накоплению внутриклеточного калия, как неорганического осмопротектора, деривативов бактериоруберина, уменьшению проницаемости мембраны. В этих условиях клетки лучше переносят тепловой, окислительный стресс и осмотический шок [45, 1213, 1282, 1283], а некоторые из накапливаемых органических веществ галоархей и минеральные соли могут играть роль протекторов при распылительной сушке [1271, 1272, 1213]. Возможно, имеет смысл использовать дикий, наиболее устойчивый тип галоархей и преадаптировать клетки к тепловому и другим видам стресса, что происходит в природе и используется для пробиотиков [1218, 1271, 1283 1284].

Основные параметры процесса распылительной сушки включают: расходы сушильного агента и сжатого воздуха, который обеспечивает распыление, давление в форсунке, расход материала, подаваемого на сушку, температуру сушильного агента на входе и выходе. Особо можно отметить влияние на выживаемость температуры сушильного агента на выходе, которая, в свою очередь, зависит от других вышеперечисленных параметров [1213, 1279, 1281,1282].]

Хотя в данной работе не ставится задача подробно исследовать режимы регидратации, необходимо отметить их важность для реактивации высушенных культур [1213, 1283, 1285]. Скорость реактивации после сушки – одна из зависимых от многих факторов биологических характеристик, которую у галоархей не так просто исследовать. Клетки могут находиться в некультивируемом состоянии и это условно жизнеспособное состояние оценивают косвенными методами, например, с использованием метода быстрой окраски живых/мертвых или проточно цитометическим анализом [1215, 1273]. Отмечается, что такие подходы дают завышенные значения по сравнению с прямыми наблюдениями за ростом клеток. Степень сохранности высушенной биомассы оценивают также по продолжительности лаг-фазы, уровню деградации некоторых компонентов и отдельных структур клетки [1286-1288].

Комплексное изучение изменений клеточных структур, термолабильных веществ после различных вариантов сушки и в процессе хранения с учетом

возможного влияния метаболитов – продуктов окислительной деградации, возможно, позволит получить новую информацию о пределах выживаемости галоархей.

В данном исследовании с использованием искусственных нейронных сетей оптимизировались практически значимые режимы распылительной сушки галоархей и исследовались характеристики высушенной биомассы в процессе длительного хранения. Определение в лабораторных условиях параметров распылительной сушки галофильных микроорганизмов позволит в дальнейшем экстраполировать полученные данные для применения в промышленных масштабах.

3.4.1. Параметры для оптимизации распылительной сушки биомассы галоархей

Выбор диапазона параметров распылительной сушки галобактерий зависел от характеристик, требуемых для получаемого на выходе продукта. Среди этих характеристик высушенной биомассы следует выделить: уровень влажности не более 5%, минимальную деградацию каротиноидов, максимальное содержание клеток, максимальное сохранение жизнеспособности клеток. При выборе температурного режима был взят средний диапазон температур, применяемый при сушке микроорганизмов. При этом максимально допустимая скорость подачи биосуспензии на сушку определялась при минимальных расходах сушильного агента и сжатого воздуха, подаваемого на форсунку, таким образом, чтобы температура сушильного агента на выходе из камеры не опускалась ниже 55 °С, а минимальная допустимая скорость подачи биосуспензии на сушку – чтобы данная температура при максимальных расходах сушильного агента и сжатого воздуха не превышала 80 °С.

В предварительных опытах по подбору режимов распылительной сушки в ряде случаев часть клеток была способна реактивироваться на агаризованной и в жидкой средах после сушки, но недопустимым было снижение концентрации

каротиноидов в некоторых режимах до 65%, а также высокая остаточная влажность высушенных образцов.

Дальнейшая оптимизация параметров распылительной сушки проводилась с использованием искусственных нейронных сетей в режимах распылительной сушки, приведенных в таблице 2.5 которые обеспечивали минимальное разрушение каротиноидов и приемлемую влажность образцов среди предварительно исследованных режимов. Изменение содержания каротиноидов в процессе хранения и влияние метода культивирования (таблица 3.5) также учитывалось в нейросетевой модели.

В серии процессов распылительной сушки получены образцы с влажностью от 1,7 до 5%, содержанием биомассы от 52% до 54%, снижение содержания каротиноидов составило от 5 до 29% для образцов прокультивированных без адсорбента (варианты А) и от 3 до 35% для образцов прокультивированных с адсорбентом (варианты В). Исходное содержание каротиноидов в биомассе $29 \pm 2,3$ мг/100 г АСБ для культивирования без адсорбента (вариант А) и $17 \pm 1,3$ мг/100 г АСБ для культивирования с адсорбентом (вариант В). Необходимо отметить, что в таблице 3.5 приведено содержание каротиноидов для высушенных образцов, содержащих не только АСБ, но и значительное количество соли, кристаллизующейся из суспензии.

Таблица 3.5. Хранение распылительно высушенных образцов.

Образцы "А"									
N	Время хранения, месяцев								
	0			4			12		
	$\mu_{\max}, \text{ч}^{-1}$	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г	$\mu_{\max}, \text{ч}^{-1}$	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г	$\mu_{\max}, \text{ч}^{-1}$	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г
1	0,0081±0,0021	-	12,25±0,93	0,0517±0,0080	-	10,58±1,78	0,0047±0,0007	-	4,68±0,32
2	0,0062±0,0018	-	13,02±1,07	0,0411±0,0067	-	12,38±1,23	0,0048±0,0012	-	4,78±0,37
3	0,0077±0,0016	-	12,64±0,90	0,0515±0,0078	-	10,52±1,56	0,0061±0,0008	-	5,26±1,29
4	0,0057±0,0017	-	12,17±0,85	0,0480±0,0069	-	12,16±0,75	0,0055±0,0008	-	4,94±1,18
5	0,0067±0,0017	-	13,53±1,04	0,0524±0,0072	-	9,68±0,76	0,0036±0,0009	-	4,06±0,91
6	0,0062±0,0019	-	12,70±1,18	0,0377±0,0141	-	10,07±1,84	0,0041±0,0010	+	3,82±0,96
7	0,0040±0,0006	-	13,15±1,47	0,0574±0,0094	-	10,39±2,46	0,0073±0,0012	-	4,15±0,37
8	0,0120±0,0021	-	12,32±1,18	0,0622±0,0096	+	10,71±2,42	0,0039±0,0006	-	3,85±0,37
9	0,0080±0,0011	-	13,92±1,24	0,0496±0,0087	-	10,71±1,35	0,0045±0,0008	-	4,03±0,36
10	0,0047±0,0006	-	12,57±1,24	0,0460±0,0133	-	11,61±2,43	0,0047±0,0011	-	5,22±0,45
11	0,0083±0,0014	-	11,10±1,25	0,0520±0,0153	+	10,97±1,85	0,0074±0,0017	-	5,58±0,40
12	0,0056±0,0010	-	14,75±1,81	0,0385±0,0057	+	12,19±3,03	0,0060±0,0017	+	4,65±0,39
13	0,0084±0,0016	-	12,19±1,02	0,0584±0,0096	-	9,89±0,78	0,0045±0,0013	-	4,12±0,28
14	0,0057±0,0009	-	12,76±1,21	0,0546±0,0086	-	9,94±1,12	0,0037±0,0011	-	4,04±0,86
15	0,0074±0,0011	-	11,74±0,93	0,0560±0,0138	+	10,52±1,64	0,0047±0,0013	-	5,52±0,53
16	0,0052±0,0008	-	13,15±1,80	0,0450±0,0107	-	10,39±1,41	0,0041±0,0010	-	4,11±0,69

Таблица 3.5 (продолжение). Хранение распылительно высушенных образцов.

Образцы "В"									
N	Время хранения, месяцев								
	0			4			12		
	$\mu_{\max}, \text{ч}^{-1}$	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г	$\mu_{\max}, \text{ч}^{-1}$	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г	$\mu_{\max}, \text{ч}^{-1}$	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г
1	0,0057±0,0018	-	6,54±0,44	0,0274±0,0042	+	6,35±0,57	0,0037±0,0012	-	2,37±0,19
2	0,0062±0,0019	-	5,97±0,45	0,0648±0,0120	-	5,52±1,18	0,0035±0,0008	-	2,05±0,13
3	0,0047±0,0013	-	8,66±0,71	0,0328±0,0057	-	6,48±0,78	0,0027±0,0007	+	1,86±0,16
4	0,0043±0,0013	-	8,27±0,81	0,0730±0,0193	-	6,22±1,16	0,0031±0,0005	+	1,03±0,24
5	0,0053±0,0015	-	7,50±0,80	0,0460±0,0125	-	6,61±1,70	0,0032±0,0008	-	3,34±0,83
6	0,0038±0,0010	-	6,61±0,59	0,0797±0,0120	-	6,35±1,51	0,0047±0,0007	-	1,26±0,32
7	0,0064±0,0010	+	7,18±0,54	0,0421±0,0070	+	6,54±1,49	0,0027±0,0007	+	2,76±0,64
8	0,0095±0,0014	+	6,29±0,62	0,0757±0,0112	+	5,97±1,48	0,0044±0,0007	+	1,94±0,44
9	0,0055±0,0010	-	6,74±0,59	0,0430±0,0109	+	6,29±1,29	0,0021±0,0006	-	1,76±0,36
10	0,0053±0,0010	+	6,29±0,80	0,1050±0,0177	+	5,82±1,37	0,0089±0,0013	-	0,98±0,21
11	0,0066±0,0011	+	6,35±0,63	0,0370±0,0097	+	5,45±1,31	0,0023±0,0007	+	1,68±0,42
12	0,0036±0,0006	+	8,88±0,79	0,0747±0,0125	+	6,03±1,42	0,0021±0,0007	+	1,35±0,32
13	0,0049±0,0008	-	8,47±0,55	0,0434±0,0065	-	6,95±0,54	0,0035±0,0010	-	3,86±0,44
14	0,0033±0,0005	-	6,35±0,62	0,0630±0,0147	-	6,16±0,39	0,0042±0,0012	-	1,73±0,29
15	0,0036±0,0006	-	7,83±0,88	0,0360±0,0100	-	6,92±0,64	0,0025±0,0007	-	3,39±0,72
16	0,0040±0,0006	-	6,27±0,54	0,0670±0,0194	-	5,89±0,64	0,0023±0,0007	-	2,12±0,36

3.4.2. Сканирующая электронная микроскопия и гранулометрический состав высушенной биомассы галоархей

В выбранных для оптимизации режимах распылительной сушки получают сферические гранулы с инкапсулированными в них галоархеями. Морфология частиц сильно варьируется, во всех вариантах присутствуют структуры, приведенные на рисунке 3.22. Рыхлые и полые гранулы в большом количестве получают при большей температуре сушильного агента на входе, а более плотные и сглаженные – при меньшей. На поверхности образцов различимы палочковидные и сферические образования – высушенные галоархеи, причем у лиофильно высушенного образца они имеют в 2-3 раза меньшие размеры, чем у образцов распылительно высушенных.

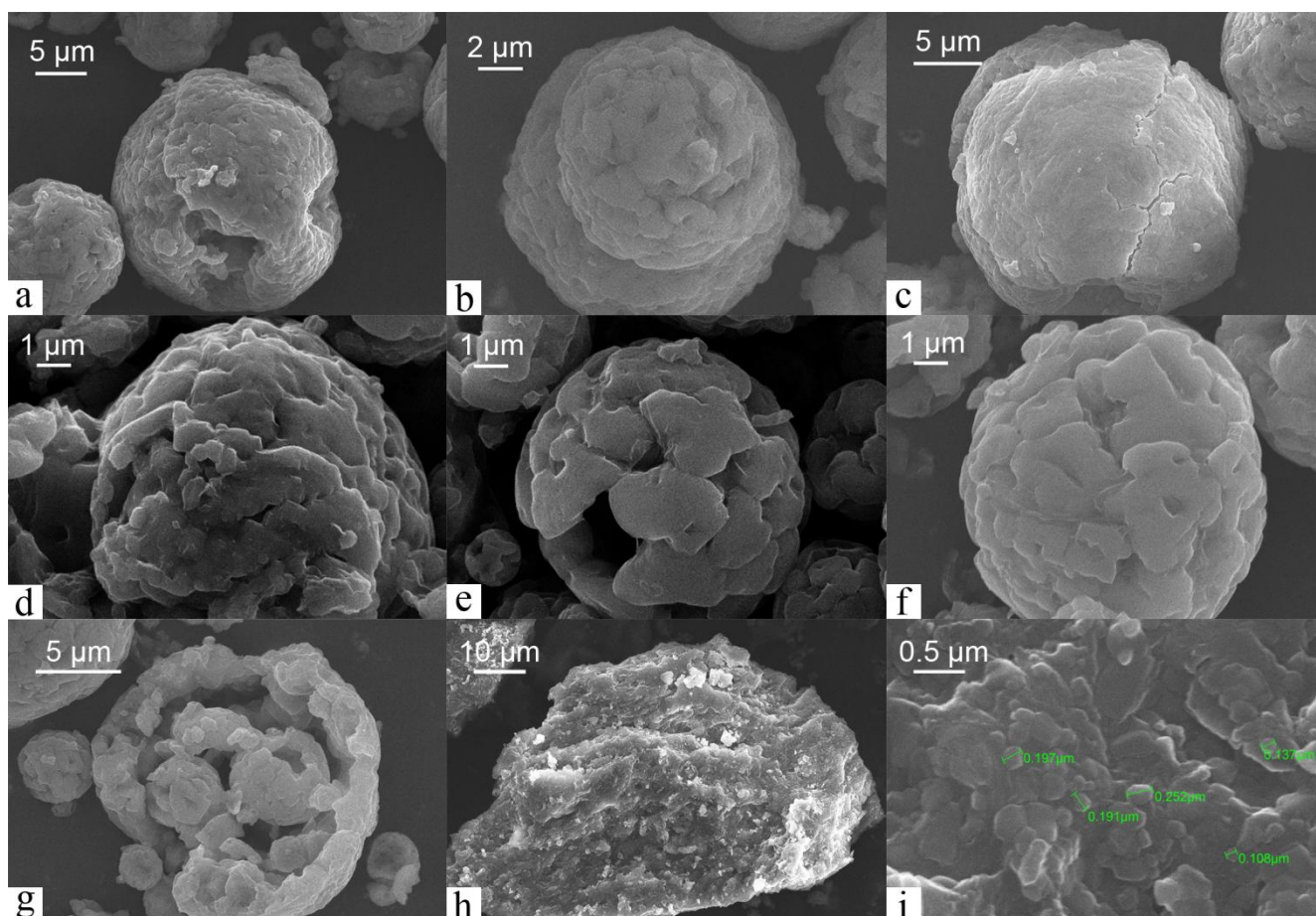


Рисунок 3.22. СЭМ частиц, полученных при распылительной сушке (a-g) и лиофильно высушенного, перемолотого образца (h, i).

Расход сжатого воздуха и скорость подачи биомассы оказывает значимое влияние на размер формируемой капли и, как следствие, на количество подводимой тепловой энергии для удаления влаги из капли. Размер капли минимален при максимальном расходе сжатого воздуха, подаваемого на форсунку, и минимальной скорости подачи биомассы.

При формировании мелких капель значительно увеличивается площадь контакта жидкой фазы и сушильного агента, при этом скорость сушки и интенсивность ее протекания возрастают, что может привести к перегреву формируемой частицы и значительному тепловому шоку бактерий. Риск перегрева капель малого размера возрастает при повышении температуры сушильного агента на входе в камеру и при увеличении его расхода. Образцы режимов сушки 13 и 5 подвергались наибольшему стрессированию, 4 и 12 – наименьшему среди вариантов таблицы 3.5. Остальные варианты испытывали промежуточные воздействия температуры и баростресса. Средние диаметры частиц в режимах 13 и 5 были 11-14 мкм. Частицы со средним диаметром 22-26 мкм были получены в режимах 4 и 12 (Рисунок 3.23).

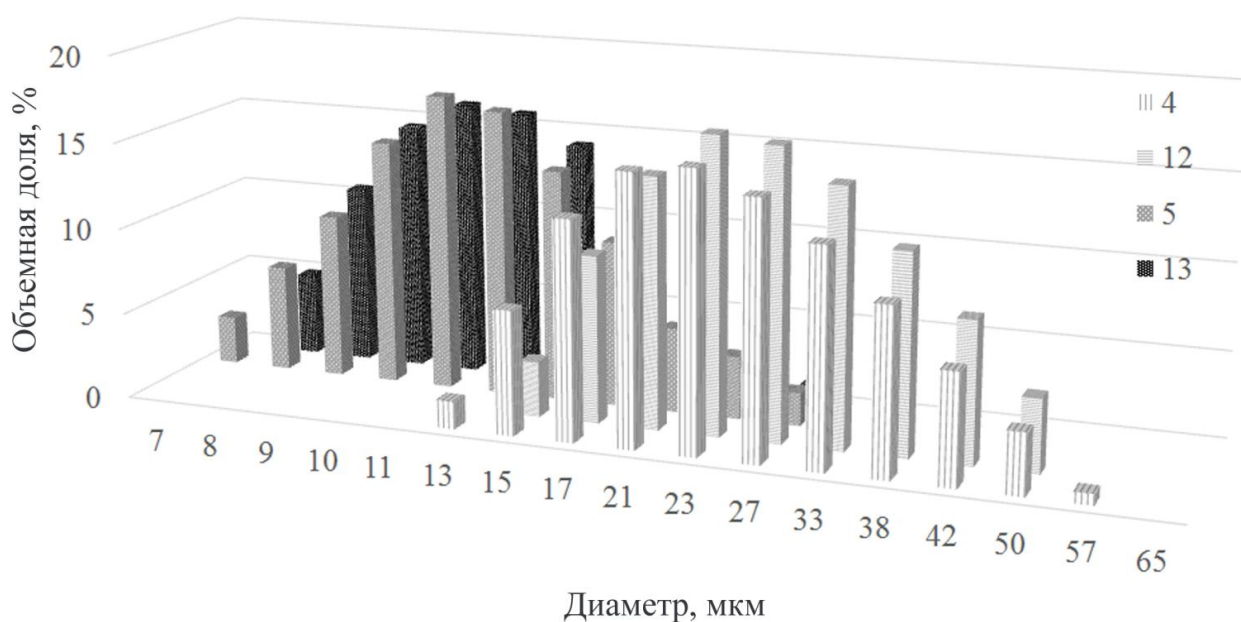


Рисунок 3.23. Распределение по размерам частиц вариантов 4, 12, 5, 13, полученных при распылительной сушке.

Полученные образцы регидратировали в минеральной основе и культивировали на агаризованной и в жидкой средах.

Даже в одной серии высевок на агаризованную среду образцов, подвергшихся температурному воздействию при распылительной сушке не удавалось подсчитать точно количество выросших колоний, т.к. результаты отличались иногда на несколько порядков или рост колоний отсутствовал. Использование LIVE/DEAD BacLight Kit также не давало корректных, сходящихся результатов, возможно, из-за большого количества мешающих фрагментов – остатков разрушенных после регидратации клеток. В таком случае в таблице 3.5 отмечены варианты, показывающие хотя бы факт роста колоний в серии опытов без количественной оценки. Следует отметить, что эти колонии могли вырасти через 2-3 месяца после начала культивирования, а расчетное КОЕ/г биомассы варьировалось от 10^3 и до 10^7 . Клетки, выросшие без использования адсорбента (вариант А культивирования) и распылительно высушенные, сразу после сушки практически не показывали рост на агаризованной среде. У лиофильно высушенных образцов возможно было подсчитать КОЕ.

Характерные кривые роста образцов распылительно высушенных в жидкой среде приведены на рисунке 3.24 и имеют ряд особенностей: нарастание оптической плотности и резкое ее падение с последующим возобновлением роста. Это отличает их от лиофильно высушенных образцов.

Микроскопирование в процессе культивирования показало, что изначально делятся клетки сферической формы, которые через некоторое время преобразуются в палочки. Падение оптической плотности связано именно с этим процессом. Нарастание оптической плотности на втором участке рисунка связано с делением палочковидных галобактерий а также с делением и скоростью преобразования оставшихся сферопластов в палочки. В таблице 3.5 приведена воспроизводимая для серии опытов величина максимальной удельной скорости роста (μ_{max}), рассчитанная после наблюдаемого падения оптической плотности и возобновления роста. Можно полагать, что эта величина, зависящая также от

концентрации метаболитов-ингибиторов, вышедших в среду, в какой-то мере отражает скорость реактивации культуры. Время локального минимума на кривой оптической плотности также может являться характеристикой реактивации культуры.

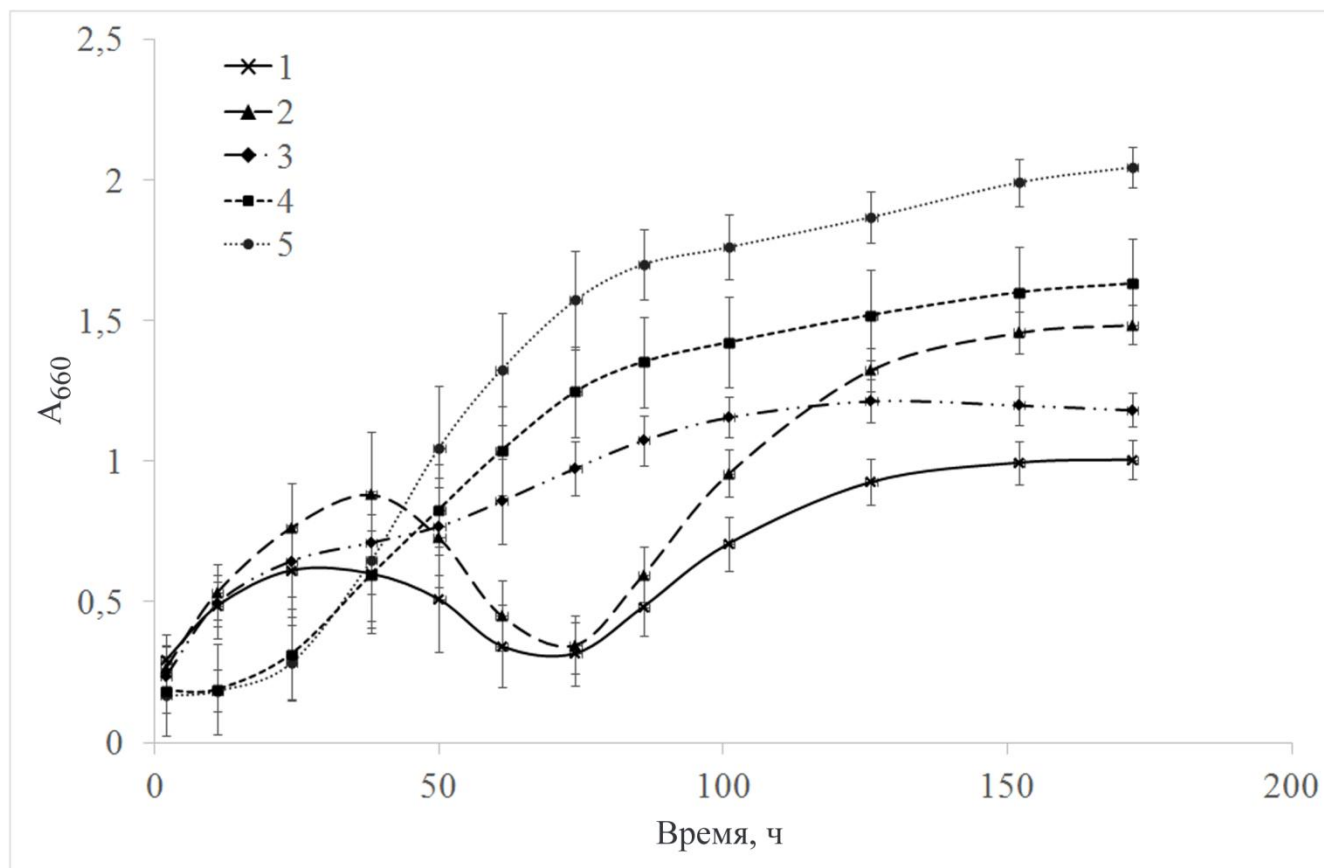


Рисунок 3.24. Типичные кривые роста для различных образцов: 1 и 2 – распылительно высушенные после культивирования в вариантах А и В соответственно; 3 – лиофильно высушенный; 4 и 5 – свежий посевной материал – суспензии жизнеспособных галоархей после культивирования в вариантах А и В соответственно.

3.4.3. Фазово-контрастная микроскопия

Фазово-контрастная микроскопия проводилась с фиксацией растворенных в минеральной среде образцов глутаровым альдегидом. Галоархеи в этих условиях не изменяют форму, и рисунок 3.25 отражает реальную форму клеток в кристалле.

Для представления в настоящем работе здесь и далее выбраны репрезентативные варианты сушки: 4 – менее повреждающий, мягкий режим сушки, 13 – наиболее жесткий среди режимов, приведенных в таблице 2.5.

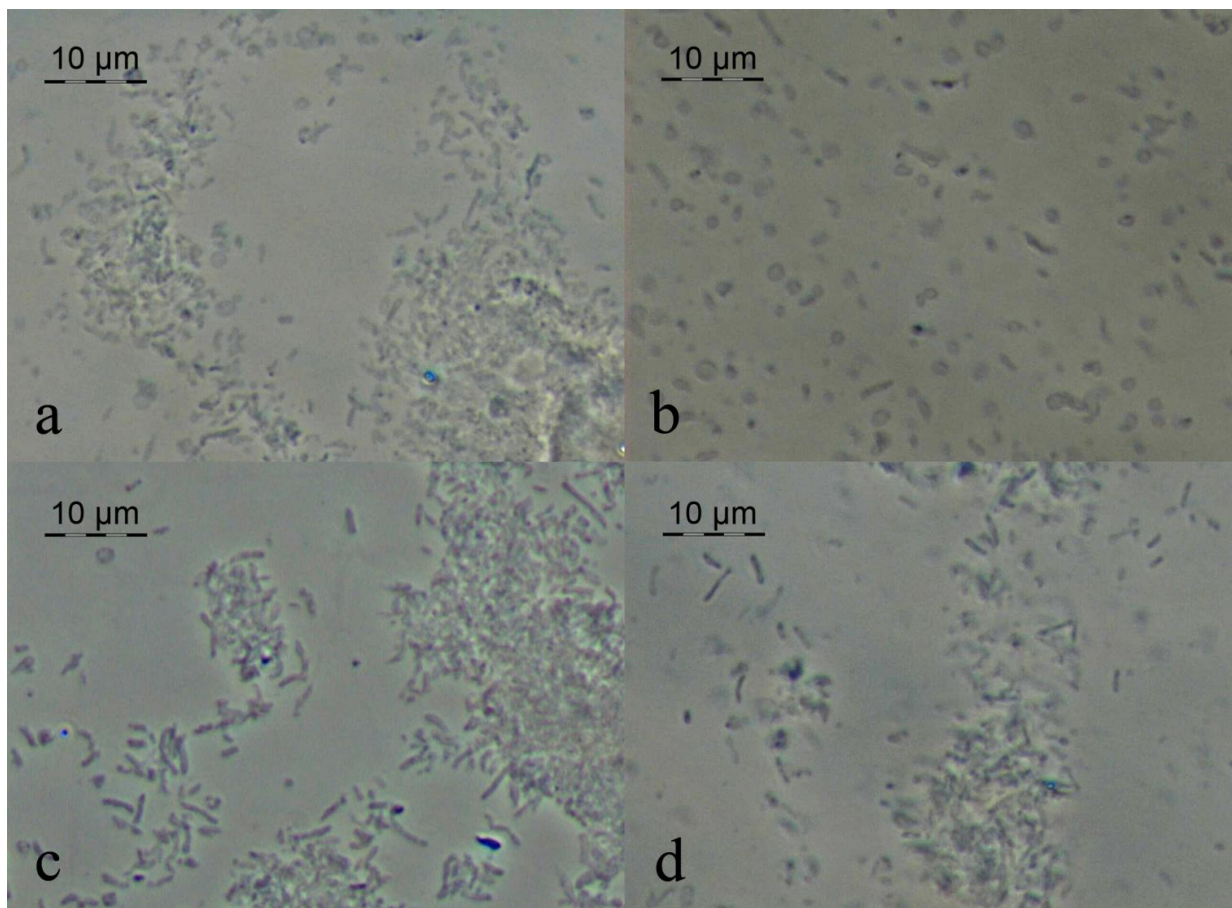


Рисунок 3.25. Фазово-контрастная микроскопия с фиксацией глутаровым альдегидом образцов: (a) 4А – сразу после распылительной сушки; (b) 13А – после одного года хранения; (c) 13В – после одного года хранения; (d) лиофильно высушенный В вариант культивирования после года хранения.

Образцы 4А (сразу после сушки) и 13А (1 год хранения), полученные после распылительной сушки (таблица 3.5), содержали как палочки, так и агломераты, и кокки. Лيوфильно высушенный образец и образец 13В, полученные после распылительной сушки прокультивированных с адсорбентом галоархей, содержали, в основном, палочки и после 2-х лет хранения при 4° С (Рисунок 3.25). Сравнение образцов зафиксированных глутаровым альдегидом сразу после

распылительной сушки и хранения не показывали значимых изменений в морфологии клеток, в то время как клетки без фиксации распадались в минеральной солевой основе или приобретали сферическую форму.

3.4.4. Электронная микроскопия ультратонких срезов клеток галоархей

Интактность, целостность цитоплазматической мембраны для клетки является определяющим фактором ее жизнеспособности. Такие механические повреждения, как локальный разрыв цитоплазматической мембраны приводят к гибели микробной клетки. Электронная микроскопия тонких срезов клеток, подвергшихся тому или иному физическому воздействию, сопряженному с интенсивным высушиванием, лиофилизацией микробной биомассы, позволяет визуально детектировать такие летальные повреждения оболочки и оценить их масштаб для каждого конкретного метода высушивания (Рисунок 3.26).

Образец 4А непосредственно после распылительной сушки.

Интактные клетки характеризовались хорошей сохранностью клеточных стенок. Нуклеоид располагался в центральной части клеток и занимал значительный объем внутриклеточного пространства. Рибосомальный контент находился главным образом на периферии клетки.

Характер повреждений клеток: единичные или множественные разрывы оболочек, сопровождаемые частичным или полным выходом содержимого клетки в межклеточное пространство.

Образцы 13А и 13В после 1 года хранения.

Интактные клетки в вариантах 13А и 13В характеризовались истонченной оболочкой, главным образом вследствие практически отсутствующей клеточной стенки. На ультратонких срезах редких интактных клеток отчетливо видна не поврежденная по всему периметру клетки цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка практически не выявлялась.

Нуклеоид располагался в центральной части клеток и занимал значительный объем внутриклеточного пространства. Рибосомальный контент находился главным образом на периферии клетки, как и в варианте 4А.

Характер повреждений клеток: клетки большей частью разорваны иногда пополам, иногда – на несколько частей, что сопровождалось выбросом содержимого клеток в межклеточное пространство. Значительная часть клеток этого варианта имела локальные единичные или множественные повреждения всей оболочки. Внутрицитоплазматическое содержимое таких клеток представлено плотным гомогенным слоем на периферии цитоплазмы и/или единичными сферическими, схожими по плотности образованиями в зоне нуклеоида. Таким образом, рибосомальный контент практически спрессован в однородную массу, по видимому, в результате воздействия высокого давления направленного изнутри клетки.

Лиофильно высушенный образец В после года хранения.

Клетки находились в конгломератах, внутри которых тесно примыкали друг к другу. Интактные клетки этого варианта в отличие от интактных клеток вариантов 4А и 13 характеризовались значительно меньшим по объему нуклеоидом и обширной, плотной цитоплазмой. Клеточная стенка интактных клеток очень тонкая и неравномерная по толщине (по сравнению с образцами режима распылительной сушки 4А).

Характер повреждений клеток: часть клеток в конгломератах имела локальные разрывы в оболочках. В отличие от вариантов 4А и 13 эти повреждения сопровождалось выходом ДНК из клеток (процесс похож выдавливание) в узкое (вследствие плотной упаковки клеток в конгломератах) межклеточное пространство.

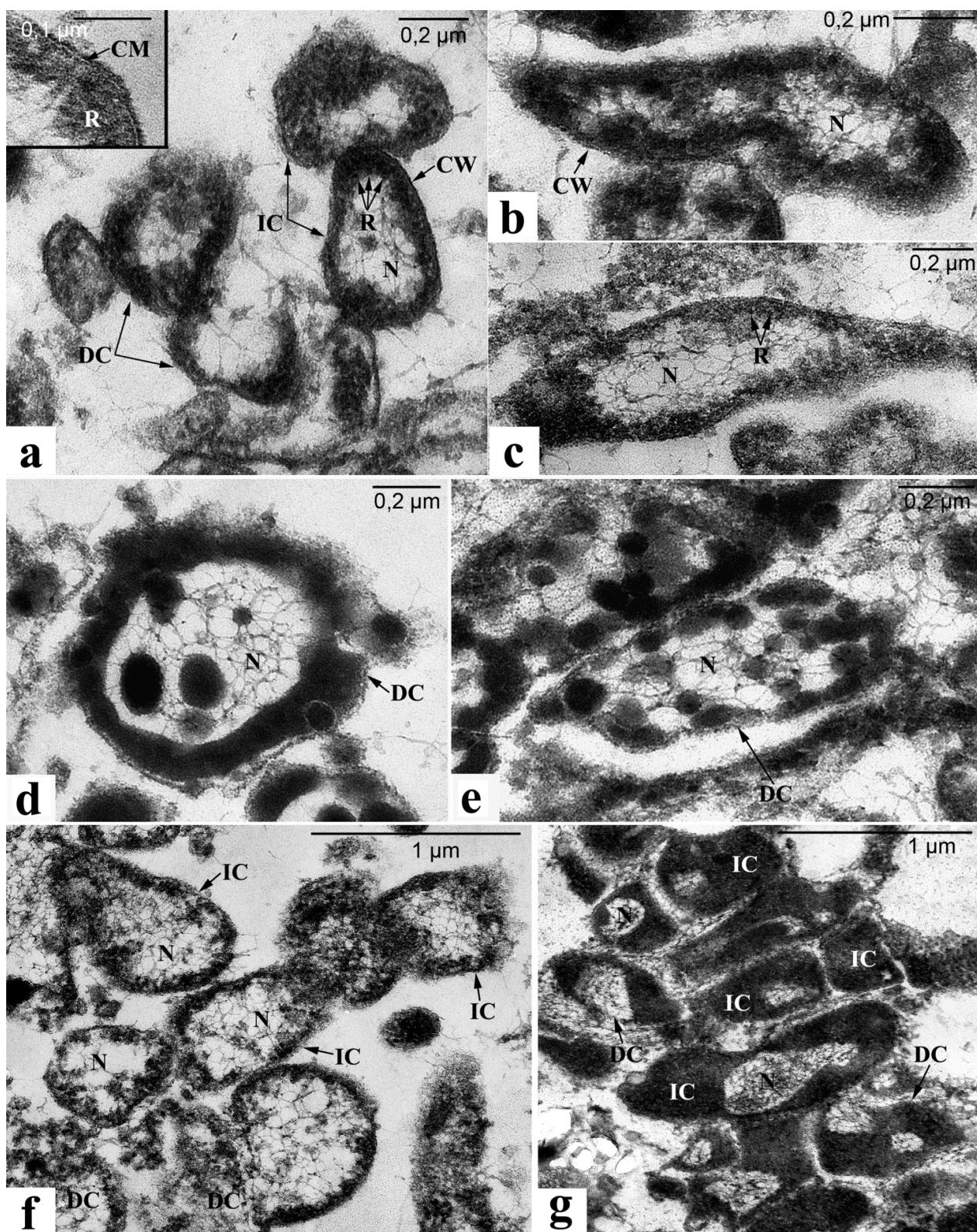


Рисунок 3.26. Ультратонкие срезы клеток: (а-с) 4А – непосредственно после распылительной сушки; (d) 13А – после года хранения; (e,f) 13В – после года хранения; и (g) лиофильно высушенный “В” образец (культивирование с адсорбентом) после года хранения. DC – разрушенные клетки, IC – интактные клетки, N – нуклеоид, CM – цитоплазматическая мембрана, CW – клеточная стенка, R – рибосомы.

3.4.5. Хранение высушенных образцов биомассы галоархей

В процессе хранения в течение 1 года образцы почти не набирали влагу – увеличение содержания влаги в них составило до 0,5%, что несущественно.

Сразу после распылительной сушки образцы плохо реактивировались, что видно из данных по высевам на агаризованную среду и максимальной удельной скорости роста (μ_{\max}), которая наблюдалась после минимума оптической плотности, который приходился на 80-110 час.

Через 4 месяца хранения при 4 °С содержание каротиноидов упало в образцах А на 14-32%, в образцах В – на 24-40%. Минимум оптической плотности сместился к 55-75 часам (Рисунок 3.24), а μ_{\max} выросла на порядок и была больше в образцах В, достигая в варианте 10В значения $\mu_{\max}=0,105 \text{ ч}^{-1}$ (Таблица 3.5). В целом, реактивация образцов В происходила лучше, а на агаризованной среде высевалось больше А и В образцов. Шесть месяцев хранения (данные не приведены) приводили к ухудшению показателей на 10-15%.

В образцах сроком хранения 1 год содержание каротиноидов упало на 64-75% в образцах А и на 58-89% в образцах В. На порядок упала μ_{\max} и высеваемость на агаризованной среде, а минимум оптической плотности варьировался от 90 до 150 часов культивирования.

Для всех распылительно высушенных в изученных режимах (Таблица 2.5) образцов галоархей, сохранявшихся при 4 °С, отмечено улучшение характеристик реактивации после 4 месяцев хранения и ухудшение этих характеристик при последующем хранении. Такие данные, с одной стороны, свидетельствуют о процессах репарации повреждений, которые происходят при низкой температуре в кристаллах и малом влагосодержании. С другой стороны, при более длительном хранении возможно отравление клеток метаболитами.

Прооксидантные свойства среды культивирования заметно влияют на выработку каротиноидов и в то же время ухудшают показатели реактивации галоархей после распылительной сушки и хранения. Галоархеи в распылительно высушенных образцах “В” (культивирование с применением адсорбента,

устранением метаболитов и продуктов окисления самой среды) лучше сохраняют свою структуру при внедрении в кристалл и реактивируются. Можно предположить, что даже при первоначальном устранении метаболитов (при культивировании с адсорбентом, “В” варианты) поврежденные и окислившиеся компоненты клеток после распылительной сушки уже в кристалле негативно влияют на жизнеспособные клетки. Большая концентрация клеток в нашем случае и минимальная, но присутствующая влажность способствуют контакту метаболитов с клетками. Уменьшение концентрации клеток во всех режимах распылительной сушки (Таблица 2.5) приводило к увеличению срока жизнеспособности галоархей (данные не представлены). Необходимо исследовать, связан ли этот эффект с уменьшением контакта метаболитов с клетками или защитной ролью солей.

Еще одним фактором сохранения жизнеспособности может являться пигментация клеток. С одной стороны, каротиноиды устраняют АФК в процессе культивирования, но продукты деградации каротиноидов и липидов сами обладают прооксидантными свойствами, и могут являться одними из метаболитов, негативно влияющими на клетки в кристалле [653].

Сравнение режимов распылительной сушки показало роль температуры сушильного агента на входе в камеру, расхода сжатого воздуха, подаваемого на форсунку, расхода суспензии галоархей и способа культивирования (варианты А и В) на выживаемость клеток. Наилучшими характеристиками по реактивации в жидкой среде на 4 месяц хранения обладали образцы “В” таблицы 3.5 (с удалением метаболитов, $T_{da}=120$ °С), среди которых клетки из 4В, 12В высевались на агаризованную среду после 2-х лет хранения при 4 °С, хотя время реактивации могло составлять до нескольких месяцев.

Анализ поверхностей отклика, полученных с помощью ИНС моделирования позволил определить следующие условия ведения процесса сушки для двух случаев как оптимальные:

1. При сушке биомассы, полученной при культивировании без адсорбента (варианты “А”): температура сушильного агента на входе в камеру –

120÷130 °С, расход сушильного агента – 30÷31 м³/ч; расход подаваемого на форсунку сжатого воздуха – 831 л/ч, скорость подачи биосуспензии – 5,7 г/мин.

2. При сушке биомассы, полученной при культивировании с применением адсорбента (варианты “В”): температура сушильного агента на входе в камеру – 120÷135 °С, расход сушильного агента – 30÷31 м³/ч; расход подаваемого на форсунку сжатого воздуха – 831 л/ч, скорость подачи биосуспензии – 5 г/мин.

Лиофильная сушка обладает, конечно, менее повреждающим действием, чем распылительная. После года хранения у лиофильно высушенных образцов содержание каротиноидов было как у распылительно высушенных после 4-х месяцев хранения. Проход через форсунку, распыление суспензии и, соответственно, атомизация частиц, баростресс, высокая температура создают тот набор стрессоров [1209], который угнетает клетки и разрушает БАВ в распылительно высушенных образцах при хранении. Для уменьшения механического стрессирования можно рекомендовать использовать сушилку с дисковым распылителем. Хранение образцов весь период в темноте также может сказываться на репарации повреждений у галоархей, а т.к. у них существует механизм световой репарации [668] можно оптимизировать и с этой точки зрения хранение биомассы.

Оптимизация распылительной сушки галобактерий с высокой концентрацией клеток выявила диапазоны параметров, приемлемые для сохранения биомассы и биологически активных веществ галоархей в солевых гранулах при температуре 4 °С в течение 4-6 месяцев после высушивания. Найдены оптимальные с точки зрения реактивации клеток и сохранности каротиноидов режимы распылительной сушки, изучены характеристики инкапсулированных в соль клеток галобактерий в процессе длительного хранения. С помощью электронной микроскопии установлен характер повреждений клеток.

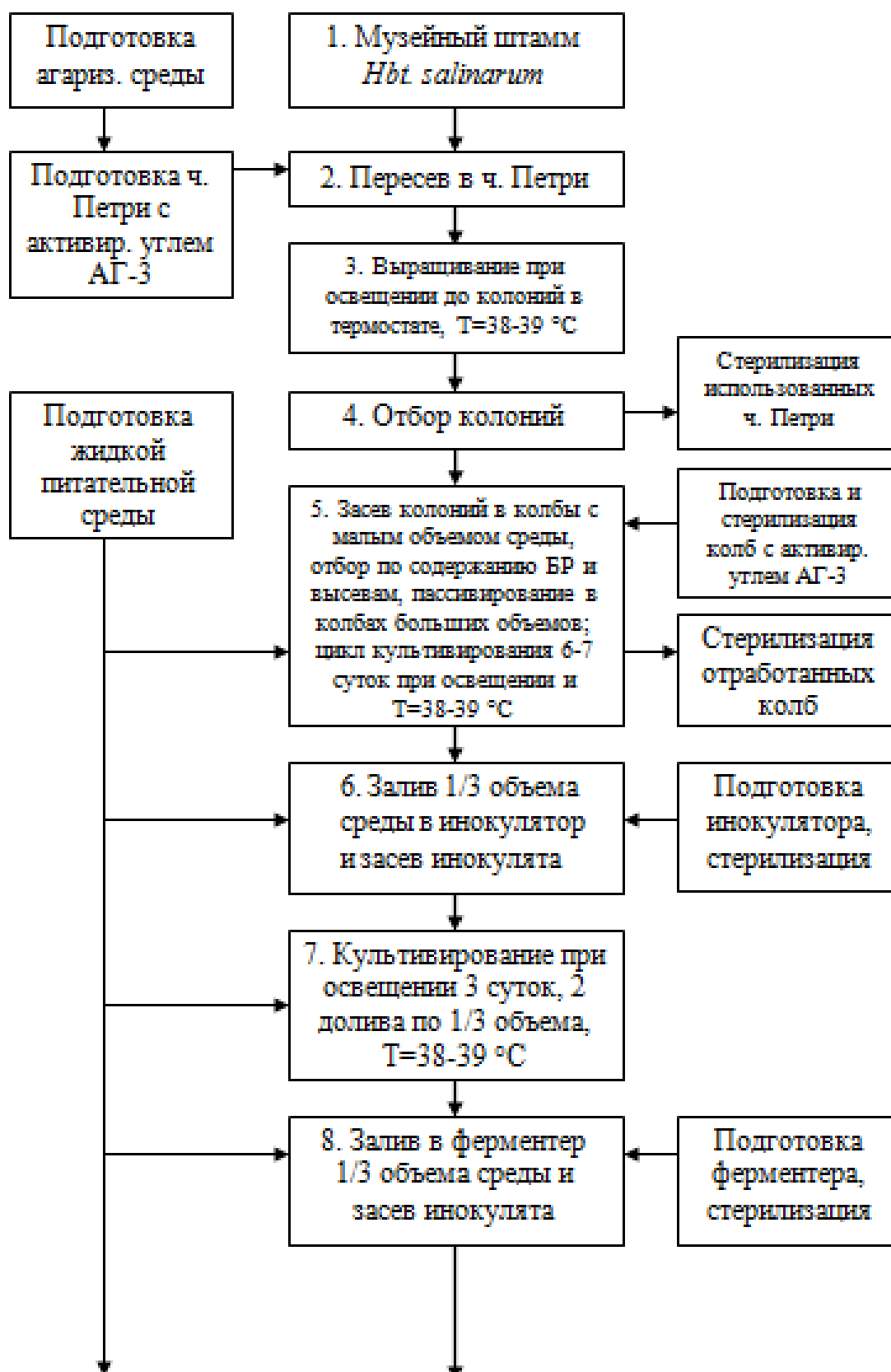
Установлен факт сохраняющейся активности, восстановления жизнеспособности клеток галоархей в высушенном состоянии в солевых гранулах

при низкой остаточной влажности до 5% и низкой температуре. Для комплексного описания высушенных образцов предложено использовать биологические характеристики глубинного культивирования, отражающие скорость реактивации клеток.

Исследование показало отрицательное влияние метаболитов, вырабатываемых при культивировании галобактерий, на показатели реактивации при длительном хранении после высушивания. С другой стороны, удаление метаболитов при культивировании галоархей, способствует после сушки более длительному сохранению жизнеспособности части клеток и улучшению показателей реактивации.

Получены новые данные по высушиванию в критических, повреждающих клетки галобактерий режимах: при высоких скоростях испарения воды и кристаллизации солей, высокой температуре, механическом и окислительном стрессах.

3.5. Техничко-экономические показатели производства бактериородопсина и биомассы *Hbt. salinarum* при различных вариантах исполнения





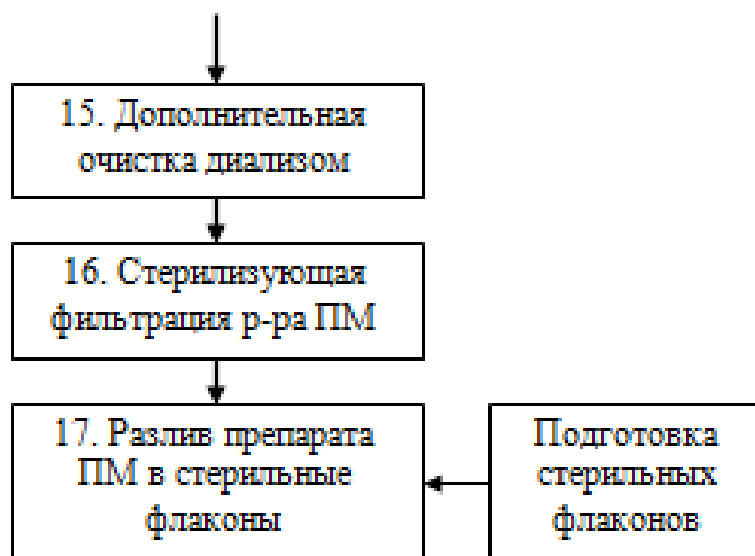


Рисунок 3.27. Блок-схема производства бактериородопсина.

3.5.1. Особенности реализации элементов технологического процесса

Выбор и особенности работы технологического оборудования в составе технологической схемы во многом зависят от объемов выпуска продукта, условий размещения производства и квалификации персонала. В данном разделе описывается вариант технологического оформления, ориентированный на выпуск БР в составе пурпурных мембран производительностью 20 кг/год. Такой годовой выпуск обосновывается потребностями научных организаций и средних фирм, занимающихся выпуском биоэлектроники, а также БАД и косметики, т.к. производство БР легко переориентировать на выпуск биомассы галоархей мощностью 500-1000 кг/год.

Технологический процесс включает множество мелких стадий, которые подробно рассматриваются в регламенте. В данном пункте приводится обобщенная версия оптимизированного технологического процесса, который послужил основой для создания регламента производства БР и высушенной биомассы (Приложение 6). Технологическая схема представлена в приложении 3 (Рисунок ПЗ.1). В целом, логика технологического процесса соответствует пп. 3.2.1-3.2.7 диссертации.

Стадия ВР 1.1. Приготовление питательной среды.

Для выращивания галобактерий используется свежеприготовленная комплексная среда:

- базовый солевой раствор (может длительно храниться) готовится на дистилляте:

- 250 г/л NaCl;
- 20 г/л $MgSO_4 \times 7H_2O$;
- 3 г/л KCl;
- 3 г/л цитрат Na;
- $CaCl_2$ – 0,2;

- жидкая питательная среда готовится на базовом солевом растворе с добавлением триптона, дрожжевого экстракта и глицерина:

- 5 г/л триптона Serva;
- 2 г/л дрожжевого экстракта Organotechnie;
- 4 мл/л глицерина ($\rho^{37^\circ C} = 1251,41$ г/л) \Rightarrow 5 г/л.

Прозрачность и питательная ценность среды в значительной степени зависит от триптона и дрожжевого экстракта, которые являются источниками углеродного и азотного питания, источником фосфора, ростовых факторов, а также микроэлементов. Как показывает практика производства, качество триптона и NaCl являются наиболее критичными для выработки БР, иногда варьируется от партии к партии выпуска и должно строго контролироваться на входе. Для восполнения вариаций в составе дрожжевого экстракта дополнительно вводятся микроэлементы в составе солей, г/л: $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001, $MnSO_4 \times H_2O$ – 0,0003, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,005-0,030. В качестве защитных агентов в начале ферментации и при смене адсорбента добавляются антиоксиданты, г/л: цистеин – 0,2; токоферол – 0,045; аскорбиновая кислота – 0,15. Микроэлементы и антиоксиданты стерилизуются фильтрацией и вносятся в виде концентратов.

Вместо дистиллята для получения солевого раствора можно использовать водопроводную воду с контролем содержания ионов железа и уровня хлорирования или предусмотреть дополнительную очистку водопроводной воды.

Приготовление раствора солей производится в емкости поз. Е1 (Приложение 3, Рисунок ПЗ.1), снабженной циркуляционным насосом поз. НЦ1, механическими фильтрами поз. ФР1, ФР2. Для контроля засорения на входе и выходе фильтров установлены дифманометры.

Приготовление концентратов триптона, дрожжевого экстракта и глицерина осуществляется в реакторе поз. Р1, снабженным циркуляционным насосом поз. НЦ2 и встроенным нагревателем. Из емкости поз. Е1 в реактор перекачивают раствор солей и добавляют расчетное количество триптона, дрожжевого экстракта и глицерина.

Приготовление раствора HCl для подтитровки осуществляется в емкости поз. Е3. В емкость заливают базовый солевой раствор и HCl, перемешивают циркуляционным насосом поз. НЦ3.

Приготовление 25%-ного раствора NaCl для операций ресуспендирования БР в процессе очистки осуществляется в емкости поз. Е4. В емкость заливают воду, засыпают расчетное количество NaCl, перемешивают циркуляционным насосом поз. НЦ4. В емкости предусмотрена рубашка для стерилизации паром.

Приготовление рабочего раствора питательной среды осуществляется в емкости поз. Е7, в которую подается базовый раствор из емкости поз. Е1 насосом поз. Н1, концентрат триптона, дрожжевого экстракта и глицерина из реактора поз. Р1 насосом поз. Н2. Раствор перемешивают до полной гомогенности насосом поз. НЦ5 и из емкости поз. Е3 насосом поз. Н4 подтитровывают при необходимости раствором HCl (как показала практика, щелочь обычно не требуется) до значения pH 6,8-7,0. Питательная среда не готовится заранее и не хранится более суток.

Снижение себестоимости возможно при тщательном выборе триптона, NaCl и возможном использовании водопроводной воды. Для снижения вероятности неудачных ферментаций необходим входной контроль компонентов питательной среды на бактериальную и вирусную обсемененность.

Стадия ВР 1.2. Стерилизация питательной среды.

Галоархеи выращивают в стерильной питательной среде, для чего используется система: нагреватель – поз. КГ, выдерживатель – поз. ВД, теплообменник охлаждения ТО1. Рекомендуемая температура среды при стерилизации – 121 °С, проток среды через выдерживатель рассчитывается и тестируется в реальных условиях. Необходимо максимально сократить время выдерживания и охлаждения питательной среды для сохранения ее питательной ценности.

Снижение себестоимости возможно при замене блока стерилизации нагревом (пар под давлением или электрический подогрев) системой стерилизующей фильтрации. Для этого опробована системы ультрафильтрации с полуволоконными и кассетными мембранными модулями на основе полиакрилонитрила и полиэфирсульфона. Варианты с полиакрилонитрилом дешевы, но не выдерживают стерилизации паром и вымачиваются перед использованием в растворе щелочи и пероксида водорода. Полиэфирсульфонные модули стерилизуются паром. Ультрафильтрация с молекулярно-массовым отсечением 50 кДа необходима, в том числе, для задержки вирусных частиц.

Стадия ТП 1. Выращивание биомассы галобактерий.

Процесс выращивания биомассы галобактерий можно разбить на несколько стадий, согласно этапам блок схемы 1-9 (Рисунок 3.27), основные из них можно обобщить как:

- выращивание чистой культуры в качалочных колбах ТП 1.1;
- выращивание клеток галобактерий в инокуляторе: $V = 0,04 \text{ м}^3$ ТП 1.2;
- выращивание биомассы галобактерий в 2 ферментерах $V = 0,2 \text{ м}^3$ ТП 1.3.

Необходимым условием получения кондиционного продукта является микробиологический контроль, контроль каротиноидов, БР и оптической плотности.

Стадия ТП 1.1. Выращивание чистой культуры в качалочных колбах.

Стандартный готовый раствор питательных солей, полученный на стадии ВР 1.1, через пробоотборную точку на емкости поз. Е1 отбирают для

приготовления 4%-ной агаризованной среды с инкапсулированным углем АГ-3, триптоном и дрожжевым экстрактом (глицерин не вносится) в качестве подложки в колбах (п. 2.9). Необходимое количество колб с подложкой стерилизуют, охлаждают и сверху доливают стерильной питательной средой полного состава, которую можно готовить отдельно или подавать из емкости поз. Е7 насосами поз. Н9 и Н11. Культивирование проводится на качалке поз. КЧ до стационарной фазы роста 6-7 суток. Далее проводят микробиологический контроль, контроль каротиноидов, БР и оптической плотности. Отбирают варианты с содержанием БР выше 110 мг/л при минимальном содержании каротиноидов и осуществляют ряд пересевов – пассажей. Для проверки стабильности выработки БР штаммом достаточно 2-3 пассажа. Полученный инокулят сохраняют в колбах перед засевом в инокулятор не более недели.

*Снижение трудозатрат возможно при возобновлении штамма непосредственно с длительно хранившихся колб с адсорбентом, суспензией или инкапсулированными в кристаллы *Hbt. salinarum* двумя-тремя пересевами. Таким образом, сокращаются предварительные операции 1-4 блок схемы (Рисунок 3.27), а также культивирование с отобранных колоний на малых объемах среды.*

Стадия ТП 1.2. Выращивание чистой культуры в инокуляторе.

Подготовка инокулята для основного процесса осуществляется в доливном режиме. Готовый раствор питательной среды, полученный на стадии ВР 1.1 из емкости поз. Е7 насосом поз. НЦ5 пропускают через систему стерилизации (ВР 1.2) и подают в инокулятор поз. И с общим объемом 40 л (рабочий объем 29-30 л).

Посевной материал, выращенный на стадии ТП 1.1, из колб собирают в одну емкость поз. Е8 при соблюдении правил асептики. Насосом поз. Н10 подают суспензию (не менее 1 л – 10% об.) в инокулятор с 9 л стерильной питательной среды.

Культивирование проводится при освещении сверхмощными светодиодами, расположенными в патроне из сверхпрочного стекла внутри инокулятора. Рекомендуемый режим – плавное наращивание мощности освещения от 20 мВт/л в начале культивирования до 70 мВт/л в конце культивирования.

Заданное значение температуры 38-39°C поддерживается с помощью контура контроля и регулирования температуры TIRC6, а текущий контроль температуры осуществляют с помощью термометра TI2.

Содержание кислорода поддерживается на уровне 5% от равновесного подачей стерильного воздуха. Контроль расхода воздуха при выращивании культуры осуществляется ротаметром PIC1.

Рабочее значение pH (7,2-7,4) автоматически регулируют путем подачи 2N раствора HCl из емкости поз. E3 с помощью контура измерения и регулирования pH QIRC3.

Через сутки после засева в инокулятор вносится 10 л стерильной питательной среды, охлажденной до температуры ферментации в теплообменнике поз. TO1 (долив 1). После 2-х суток вносится еще 10 л свежеприготовленной стерильной среды (долив 2) и продолжается культивирование. В каждом случае вносится 1/3 от конечного объема культуральной жидкости. При пенообразовании капельно вносится пеногаситель (полипропинол, лапрол, структол), хотя при нормальном протекании процесса пенообразование минимально и пеногаситель не требуется.

Через трое суток культивирования часть суспензии передается на основную стадию культивирования ТП 1.3. Галоархеи находятся в стадии активного роста и не содержат большого количества БР – суспензия имеет бледно-сиреневый цвет. На этой стадии содержание БР в инокуляте можно не контролировать, осуществляется контроль оптической плотности, посторонней микрофлоры, содержания каротиноидов. При ощутимом нарастании содержания каротиноидов инокулят бракуют.

Оставшийся объем в инокуляторе культивируют еще 3-4 суток и используют при сбоях на начальном этапе основного процесса.

Инокулят можно подготавливать также в отделении чистой культуры на ферментере меньшего объема (5-10 л) в комплексе высокоплотностного культивирования (п. 2.10) и по методике, аналогичной приведенной в п. 3.2.3.

Стадия ТП 1.3. Выращивание биомассы галобактерий в производственных ферментерах.

Дальнейшее выращивание галобактерий осуществляют в двух производственных ферментерах – каждый общим объемом 200 л и рабочим объемом 144 л. Разбиение процесса на несколько производственных линий оправдано возможной неравномерной и неполной загрузкой производства, сниженным вариантом выпуска продукта.

В чистые простерилизованные ферментеры поз. Ф1 и Ф2 из расходной емкости поз. Е7 насосом поз. НЦ5, пропуская через систему стерилизации ВР 1.2, закачивают охлажденную в теплообменнике поз. ТО1 питательную среду в количестве 40 л на ферментер. Засевают выращенным на стадии ТП 1.2. посевным материалом в количестве 8 л на ферментер по стерильной посевной линии из инокулятора.

Культивирование проводится при освещении сверхмощными светодиодами, расположенными в патронах из сверхпрочного стекла внутри ферментеров. Рекомендуемый режим – плавное наращивание мощности освещения от 20 мВт/л в начале культивирования до 70 мВт/л к концу третьих суток и дальнейшее плавное наращивание мощности освещения до 200-210 мВт/л к концу культивирования.

Поддержание рабочего значения рН 7,5-7,8 для высокоплотного процесса осуществляется с помощью контуров контроля и регулирования рН QIRC1 и QIRC4.

Подготовленный стерильный воздух для аэрации подается в ферментеры по линии ресивер поз. РЕ – емкость поз. Е6. Его расход осуществляется ротаметром PIC1. Газовоздушные выбросы, содержащие влагу, клетки, солевой аэрозоль, охлаждаются, фильтруются, после чего уходят в общую вытяжную вентиляцию цеха.

Заданное значение температуры 38-39°C в ферментерах поддерживается с помощью контуров контроля и регулирования температуры TIRC2 и TIRC8.

Текущий контроль температуры осуществляют с помощью ртутных термометров ТП1 и ТП3.

Для устранения пены в ферментеры капельно подают пеногаситель (полипропинол, лапрол или структол).

Глубинное культивирование в производственных ферментерах осуществляют в доливном режиме с подпитками. Через сутки после засева в каждый ферментер вносится 48 л питательной среды, после 2-х суток вносится еще 48 л свежеприготовленной стерильной среды того же состава ВР 1.1 и продолжается культивирование.

На четвертые сутки включается прокачка содержимого каждого ферментера через внешний контур, представляющий собой мембранные модули ультрафильтрации с молекулярно-массовым отсечением 50 кДа с полыми волокнами поз. УМ1, УМ2 на основе полиакрилонитрила или полиэфирсульфона для рецикла биомассы и адсорбционные колонны поз. К1, К2 со стерильным адсорбентом (MN-500 или активированный уголь АГ-3) для очистки среды от ингибиторов.

Схема с мембранным модулем (площадь фильтрации 5 м²) необходима для исключения прямого контакта клеток с гранулами адсорбента. Такой вариант, как показала практика, более работоспособен в условиях производства, чем инкапсуляция активированного угля АГ-3 в проницаемый полимер (агар или альгинат). Для гранул MN-500 мембранный модуль можно не использовать, однако, он необходим при культивировании штаммов-продуцентов каротиноидов в случае диверсификации производства для получения высокоплотностной культуры.

Прокачка культуральной жидкости с клетками через систему ультрафильтрации – адсорбции осуществляется перистальтическими насосами поз. НП1 и НП2. Адсорбционная колонна имеет оригинальную конструкцию, являющуюся производственным ноу-хау, отдельную систему управления вводом потоков и распределения жидкости, предусматривает замену в процессе культивирования.

В процессе высокоплотного культивирования из емкости поз. Е2 в ферментеры вносят согласно п. 3.2.3 высококонцентрированные подпитки, стерилизуемые в установке стерилизующей фильтрации поз. У.

Определение мутности суспензии галоархей производится в режиме реального времени с помощью проточных кювет, а спектральные характеристики регистрируются зондом обратного рассеяния. Для полной автоматизации процесса основного культивирования используется модификация программы BioDrome 3.0, ранее применявшаяся в лабораторном варианте культивирования.

После окончания процесса культивирования суспензию клеток сливают в сборник поз. Е5, из которого ее подают на стадию центрифугирования.

Также через ферментер, трубопроводы, мембранный модуль пропускают 25%-ный раствор NaCl, который подается из емкости поз. Е4 насосом Н5, для смыва оставшихся клеток. Раствор после промывки поступает на стадию центрифугирования (ТП 2) в емкость поз. Е5 после центрифугирования основной суспензии. Гранулы адсорбента собираются в отдельную емкость (на технологической схеме не указана) и подвергаются регенерации.

Снижение себестоимости возможно при разработке специализированных фотобиореакторов с дальнейшей оптимизацией вариантов контакта культуральной жидкости с адсорбентом. В этой связи опробованы различные способы размещения светодиодов и подвода световой энергии для разных вариантов биореакторов: через стеклянный корпус с отражателями, в патронах из сверхпрочного и стерилизуемого стекла, а также с помощью прокладки специальных линий с оптоволоконном по внутренней поверхности реактора. Протестированы различные варианты конфигураций биореактора и перемешивающих устройств: варианты лопастных мешалок, пропеллерные и дисковые перемешивающие устройства, среди которых последние оказывали наименьший механический стресс на клетки. Нижний магнитный привод оказался удобным в обслуживании и исключает по сравнению с верхним вариантом привода и системой уплотнений контаминацию ферментера. Полупериодический

режим работы биореактора устраняет большое количество подготовительных операций.

Стадия ТП 2. Отделение биомассы.

Насосом поз. Н8 из емкости поз. Е5 суспензию подают в проточную центрифугу поз. Ц и отделяют биомассу. Операции центрифугирования проводят отдельно для высококонцентрированной суспензии галоархей и смывов. Эффективность центрифугирования проверяют по мутности супернатанта. Существует возможность промывки биомассы 25%-ным раствором NaCl в сборнике Е5 и повторного центрифугирования. Биомассу в виде пасты собирают, взвешивают и подают далее на лизис клеток.

Снижение количества отходов и себестоимости возможно при очистке супернатанта адсорбентом и передаче раствора, содержащего большие концентрации солей на приготовление питательной среды. Для этого проводится анализ ионов натрия, магния, кальция, калия, цитрат-ионов и дополнение супернатанта солями для получения базовой среды. При быстрой передаче суспензии на центрифугирование стадия дополнительной очистки супернатанта адсорбентом не требуется.

Стадия ТП 3. Выделение бактериородопсина.

В реакторе поз. Р2 проводят лизис клеток галобактерий. Для этого биомассу обрабатывают дистиллированной водой из дистиллятора поз. ДР и ДНК-азой при перемешивании центробежным насосом поз. НЦ6 и освещении.

После лизиса суспензию из реактора поз. Р2 подают в проточную центрифугу поз. Ц, где происходит осаждение клеточных остатков при малых оборотах (7000 g в течение 10 минут).

Супернатант центрифугируют на ультрацентрифуге согласно протоколу выделения БР, основа которого описана у *Oesterhelt u Stoeckenius* [1228].

Супернатант после ультрацентрифугирования сливают, производят спектральный контроль. Осадок, содержащий БР в составе ПМ ресуспендируют в емкости поз. Е10 и также производят спектральный контроль на наличие яркого пика БР, необходимого соотношения белка/хромофор и наличие пиков

каротиноидов. При необходимости операции ультрацентрифугирования и ресуспендирования повторяют для очистки ПМ. Дополнительную очистку от ионов при необходимости проводят в электродиализаторе поз. ЭД.

Стерилизующую фильтрацию раствора ПМ производят через фильтр поз. МФ и разливают полученный чистый препарат в стерильные флаконы.

*Снижение себестоимости возможно при использовании специализированных высокопродуктивных по БР штаммов *Hbt. salinarum*, при культивировании которых с адсорбентом в оптимальных условиях получается суспензия с высокой плотностью клеток и практически полным отсутствием каротиноидов, что минимизирует количество циклов очистки ПМ.*

В приложении 3 (Рисунок ПЗ.2) приведены общий вид ферментера для выращивания галоархей и вариант размещения оборудования в производственном цехе. С небольшими изменениями данную схему производства, как указывалось, можно адаптировать для производства биомассы других штаммов *Hbt. salinarum*, например, продуцентов каротиноидов 353П, 353П-1, а также других видов галоархей и экстремально галофильных бактерий и даже одноклеточных водорослей (например, *Dunaliella salina*). Для производства биомассы необходимо дополнить оборудование установками лиофильного или распылительного (что более экономично) высушивания, помола и упаковки готовой высушенной формы.

3.5.2. Оценка себестоимости производства бактериородопсина и биомассы *Hbt. salinarum* при различных вариантах производства

Результаты примерных экономических расчетов, представленные в настоящем пункте, зависят от многих факторов: текущей стоимости сырья и оборудования, норм амортизационных, страховых и налоговых отчислений и, во многом, от текущей экономической конъюнктуры, а также от методики расчета. Тем, не менее, приведенные цифры в статьях калькуляции могут служить

руководством к действию при выборе схемы производства и дальнейшей оптимизации расходов в структуре себестоимости.

Следует отметить, что даже расчет базовых вариантов (1 и 2) производства основывается на данных для высокопроизводительного штамма КСК-03307 и исходит из уже имеющегося опыта и схем работы с другими штаммами в условиях реального производства, а значит, себестоимость продукта для других схем реализации производства и штаммов может быть существенно повышена. Наиболее оптимизированные варианты 4, 5 и 6 для производства БР и биомассы (штамм 353П-1) предусматривают применение адсорбентов и мембранных методов для очистки среды культивирования от ингибиторов роста, возврат использованной в процессе культуральной жидкости на стадию солеприготовления и регенерацию, как мембран, так и адсорбента. В каждом варианте учтена также трудоемкость выделения БР.

Вариант 1. Объем выпуска БР в год – 2 кг (штамм КСК-03307), реализация базового периодического процесса без использования адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 7 суток, общий объем биореактора 1 м³.

Вариант 2. Объем выпуска БР в год – 20 кг (штамм КСК-03307), реализация базового периодического процесса без использования адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 7 суток, общий объем биореактора 10 м³.

Вариант 3. Объем выпуска БР в год – 20 кг (штамм КСК-03307), реализация базового периодического процесса с оптимизацией посевного материала, без использования адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 7 суток, общий объем биореактора 6 м³.

Вариант 4. Объем выпуска БР в год – 20 кг (штамм КСК-03307), реализация процесса с оптимизацией посевного материала, с использованием мембранных модулей, адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 8 суток,

общее время процесса может достигать до 20 суток. В производственных линиях предусмотрены два биореактора с общим объемом 0,4 м³.

Вариант 5. Объем выпуска БР в год – 200 кг (штамм КСК-03307), реализация процесса с оптимизацией посевного материала, с использованием мембранных модулей, адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 8 суток, общее время процесса может достигать до 20 суток, общий объем биореактора 4 м³.

Вариант 6. Объем выпуска биомассы по АСБ в год – 1000 кг (штамм 353П-1), реализация процесса с использованием мембранных модулей, адсорбента для очистки культуральной жидкости, проточных центрифуг для отделения биомассы и распылительной сушилки. Время основного культивирования 7 суток, общее время процесса может достигать до 20-25 суток. В производственных линиях предусмотрены четыре биореактора с общим объемом 0,8 м³.

С увеличением объема выпуска себестоимость БР снижается по всем статьям калькуляции. При мощности выпуска 20 кг/год и оптимизации производственного процесса себестоимость возможно снизить в 1,75 раза (варианты 2-4). Увеличение мощности производства в 10 раз – до 200 кг БР в составе ПМ в год приводит к уменьшению себестоимости по разработанному варианту еще в 3,5 раза. По сравнению с первым, базовым вариантом производства, снижение себестоимости при росте выпуска от 2 кг/год до 200 кг/год по разработанному варианту составляет 11,6 раз. Разработанный вариант производства можно признать малоотходным и энергосберегающим, т.к. минимизированы жидкие стоки, затраты на базовый солевой раствор из-за рецикла очищенной культуральной жидкости и использования светодиодов.

В вариантах выпуска БР 1-4 большую долю в себестоимости составляет зарплата персонала, причем в базовых вариантах эта доля выше из-за трудоемкости операций по выделению БР, но даже в оптимизированных вариантах необходимо сохранение квалифицированного персонала с достойной оплатой для работы и обслуживания качественного и, зачастую, дорогостоящего

оборудования. Во многом из-за этого невозможно сократить статью расходов на освоение производства и содержание оборудования.

Таблица 3.6. Структура затрат в себестоимости БР и биомассы *Hbt. salinarum*.

Статьи калькуляции	Себестоимость в вариантах, USD/г					
	1	2	3	4	5	6
Сырье и материалы	23,52	23,52	14,17	8,12	8,12	0,302
Энергия на технологические цели	3,51	7,48	4,29	0,83	0,64	0,058
Зарплата персонала (включая страховые и налоговые отчисления)	77,29	14,95	13,42	11,9	1,88	0,206
Расходы на освоение производства, содержание оборудования	22,08	28,45	25,84	20,73	1,67	0,359
Общезаводские и прочие производственные расходы	24,09	5,71	5,03	4,02	0,71	0,070
Внепроизводственные расходы	3,01	1,60	1,26	0,91	0,26	0,020
Полная себестоимость, USD/г	153,5	81,71	64,01	46,51	13,28	1,015

Для производства БР используется качественное сырье, которое составляет существенную статью расходов. Стоимость сырья можно сократить практически в два раза, т.к. для расчетов взяты планово-заготовительные цены NaCl, триптона и дрожжевого экстракта высшей ценовой категории, которые использовались еще в лабораторном процессе. Испытания сырья других производителей продолжаются и позволили к настоящему времени отобрать варианты с приемлемой стоимостью.

По данным каталога Sigma-Aldrich стоимость 1 мг БР дикого типа в составе ПМ составляет от 600 до 800 USD (Sigma-Aldrich, USA, CAS Number: 53026-44-1), рекомбинантный бактериоопсин (bop) стоит значительно дороже, и проведенная технико-экономическая оценка показывает, что даже с учетом закономерностей ценообразования себестоимость БР на уровне 1-4 центов США за 1 мг свидетельствует о рассмотренных вариантах высокорентабельного производства.

Для штамма-продуцента каротиноидов 353П-1 в таблице 3.6 рассмотрен вариант 6 производства биомассы, в котором при использовании в качестве субстрата энзиматического гидролизата пшеничной крупы статью калькуляции по сырью возможно снизить почти в 6 раз с 0,302 USD/г до 0,051 USD/г.

При больших объемах производства БР также заслуживает внимания комплексная переработка отходов после его выделения. Кроме очевидной возможности использования лизата клеток в качестве дополнения или частичной замены субстрата из него можно выделять набор липидов, специфические ферменты, ДНК, РНК.

3.6. Критика нестерильного культивирования экстремально галофильных микроорганизмов

Реализация крупномасштабных промышленных процессов с минимальными требованиями к стерильности является, казалось бы, возможным преимуществом применения экстремально галофильных продуцентов с экономической точки зрения.

Однако, наша практика длительного непрерывного и высокоплотного культивирования экстремальных галофилов в лабораторных условиях выявила возможность и особенности контаминации: интенсивного развития посторонней микрофлоры, а также вирусного заражения. Источниками контаминации в этих случаях обычно являлись используемые нестерильные соли и воздух.

3.6.1. Контаминация культур галофилов посторонней микрофлорой

Широкий спектр уникальных биологически активных веществ, синтезируемых археями и бактериями, выделенными из гиперсоленых сред, позволят предложить их как новую платформу для промышленной биотехнологии [804, 1196, 1289, 1290]. Можно отметить такие преимущества экстремальных галофилов, как высокую адаптивность к изменению условий, алкалифильность

некоторых из них, возможность использовать морскую воду при приготовлении среды. Алкалифильность, галофильность и, иногда, термофильность микроорганизмов являются факторами отбора, которые, как считается, позволяют проводить процессы культивирования в нестерильных условиях. Это выгодно по энергопотреблению, материалоемкости, капитальным затратам и по организации самого процесса культивирования [811, 1196, 1199].

Реализован ряд нестерильных процессов с использованием бактерий рода *Halomonas* для производства полигидроксиалканоатов, эктоина. Эти бактерии являются высокоустойчивыми ко многим факторам, могут вытеснять другие виды и заслуженно считаются перспективным объектом для генетических манипуляций [811, 1196, 1290]. Некоторые работы описывают нестерильные непрерывные процессы, которые могут идти без контаминации от недель до месяцев [1289], пилотный нестерильный процесс описан для *Haloferax mediterranei* [1199]. Однако сама возможность контаминации для подобных микроорганизмов и процессов культивирования на их основе широко не рассматривается в литературе. Это приемлемо по отношению к очистке сточных вод, очистке от нефти и хлорорганики, но для более тонких биотехнологических процессов возможность контаминации при нестерильном культивировании высокогалотолерантных и экстремально галофильных микроорганизмов необходимо исследовать подробнее.

В гиперсоленых природных средах присутствуют и вирусы, и микроорганизмы разной степени галотолерантности и устойчивости к различным факторам [383, 1291, 1292]. Контаминированные соли и воздух, который переносит микроорганизмы и вирусы на большие расстояния, могут стать существенной преградой для реализации нестерильных производств на основе галофильных микроорганизмов. Необходимо рассмотреть возможность и закономерности контаминации процессов культивирования экстремальных галофилов и предложить пути реализации и технологического оформления нестерильных процессов культивирования.

Одним из преимуществ при проведении нестерильного культивирования экстремально галофильных микроорганизмов является возможность сохранения термолабильных компонентов среды, которые разрушаются при распространенной в массовом производстве стерилизации острым паром. При разработке технологии обычно рассматриваются все варианты подготовки питательной среды, в том числе оптимизируются режимы стерилизации паром для последующего включения полученных данных в экономические расчеты. И следующие эксперименты первоначально ставились именно для оптимизации режимов стерилизации.

Сравнительные эксперименты по культивированию экстремально галофильных архей с использованием нестерильной и обработанной острым паром комплексной питательной среды в ряде случаев приводили к неожиданным результатам. В периодических экспериментах в колбах с высокочувствительными к стрессированию продуцентами БР *Hbt. salinarum* КСК-03307 и ЕТ-1001 в нестерильных условиях примерно в трети случаев резко снижался или полностью прекращался синтез бактериородопсина. У штамма ЕТ-1001 повышалась выработка каротиноидов, а у особо чувствительного к стрессированию штамма КСК-03307 в некоторый момент подавлялся рост, суспензия клеток оставалась белого цвета. Последующий пересев таких образцов из колбы в колбу только ухудшал показатели роста и выработки бактериородопсина штаммами. В стерильно проводимых экспериментах проходили стабильно воспроизводимые процессы наработки биомассы и бактериородопсина.

Микробиологический анализ образцов из неудачных процессов культивирования в периодическом режиме и дальнейших пассажей этих образцов позволил восстановить порядок развития контаминирующего сообщества.

Чаще всего в первую очередь в среде культивирования совместно с *Hbt. salinarum* начинали развиваться бактерии р. *Bacillus* и родственные им. С помощью 16S рРНК анализа идентифицировано множество разнообразных штаммов *Bacillus subtilis*. Другими идентифицированными видами были *Bacillus badius*, *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus macroides* и др. Эти бактерии

прекрасно росли на среде LB с содержанием NaCl 0,9%, и легко изолировались в монокультуры. Только некоторые из выделенных бактерий могли расти в жидкой среде LB с содержанием 15% NaCl и могли относиться к галотолерантным. Те бактерии, которые адаптировались в жидкой среде к 15% NaCl, на агаризованной питательной среде показывали рост, в основном, только до 5% NaCl. Оптимальные концентрации NaCl для выделенных бактерий лежали в диапазоне 0,9-3,5%. Не было выделено ни одной высокогалотолерантной бактерии, которая могла бы размножаться при 20% NaCl и выше в среде LB или при 25% NaCl в комплексной среде для галоархей и галобактерий с глицерином.

Для последующих экспериментов по совместному культивированию с выделенными бациллами использовали экстремально галофильные археи *Hbt. salinarum* ET-1001 и высокогалотолерантные бактерии *Halomonas utahensis* SK7, которые растут в широком диапазоне солености (от 5 г/л NaCl и выше), продуцируют C₅₀-каротиноиды и могут вырабатывать осмопротекторы.

Выделенные бактерии родов *Bacillus* и *Lysinibacillus* инокулировали в концентрации 10⁵ клеток/мл совместно с *Hbt. salinarum* или *Halomonas utahensis* в концентрации 2×10⁸ клеток/мл в стерильных условиях в комплексную питательную среду для галобактерий и галоархей. При культивировании в течение семи суток в колбах отбирали пробы для микрометода по Коху (микрометод серийных разбавлений). Высевы для определения концентраций клеток производили на агаризованную среду LB и на агаризованную комплексную питательную среду для экстремальных галофилов. После первого цикла культивирования осуществляли еще два последовательных пересева с 10% об. инокулята, взятого с предыдущего цикла культивирования.

Контаминирующие бактерии по-разному влияли на целевые культуры *Hbt. salinarum* и *Halomonas utahensis*. Их максимальные концентрации были отмечены на предстационарной стадии. В некоторых случаях происходило существенное подавление целевых микроорганизмов (Таблица 3.7).

Таблица 3.7. Влияние контаминирующих бактерий на *Hbt. salinarum* ET-1001 и *Halomonas utahensis* SK7 при пересевах (соотношения приведены для предстационарной стадии).

Микроорганизмы	Номер посева и количество клеток ($\times 10^7$) в 1 мл культуральной жидкости		
	1	2	3
<i>Hbt. salinarum</i> ET-1001 (контроль)	174,1 \pm 21,3	183,1 \pm 28,7	185,1 \pm 20,4
<i>Halomonas utahensis</i> SK7 (контроль)	332,1 \pm 43,1	345,3 \pm 52,3	341,1 \pm 56,2
<i>Bacillus subtilis</i> 1/ <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	62,7 \pm 11,9/ 15,5 \pm 1,2	32,3 \pm 4,2/ 8,7 \pm 2,0	27,3 \pm 7,8/ 5,7 \pm 1,3
<i>Bacillus subtilis</i> 1/ <i>Halomonas utahensis</i> SK7	152,5 \pm 16,7/ 111,5 \pm 16,9	112,5 \pm 35,7/ 134,1 \pm 16,1	92,1 \pm 16,4/ 122,3 \pm 9,8
<i>Bacillus subtilis</i> 2/ <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	0,215 \pm 0,045/ 134,1 \pm 32,1	0,117 \pm 0,009/ 152,6 \pm 21,1	0,113 \pm 0,035/ 153,3 \pm 11,7
<i>Bacillus subtilis</i> 2/ <i>Halomonas utahensis</i> SK7	0,122 \pm 0,022/ 287,8 \pm 23,5	0,212 \pm 0,069/ 278,1 \pm 37,1	0,255 \pm 0,044/ 292,9 \pm 33,5
<i>Bacillus badius</i> / <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	0,157 \pm 0,034/ 121,1 \pm 18,2	0,132 \pm 0,015/ 115,1 \pm 25,4	0,113 \pm 0,032/ 134,1 \pm 17,1
<i>Bacillus badius</i> / <i>Halomonas utahensis</i> SK7	4,81 \pm 1,20/ 314,5 \pm 41,3	6,31 \pm 1,93/ 300,5 \pm 23,7	5,52 \pm 0,68/ 290,8 \pm 36,8
<i>Bacillus licheniformis</i> / <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	17,1 \pm 3,2/ 33,1 \pm 5,3	4,2 \pm 0,7/ 9,2 \pm 1,6	2,1 \pm 0,6/ 7,5 \pm 2,3
<i>Bacillus licheniformis</i> / <i>Halomonas utahensis</i> SK7	55,5 \pm 5,8/ 142,5 \pm 35,7	50,1 \pm 16,1/ 111,3 \pm 10,0	62,3 \pm 14,4/ 152,5 \pm 35,2
<i>Lysinibacillus macroides</i> / <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	134,1 \pm 26,2/ 182,3 \pm 32,2	67,1 \pm 11,5/ 187,1 \pm 37,2	97,1 \pm 24,4/ 182,8 \pm 39,7
<i>Lysinibacillus macroides</i> / <i>Halomonas utahensis</i> SK7	95,8 \pm 25,9/ 345,6 \pm 61,1	105,3 \pm 22,1/ 327,8 \pm 37,9	121,0 \pm 14,9/ 362,6 \pm 72,8

Бактерии *Halomonas utahensis* менее чувствительны к присутствию бацилл, чем *Hbt. salinarum* ET-1001. Среди рассмотренных контаминирующих бактерий *Bacillus licheniformis* полностью подавляет синтез БР уже в первом пассаже, активирует синтез каротиноидов и все более подавляет рост биомассы при пересевах. *Bacillus subtilis* 1 угнетает и прирост и развитие окраски биомассы галоархей. С другой стороны, *Lysinobacillus macroides* несущественно влияет на характеристики культивирования целевых микроорганизмов при пересевах.

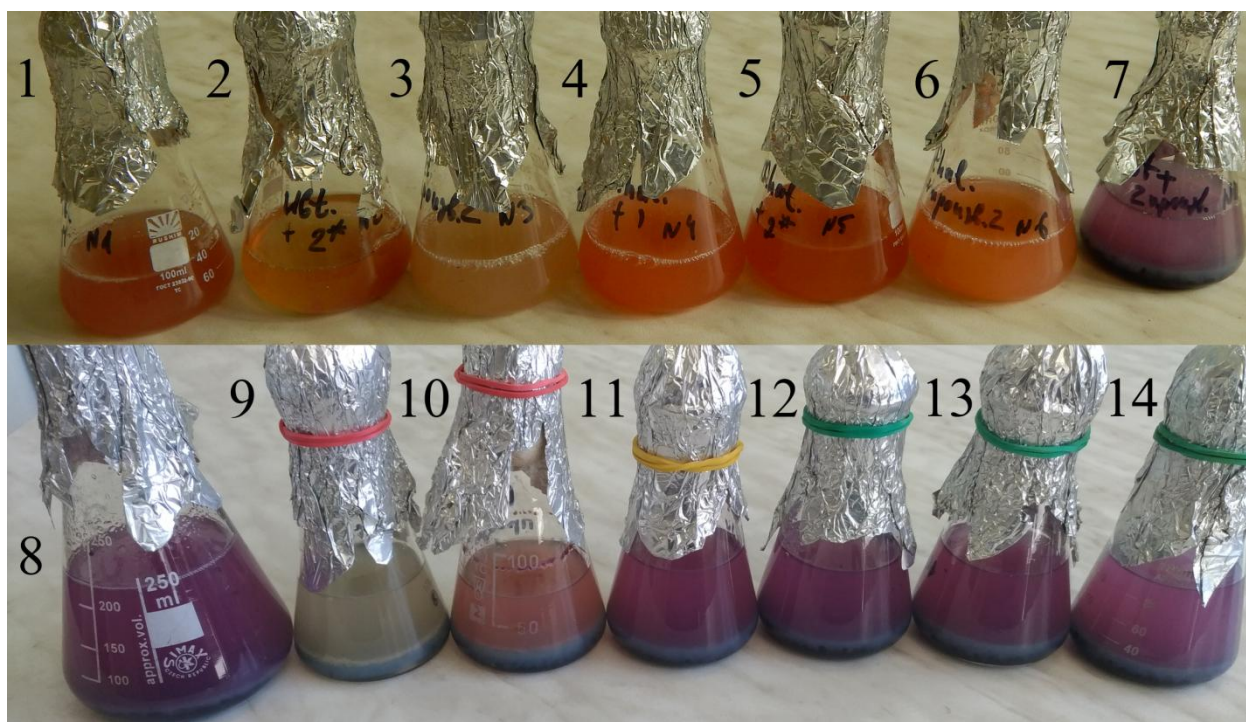


Рисунок 3.28. Колбы после культивирования *Halomonas utahensis* SK7 (4-6) и *Hbt. salinarum* ET-1001 (1-3, 7, 9-10) с контаминирующими бациллами из таблицы 1, (8, 11-14) – контроль *Hbt. salinarum* КСК-03307. (7-14) – варианты с инкапсулированным в агар активированным углем АГ-3.

Культивирование с адсорбентом (инкапсулированный в агар активированный уголь АГ-3), в основном, снимает токсические эффекты бацилл, они размножаются в гораздо меньшей степени, хотя и остаются в культуральной жидкости в значимых концентрациях (30-50% от стандартного варианта

культивирования). У *Hbt. salinarum* в особых случаях образуются устойчивые сообщества, которые при пересевах даже с адсорбентом содержат клетки галоархей дикого типа или белые (Рисунок 3.28).

Клетки бацилл в настоящем исследовании росли только совместно с экстремально галофильными археями или высокогалотолерантными бактериями. Причиной этого, скорее всего, являлся частичный лизис клеток целевых микроорганизмов, который происходит в той или иной степени в процессе роста всегда и усиливается под воздействием бактериальных токсинов. Содержимое клеток, как раз и выступало осмопротекторами бацилл, что было доказано в модельных экспериментах с лизированной биомассой *Halomonas utahensis* и *Hbt. salinarum*. Если для *Halomonas utahensis* это объяснимо выработкой осмопротекторов, которые затем накапливаются в бациллах, то для *Hbt. salinarum* этот момент требует дальнейшего изучения. В этой связи можно рассмотреть продукты ферментативной деградации гликопротеинов и фосфолипидов, а также продукты деградации предшественников каротиноидов как возможные осмопротекторы для контаминирующих бацилл [1293].

Высевы методом серийных разбавлений на агаризованную среду для экстремальных галофилов после периода роста самих галофилов показывают вторичный рост бацилл, причем форма колоний бацилл сильно отличается от той, которую привыкли наблюдать на среде LB. Такие гладкие колонии с достаточно ровными краями, видимо за счет выделения экзозополисахаридов, растут поверх колоний экстремальных и высокогалотолерантных галофилов (Рисунок 3.29).

В экспериментах в колбах бациллы, которые подавляли рост *Halomonas utahensis* и *Hbt. salinarum* подавляли развитие и других контаминирующих микроорганизмов. Если существенного подавления бациллами не происходило, то в пассажах или в непрерывных вариантах культивирования обнаруживали и другие микроорганизмы. В непрерывных вариантах культивирования, которые интересны для массового производства, при разбавлении могут сниматься токсические эффекты и могут происходить несколько иные процессы.

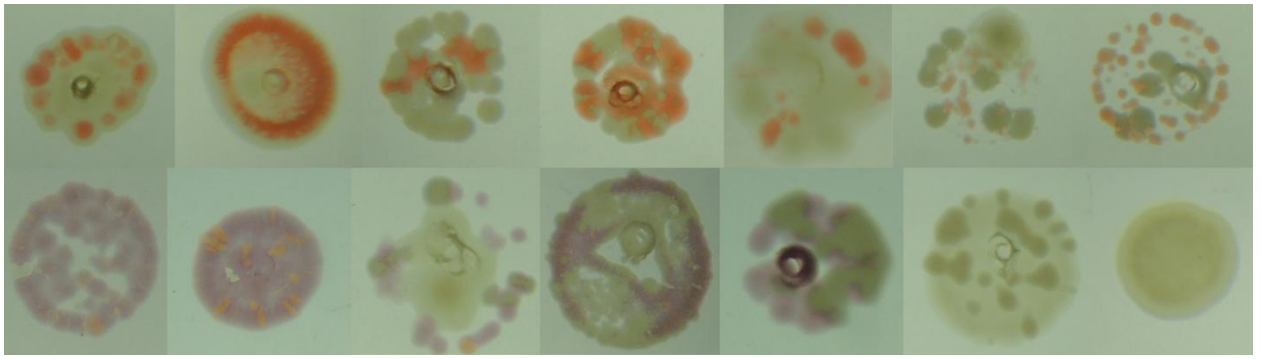


Рисунок 3.29. Изменения в колониях *Halomonas utahensis* SK7 (верхний ряд) и *Hbt. salinarum* ET-1001 (нижний ряд) при контаминации и вторичном росте бацилл.

Эксперименты по непрерывному культивированию проводили в нестерильных условиях в биореакторе со скоростями разбавления $D=0,025 \text{ ч}^{-1}$ (для *Hbt. salinarum* ET-1001 при синтезе бактериородопсина) и $D=0,035 \text{ ч}^{-1}$ (для *Halomonas utahensis* SK7 при синтезе каротиноидов) в течение 30 суток. Первоначальный периодический процесс проводился до накопления биомассы около 70% от максимально возможного уровня, затем включался проток.

В случае продуцента бактериородопсина *Hbt. salinarum* ET-1001 уже через 7 суток непрерывного режима целевая культура могла практически полностью заместиться на быстроразмножающиеся бактерии, в основном, родственных родов *Halomonas*, *Chromohalobacter* или *Marinobacter*. В другом процессе появлялись археи рода *Natronococcus* и их синтрофы опять же из рода *Halomonas*. В каждом новом процессе проявлялись все новые и новые микроорганизмы. Неизменно присутствовали в значимом количестве 2-3 вида бактерий рода *Bacillus* или родственные им *Lysinobacillus*, *Alkalibacillus* и др (иногда до 10^8 - 10^9 кл/мл). Количество обнаруживаемых высеваемых микроорганизмов, присутствующих в значимых количествах в определенный момент времени, ограничивалось пятью-шестью видами, которые и идентифицировались с помощью 16S рРНК-анализа. Доминирующий микроорганизм мог сохраняться длительное время, но минорные компоненты могли быстро меняться. Сообщество не было устойчивым.

Аналогичная ситуация наблюдалась при непрерывном культивировании *Halomonas utahensis* или *Hbt. salinarum* 353П (продуценты каротиноидов) с той разницей, что целевая культура в роли доминирующего микроорганизма могла продержаться в сообществе несколько дольше, чем *Hbt. salinarum* ET-1001.

3.6.2. Вирусное заражение при культивировании *Hbt. salinarum*

Случаи быстрого лизиса целевых культур *Hbt. salinarum* наблюдались и в периодических, и в непрерывных процессах культивирования. Характер наблюдаемого быстрого лизиса мы связывали вирусным заражением культур. После проведения работ с образцами из природных гиперсоленых сред случаи лизиса галоархей и галофильных бактерий также закономерно учащались.

Особенно отчетливо явление быстрого лизиса культур *Hbt. salinarum* проявлялось при высокоплотностном культивировании в мембранном биореакторе с протоком питательной среды. В неоптимальных условиях, например, при снижении протока среды в 2-3 раза по сравнению с оптимумом и при большой концентрации клеток происходила индукция вирусов, вероятно, из-за стрессирования клеток накапливаемыми метаболитами или повышения pH.

Для выяснения условий заражения умеренными вирусами, а также оптимальных условий индукции этих вирусов в качестве клеток-хозяев использовались *Hbt. salinarum* 353П. Было показано, что клетки *Hbt. salinarum* могли длительное время находиться в лизогенном состоянии после заражения умеренным вирусом, отобранным из образцов соленого озера Аликес (о. Кос, Греция). Вирус, явившийся источником заражения был определен после высокоплотностного культивирования *Hbt. salinarum* 353П и спонтанного лизиса клеток галоархей в мембранном биореакторе.

Была проведена первичная оценка вирусной активности. При прямом заражении клеток вирусом, выделенным из природного источника, наблюдается незначительное снижение оптической плотности в глубинных культурах, а также появление негативных колоний на чашках Петри. Установлено, что наиболее

чувствительны к заражению вирусом клетки галоархей на 4-ые сутки культивирования в глубинной периодической культуре (конец экспоненциальной фазы роста).

Негативные колонии после высева инфицированной глубинной культуры (в различных разбавлениях) в полужидкий агар или на твердую агаризованную среду распределялись неравномерно и могли несколько отличаться по размерам. При повышении температуры инкубирования чашек Петри с образцами, зараженными вирусом, до 41-42 °С негативные колонии появлялись быстрее.

Определены условия, при которых инфицирование в глубинной культуре протекает с наибольшей эффективностью. В ходе экспериментов установлено, что при температуре выше 37,5 °С, а также при рН выше 7,6 наблюдается резкий рост числа негативных колоний, что отображено на рисунках 3.30 и 3.31.

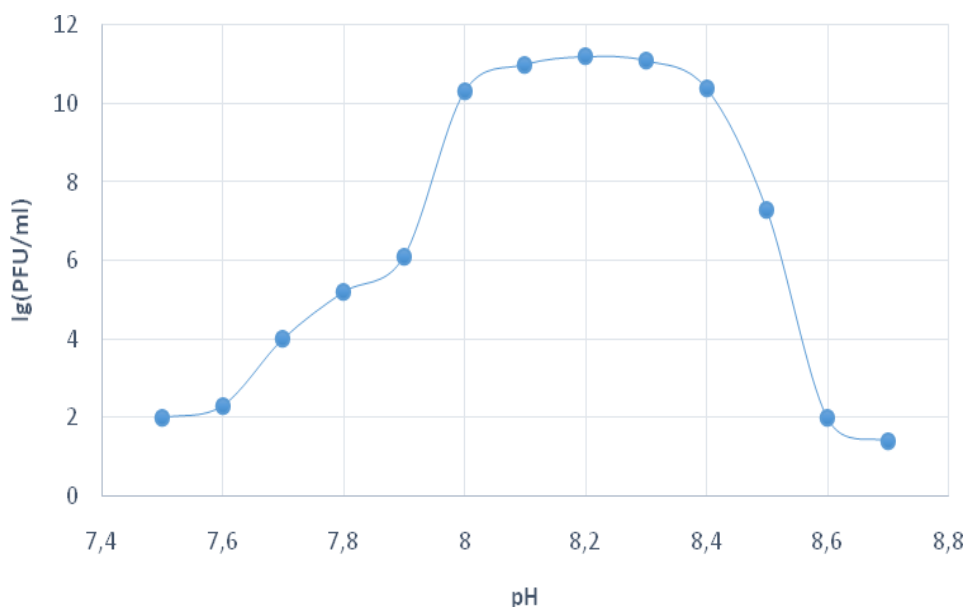


Рисунок 3.30. Влияние рН на инфицирование клеток.

При дальнейшем подщелачивании среды в глубинной культуре выше рН 8,4, а также при или при повышении температуры инкубирования выше 42 °С число негативных колоний снижается.

Подобраны оптимальные условия для активации механизма индукции умеренного вируса в глубинной культуре. Процесс индукции эффективно происходит при температуре 45 °С и щелочных значениях рН = 8,4-8,5. Время полного лизиса суспензии клеток галоархей после индукции может занимать от нескольких часов до суток.

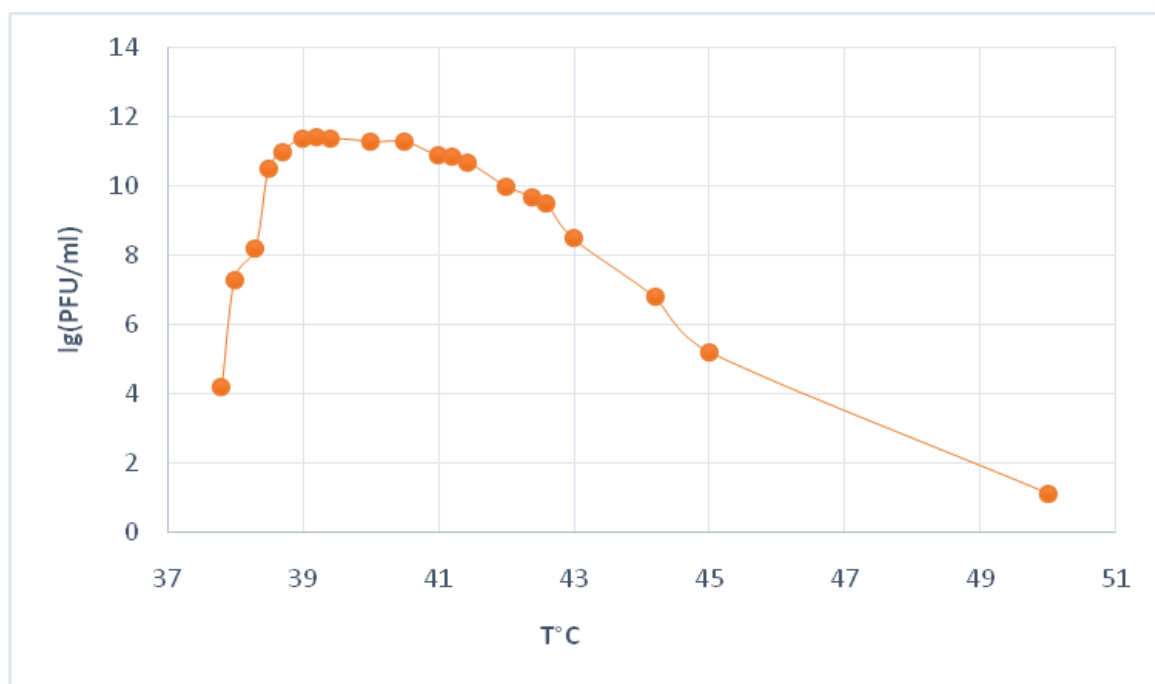


Рисунок 3.31. Влияние температуры на инфицирование клеток.

Влияние плотности клеточной популяции на эффективность индукции умеренного вируса в условиях изменения физиологических параметров культуры галоархей изучалось при культивировании в колбах, а также в мембранном биореакторе, оснащённом мембранным модулем. Было установлено, что уже при концентрации клеток в биореакторе больше 16 г/л при снижении скорости потока в 2-3 раза от оптимальной вирус индуцируется, что приводит к гарантированному полному лизису клеток. Можно предположить, что в таких экспериментах лизис клеток связан с накоплением в среде метаболитов и ростом рН. Частичный или полный лизис у зараженной культуры клеток мог происходить спонтанно и в колбах в периодическом режиме при меньших уровнях накопления биомассы (2,5-4 г/л).

Получены изображения вирусов, выделенных из негативных колоний (Рисунок 3.32). Материал отобран и был направлен на электронную микроскопию непосредственно из зоны просветления (негативной колонии) без использования градиентного центрифугирования. Полученные изображения показывают, что исследуемые вирусы имеют веретенообразную форму строения капсида, а также обладают достаточно крупным размером (~ 100 нм).

Выварочные, перекристаллизованные, химически чистые соли содержат, как выясняется в наших экспериментах, клетки микроорганизмов (возможно, споры) и вирусы. Незначительного их количества достаточно для нарушения нормального процесса культивирования экстремально галофильных микроорганизмов-продуцентов.

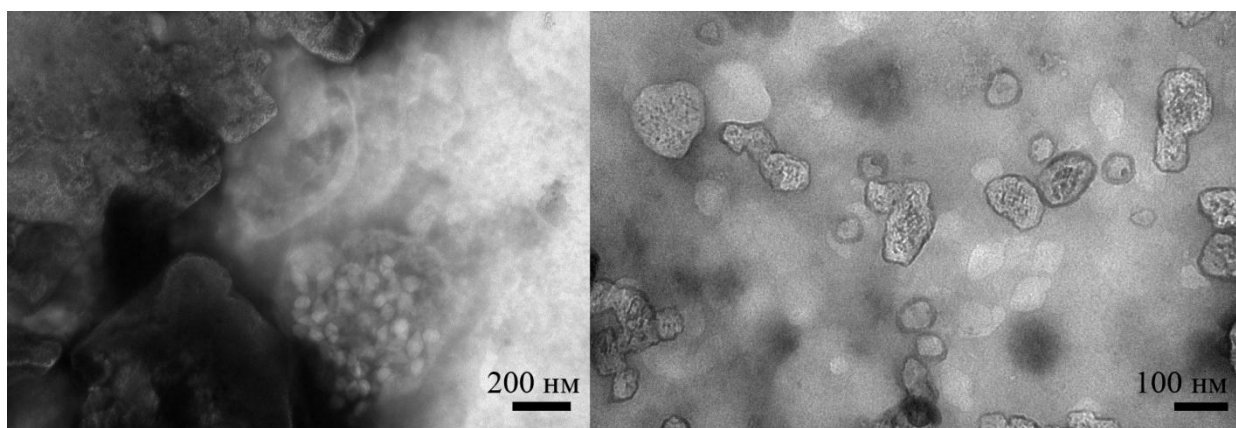


Рисунок 3.32. Вирусные частицы на фоне обломков клеток.

Нестерильный воздух также является источником контаминации при культивировании экстремальных галофилов. В специальных экспериментах было подтверждено развитие посторонней микрофлоры, которое происходило медленнее, чем с нестерильной питательной средой (меньше микробное разнообразие и титр клеток). Важным фактором в этом случае выступала чистота помещения, в котором происходило культивирование. Панели стен, поверхности хорошо адсорбируют и задерживают внутрилабораторную или внутрипроизводственную инфекцию (аналогия с внутрибольничной инфекцией). Интересно, что проведение процессов с нестерильным воздухом даже в

относительно чистом помещении средней полосы России, где никогда не культивировались галофилы, приводило к формированию сообществ микроорганизмов, а иногда и к вытеснению экстремально галофильного микроорганизма-продуцента. В таких сообществах зачастую присутствовали и экстремально галофильные микроорганизмы.

Таким образом, нестерильные соли, воздух являются источниками микроорганизмов (не обязательно галотолерантных или экстремально галофильных), которые размножаются при совместном культивировании с экстремальными галофилами.

Культивирование галоархей с внесением специально подобранного под целевую культуру антибиотика может решить часть проблем, связанных с бактериальным заражением, хотя и не во всех случаях.

Приемлемым решением проблемы нестерильного культивирования экстремально галофильных микроорганизмов является обработка оборудования дезинфицирующими растворами, применение стерилизующей мембранной фильтрации питательной среды, фильтрация воздуха в процессе культивирования и обеспечение условной чистоты помещения. Указанные условно стерильные непрерывные процессы культивирования были проведены в полупромышленном масштабе с применением половолоконных ультрафильтрационных модулей (50 кДа) и воздушных фильтров (0,2 мкм). При такой организации процесса культивирования вероятность заражения существенно снижалась, и удавалось проводить непрерывные процессы культивирования продолжительностью до одного месяца.

3.7. Карбонатогенез бактерий, выделенных из гиперсоленых сред, для улучшения свойств и защиты бетона и биопрепарат на их основе

В природных условиях широко распространены биогеохимические процессы, такие как образование твердых пород из рыхлых осадков, укрепление почв, грунтов, песков в результате естественной биоцементации на основе

жизнедеятельности микроорганизмов [1294-1296]. Биогеохимический подход дает возможность разработки технологии получения и использования биопрепаратов для воздействия на грунты с целью улучшения их функциональных свойств, закрепления песков, повышения прочности строительных материалов, таких как бетон, известняк, гипс, а также восстановления поврежденных конструкций [1297-1299]. Необходима разработка перспективной природоподобной технологии, основанной на использовании способности уробактерий к внеклеточному индуцированному осаждению кальция (MICP) [1012]. Эффективность этого процесса определяется пулом бактериальных ферментов и метаболитов, причем способность к биокальцинированию может различаться даже у микроорганизмов одного вида [1300-1302].

Недостаточная функциональная активность и устойчивость биокальцинирующих микроорганизмов к изменяющимся условиям окружающей среды и антропогенным воздействиям, а также несовершенство форм биопрепаратов [1012, 1303, 1304] – эти факторы ограничивают возможности их применения. В результате при проведении реставрационных работ приходится использовать экологически небезопасные технологии [1304- 1306].

К настоящему времени проведен широкий скрининг уробактерий, способных к MICP, из разных экосистем и обнаружено, что наиболее активные штаммы относятся к разным видам рода *Bacillus* [1297, 1012, 1307].

Малоизученной экологической нишей для выделения бактерий, обладающих уреазной активностью и способностью к биоосаждению кальция, являются гипергалинные среды, из которых ранее выделяли бактерии рода *Bacillus*, не способные размножаться при повышенном содержании солей, что исследователи объясняли контаминацией, например, из привнесенного водными источниками и птицами материала, а также выживаемостью спор в условиях высокой солености [1037, 1291, 1292]. Ранее было обнаружено, что некоторые бактерии рода *Bacillus*, выделенные из гиперсоленых сред и не размножающиеся в монокультуре при высоких концентрациях NaCl (> 15%), при совместном культивировании в сообществе экстремальных галофилов – источников осмопротекторов [1308] –

активно растут при концентрации NaCl 25% и выше и являются автохтонной микрофлорой. В монокультуре бактерий рода *Bacillus*, выделенных из гипергалинных сред, оптимальные концентрации NaCl могут лежать как в широком диапазоне, так и быть ниже 0,9% (физиологический раствор), а для их культивирования подходят модификации среды Лурия-Бертани (LB) [1309]. С одной стороны, отходы жизнедеятельности птиц в гиперсоленых озерах способствуют развитию уробактерий, с другой – устойчивость к высоким значениям pH, выживаемость в условиях осмотического шока, перепадов температуры способствуют отбору чрезвычайно устойчивых форм, перспективных для разработки биокальцинирующих препаратов.

3.7.1. Уреазная активность, ростовые характеристики и способность к биокальцинированию у бактерий, выделенных из различных источников

В результате проведенного широкого скрининга, из разных экологических ниш и техногенных систем были выделены уробактерии, что подтверждает литературные данные об их широком распространении. Большинство бактериальных культур, обладающих уреазной активностью относилась к роду *Bacillus*, однако, среди них наблюдалась большая разница в функциональных свойствах, которые оценивались по уреазной активности на индикаторной среде Кристенсена и активности роста. Оценка уреазной и ростовой активностей некоторых из выделенных культур на среде Кристенсена представлены в таблице 3.8, что достаточно полно характеризуют скрининг большого числа выделенных культур по активностям. Некоторые из выделенных культур были определены до видов с помощью 16S рРНК анализа.

Таблица 3.8. Оценка уреазной и ростовой активностей некоторых из выделенных культур на индикаторной среде с мочевиной.

Бактерии	Степень окрашивания среды при времени экспозиции		Активность роста
	24 часа	48 часов	
1. <i>Bacillus sphaericus</i>	+	+++	++
2. <i>Bacillus subtilis K</i>	+	+++	++
3. <i>Bacillus subtilis M</i>	+	++	++
4. <i>Bacillus atrophaeus</i>	–	+	++
5. <i>Bacillus cereus</i>	–	-	+
6. Изолят 1 (навоз КРС)	+	+	+
7. Изолят 2 (навоз зверофермы)	–	-	+
8. Изолят 3 (закрепленные пески)	–	++	+
9. Изолята 4 (навоз КРС)	+	++	+
10. <i>Bacillus subtilis</i> 1 (Озеро Эльтон)	+	+	+
11. <i>Lysinibacillus macroides</i> (Озеро Эльтон)	+	+++	++
12. <i>Bacillus licheniformis</i> (Озеро Аликес)	+	+++	++
13. <i>Bacillus subtilis</i> 2 (Озеро Аликес на)	+	++	+
14. <i>Bacillus subtilis</i> 3 (Озеро Аликес)	+	+	+
15. <i>Bacillus subtilis</i> 4 (Озеро Шотт-эль-Джерид)	+	+++	++
16. <i>Bacillus subtilis</i> 5 (Озеро Шотт-эль-Джерид)	+	+	+

* «+++» – обильное глубинное окрашивание индикаторной среды в розовый цвет, «++» – окрашивание поверхности среды, засеянной бактериями, «+» – нечеткое окрашивание поверхности среды; «–» – отсутствие изменения окраски среды, «+++» – обильный рост, «++» – наличие роста, «+» – слабый рост.

Уробактерии, выделенные из разных экосистем, характеризуются высокой степенью гетерогенности как по уреазной активности, так и активности роста на среде Кристенсена.

Из исследованных музейных культур бактерии *B. cereus* плохо росли и не проявляли уреазной активности на среде Кристенсена, наилучший рост и уреазная активность определялись у культур *Bacillus sphaericus*, *B. subtilis* К, *Bacillus subtilis* 4, *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus macroides*. Среди микроорганизмов, выделенных методом накопительных культур (изоляты 1-4), только один изолят показывал рост и удовлетворительную уреазную активность на среде Кристенсена. Остальные микроорганизмы занимали промежуточное положение по активностям.

Наибольшей активностью роста и уреазной активностью характеризовались культуры уробактерий выделенные их экстремально галофильных экосистем. На основании первичной оценки уреазной активности лучшие культуры были отобраны для исследований по способности к осаждению кальция.

3.7.2. Исследование осаждения карбоната кальция клетками уробактерий

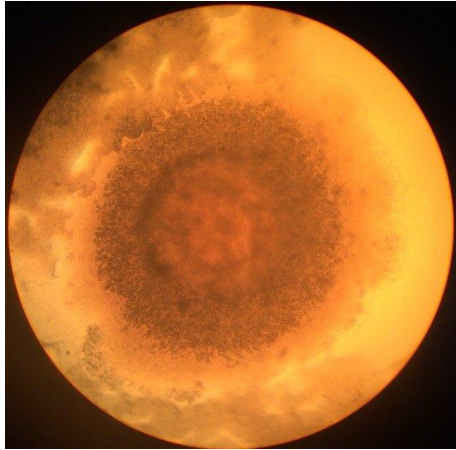
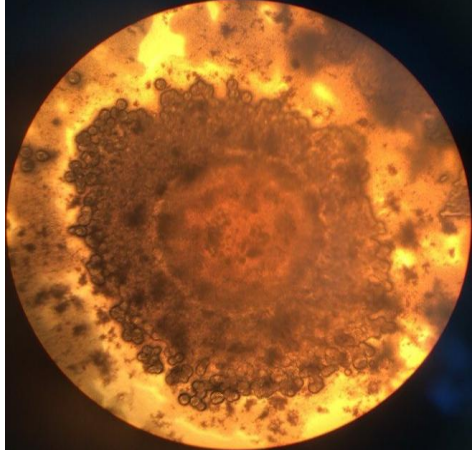
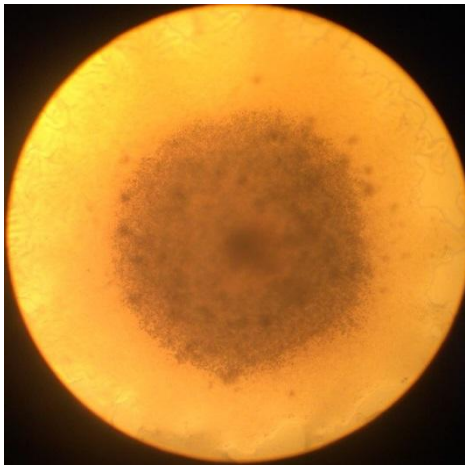
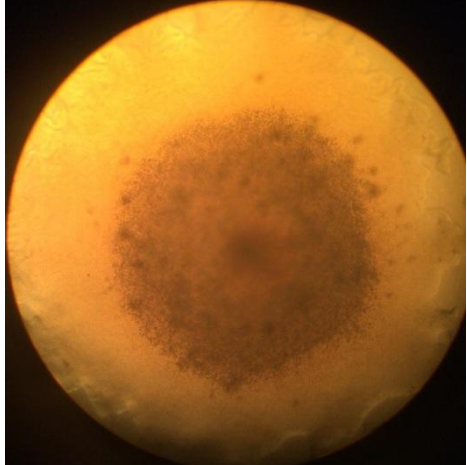
Способность уробактерий осаждавать кристаллы карбоната кальция на клеточной стенке является ключевым фактором, определяющим возможность использования таких бактерий для улучшения свойств строительных материалов.

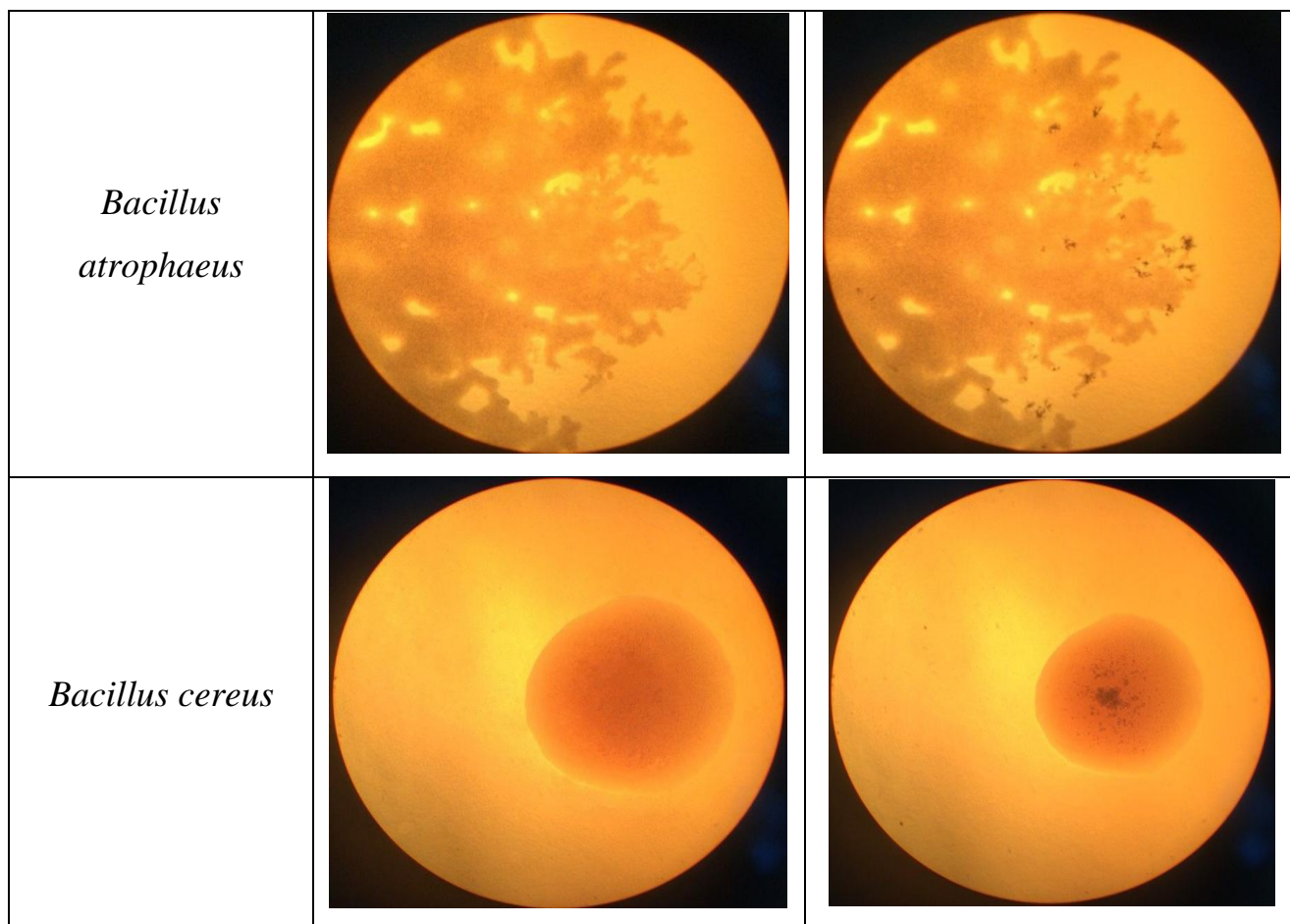
Из литературных данных известно, что бактериальное осаждение карбоната кальция зависит от количества присутствующих в среде ионов кальция, отрицательного поверхностного ζ -потенциала бактерий и метаболической активности уробактерий, которая ведет к повышению рН среды. Ранее отобраны культуры бактерий, обладающих выраженной уреазной активностью и способностью хорошо расти на среде с мочевиной. Однако, механизм карбонатогенеза до сих пор слабо изучен и, как видно из литературных данных, способность осаждавать кальцит может различаться даже между штаммами одного

вида. Поэтому на следующем этапе проводили опыт с осаждением кальцита со всеми исследуемыми культурами.

Бактерии высевались на агаризованную питательную среду Кристенсена с добавлением CaCl_2 . Осажденный CaCO_3 представлял собой минеральную корку на поверхности колоний. Образовавшиеся кристаллы наблюдали с помощью микроскопа. В исследовании приведены результаты, показывающие градацию в осаждении кальция различными по активности микроорганизмами (таблица 3.9). Лучшими из исследованных по степени осаждения кальция оказались *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis*, выделенные из гиперсоленых сред.

Таблица 3.9. Степень кальцинирования колоний в зависимости от времени культивирования.

Бактерии	Спустя 2 суток	Спустя 3 суток
<i>Lysinibacillus macroides</i>		
<i>Bacillus subtilis M</i>		



На фотографиях отчетливо видны границы минеральной корки на поверхности колоний. При культивировании *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis* карбонат кальция покрывал всю поверхность колоний (Рисунок 3.33) на 3 сутки, когда как у *Bacillus subtilis* M лишь около 50%, а у *Bacillus atrophaeus* и *Bacillus cereus* не было отмечено заметного осаждения карбоната кальция.

Бактериальное осаждение кальцита происходит на стенках капиллярных пор, что приводит к их постепенному заполнению и снижению капиллярной пористости материала, что может быть использовано для санации трещин и восстановления поверхности бетонов.

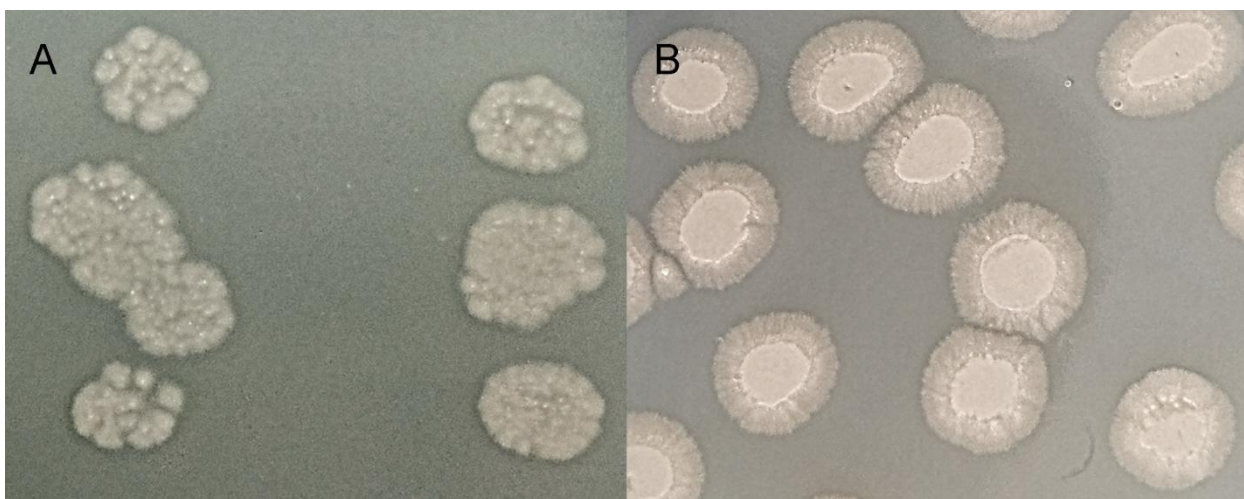


Рисунок 3.33. Кальцинирование колоний *Lysinibacillus macroides* (А) и *Bacillus licheniformis* (В) на среде Кристенсена с CaCl_2 .

3.7.3. Исследование поверхностного заряда клеток уробактерий

Из литературных данных известно, что поверхностный заряд клетки имеет существенное значение для микробного осаждения карбоната кальция. Результаты сравнительной оценки дзета-потенциалов разных культур уробактерий приведены в таблице 3.10, в которой показан характерный разброс значений (не для всех исследованных микроорганизмов).

Таблица 3.10. Значения ξ -потенциала у исследуемых микроорганизмов.

Микроорганизм	Значение ξ -потенциала, мВ
<i>Lysinibacillus macroides</i>	-21,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	-22,3
<i>Bacillus subtilis</i> К	-21,6
<i>Bacillus atrophaeus</i>	-28
<i>Bacillus subtilis</i> М	-23,2
<i>Bacillus cereus</i>	-8,9

Бактерии *B. cereus* обладают сравнительно малым отрицательным зарядом клеточной стенки и меньшей уреазной активностью, имеют высокую склонность к агрегации клеток. Наименьшее значение дзета-потенциала определено у бактерий

B. atrophaeus, но данный микроорганизм обладал меньшей уреазной активностью и способностью к осаждению кальция по сравнению с бактериями *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis*.

3.7.4. Применение *Lysinibacillus macroides* для улучшения характеристик образцов гипсового камня

В серии последующих экспериментов использовались уробактерии *Lysinibacillus macroides*, которые обладали высочайшей уреазной активностью и способностью к осаждению карбоната кальция. При оценке динамики рН на разных питательных средах ранее у уробактерий была показана различная функциональная активность. Наибольшее повышение рН наблюдалось при культивировании на вариантах стандартной и модифицированной среды Дика с добавлением глюкозы.

Образцы гипсового камня на основе строительного гипса размером 1x1x3 см подготавливались заранее и твердели в воздушных условиях 7 суток, после чего досушивались при 60 °С в течение трех часов. Контрольная партия сохранялась для сравнения в высушенном состоянии, остальные 4 партии гипсовых балочек вносились на сутки в подготовленные растворы, содержащие: среду Дика, среду Дика с бактериями *Lysinibacillus macroides*, среду Дика с хлоридом кальция и среду Дика с бактериями *Lysinibacillus macroides* и хлоридом кальция. После суточного эксперимента гипсовые балочки промывали и высушивали три часа при 60 °С и исследовали на прочность, пористость, водостойкость.

Гипсовые балочки после извлечения из растворов, промывки и высушивания внешне не отличались от контрольных образцов, однако, их характеристики существенно поменялись после пребывания в растворе 4 (Таблица 3.11).

Пребывание в растворах 1-3 не влияет существенно на свойства гипсовых образцов. В растворе 4, который кроме среды Дика и бактерий *Lysinibacillus*

macroides содержал хлорид кальция, образовались кристаллы кальцита, которые заполнили поры гипсовых образцов, что привело к улучшению прочностных показателей. Также увеличился коэффициент водостойкости, который представляет собой отношение прочности при сжатии образца в насыщенном водой состоянии к прочности высушенного образца.

Таблица 3.11. Характеристики гипсовых образцов после суток эксперимента.

Свойства образцов	Контроль	После пребывания в растворах:			
		1. Среда Дика	2. Среда Дика + <i>Lysinibacillus macroides</i>	3. Среда Дика + CaCl ₂	4. Среда Дика + <i>Lysinibacillus macroides</i> + CaCl ₂
Прочность при изгибе, МПа	5,71	5,10	5,73	5,34	6,79
Прочность при сжатии, МПа	11,5	11,6	11,2	11,1	12,7
Пористость открытая, см ³ /г	0,27	0,26	0,22	0,25	0,12
Коэффициент водостойкости	0,34	0,33	0,36	0,34	0,62

Результаты, представленные в таблице 3.11, согласуются с исследованием поверхности гипсовых образцов с помощью СЭМ (Рисунок 3.34).

Кроме призматических и игольчатых форм кристаллов CaSO₄×2H₂O после пребывания в растворе 4 стали заметны кристаллы кальцита – CaCO₃, которые присутствуют на стенках капиллярных пор. Их образование приводит к уплотнению структуры и улучшает прочностные и водоотталкивающие характеристики гипсовых образцов.

Кристаллизация мелкодисперсной формы CaCO_3 в порах гипсовых образцов происходит за счет высокой уреазной активности и биокальцинирующей способности *Lysinibacillus macroides* в среде Дика с источником ионов кальция.

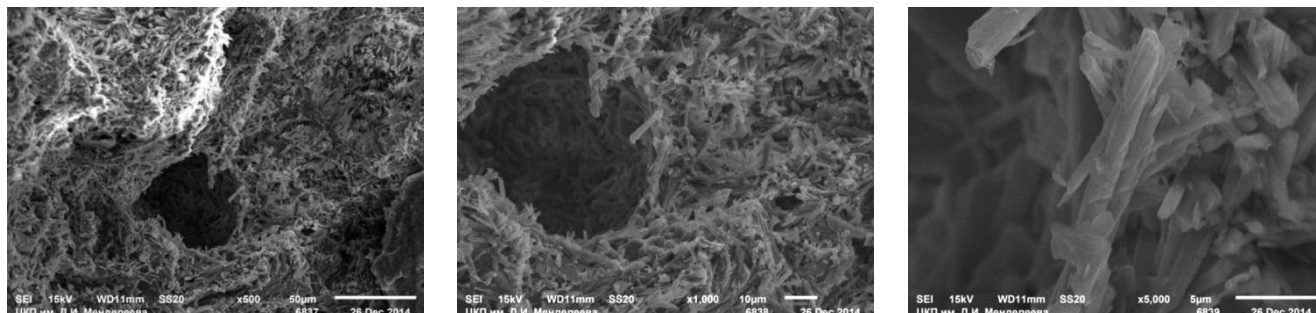


Рисунок 3.34. СЭМ гипсовых образцов, внесенных в раствор 4.

3.7.5. Изучение характеристик цементного камня при введении уробактерий

Внесение бактерий с разной функциональной активностью в цементную смесь на основе среды Дика с глюкозой проводили на стадии спорообразования. У сформированных в виде балочек образцов в течение 28 суток производили замер параметров.

Установлено, что прочность при изгибе цементных образцов, затворенных водой, мало меняется в течении 28 суток. Прочность образцов, затворенных средой Дика, несколько ниже прочности контрольных балочек, что объясняется влиянием органических компонентов среды. Существенная разница в характеристиках наблюдалась у цементного камня с бактериальными культурами. Так, при использовании микроорганизмов *Bacillus subtilis* К к 28 суткам происходит повышение прочности при изгибе на 9,8% относительно контрольных образцов и на 13,1% относительно образцов, затворенных средой Дика. При использовании культуры бактерий *Lysinibacillus macroides* в составе биоцемента повышение прочности к 28 суткам составило 38,2% и 42% относительно контрольных образцов и образцов на основе среды Дика соответственно (Рисунок 3.35).

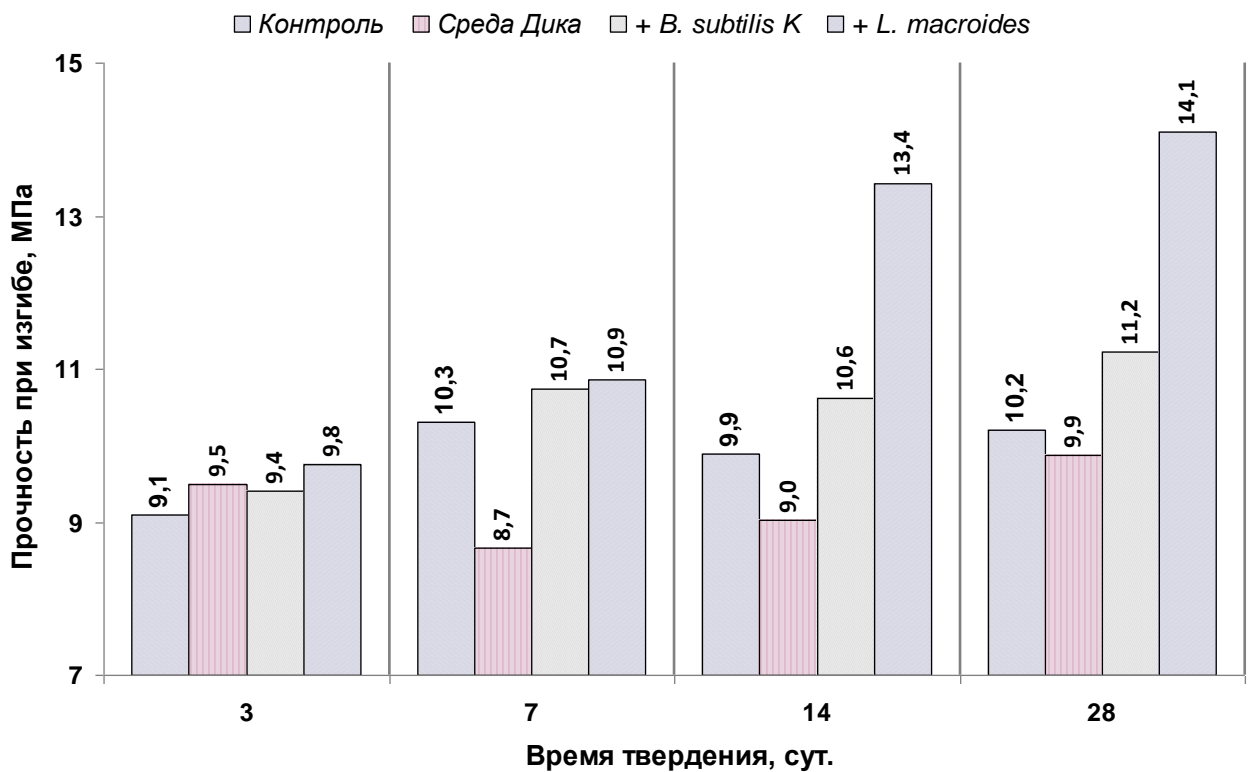


Рисунок 3.35. Влияние уробактерий *Bacillus subtilis* К и *Lysinibacillus macroides* на прочность цементного камня при изгибе.

Прочность при сжатии цементных образцов, затворенных водой, на 7 сутки составила 63,0 МПа, а к 28 суткам – 70,1 МПа (Рисунок 3.36). Прочность образцов, затворенных средой Дика, практически не отличается от прочности контрольных балочек. У образцов цементного камня с *Bacillus subtilis* К наблюдали повышение прочности относительно образцов балочек цементного камня, затворенных средой Дика, на 26,5% к 28 суткам. При использовании бактерий *Lysinibacillus macroides* повышение прочности на 28 сутки составило 67,8% относительно образцов, затворенных средой Дика. На основании этих результатов можно утверждать, что образовавшиеся в результате жизнедеятельности уробактерий кристаллы CaCO_3 уплотняют структуру и значительно повышают прочность цемента. Возможно также образование кристаллов гидрокарбоалюминатов кальция при взаимодействии гидроалюминатов кальция с CaCO_3 . Наибольшее повышение прочности

происходит при использовании культур бактерий *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis* (функциональная активность аналогична), выделенных из гиперсоленых сред и обладающих повышенной устойчивостью к высоким значениям рН. Как отмечено в литературе, присутствие питательных веществ в цементных образцах обеспечивает защиту и повышенную жизнеспособность клеток и спор, подвергнутых воздействию характерных для цемента высоких значений рН.

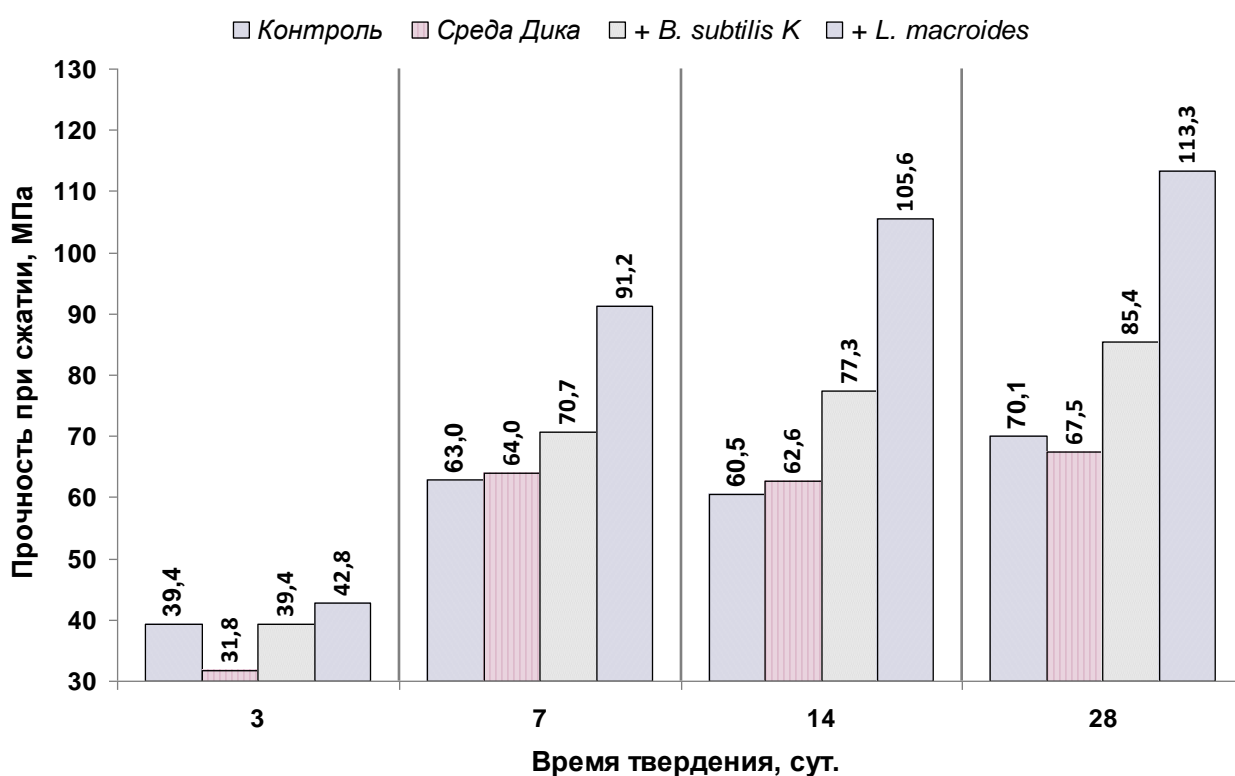


Рисунок 3.36. Влияние уробактерий *Bacillus subtilis* К и *Lysinibacillus macroides* на прочность цементного камня при сжатии.

3.7.6. Исследование функциональной активности иммобилизованных клеток уробактерий и микроструктуры иммобилизованной формы на основе диатомита

Одним из преимуществ иммобилизации является повышение устойчивости клеток и спор к действию неблагоприятных внешних факторов, таких как неоптимальная температура, рН, ингибирование продуктами метаболизма. Для

препарата иммобилизованных клеток, вносимых в цементную смесь, важно, чтобы бактерии или споры оставались длительное время жизнеспособными и развивали с течением времени максимальную физиологическую активность. Для иммобилизации клеток исследуемых микроорганизмов использовали мелкодисперсную форму силикагеля, перлита, вермикулита, диатомита, трепела, целлюлозы, активированных углей. Максимальную степень сорбции клеток наблюдали для диатомита, трепела и активированных углей – $(4-6) \times 10^7$ клеток/г. Иммобилизованные на сорбентах и высушенные при 35-40 °С *Lysinibacillus macroides*, *Bacillus licheniformis* после двух месяцев хранения при 25-30 °С лучше других исследованных культур сохраняли функциональную активность. При исследовании жизнеспособных форм этих бактерий в адсорбентах при высевах на питательную среду выявлено нарастание колониеобразующих единиц (КОЕ) с $(4-6) \times 10^7$ клеток/г после высушивания до $(2-3) \times 10^9$ клеток/г через 2 месяца хранения. Это может быть связано как с остаточной влажностью высушенных образцов, так и с адсорбцией компонентов питательной среды на адсорбентах.

Микроструктура иммобилизованной формы бактерий *Lysinibacillus macroides* на диатомите исследована сканирующей электронной микроскопией после двух месяцев хранения. Эта иммобилизованная форма проявляла максимальную функциональную активность в предварительных экспериментах по биокальцинированию на колбах, что согласуется и с литературными данными [1022]. На микрофотографиях иммобилизованной формы видны частицы диатомита с плотным слоем покрытых оболочкой спор бактерий размером 1–3 мкм (Рисунок 3.37).

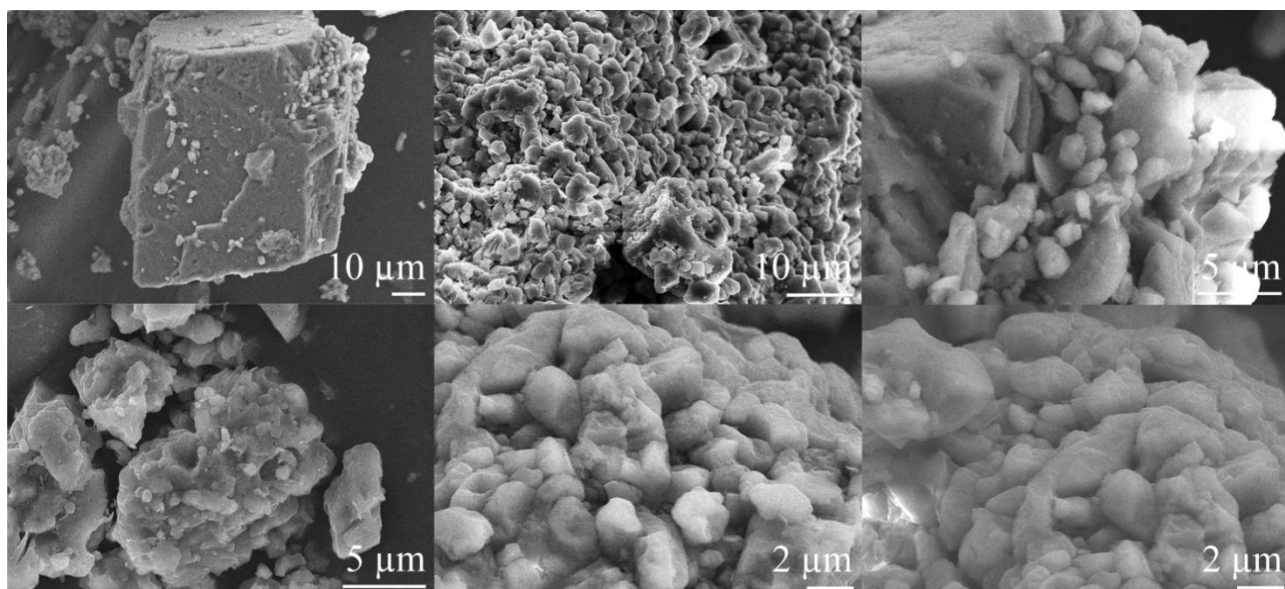


Рисунок 3.37. Споры бактерий на поверхности частиц диатомита.

При исследовании частиц диатомита с микробиологической добавкой методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) зарегистрирован ряд интенсивных пиков, соответствующих элементам Ca, O, K, Al, Si, Mg и C, что может указывать на наличие органических объектов, вероятно покрытых слоем карбоната кальция (Рисунок 3.38).

Таким образом, адсорбция бактерий *Lysinibacillus macroides* на минеральном носителе, диатомите, с последующей сушкой при умеренных температурах позволяет получить иммобилизованную, содержащую споры форму. Частичное покрытие спор оболочкой дополнительно предохраняет их от воздействия окружающей среды, что важно для сохранности препарата.

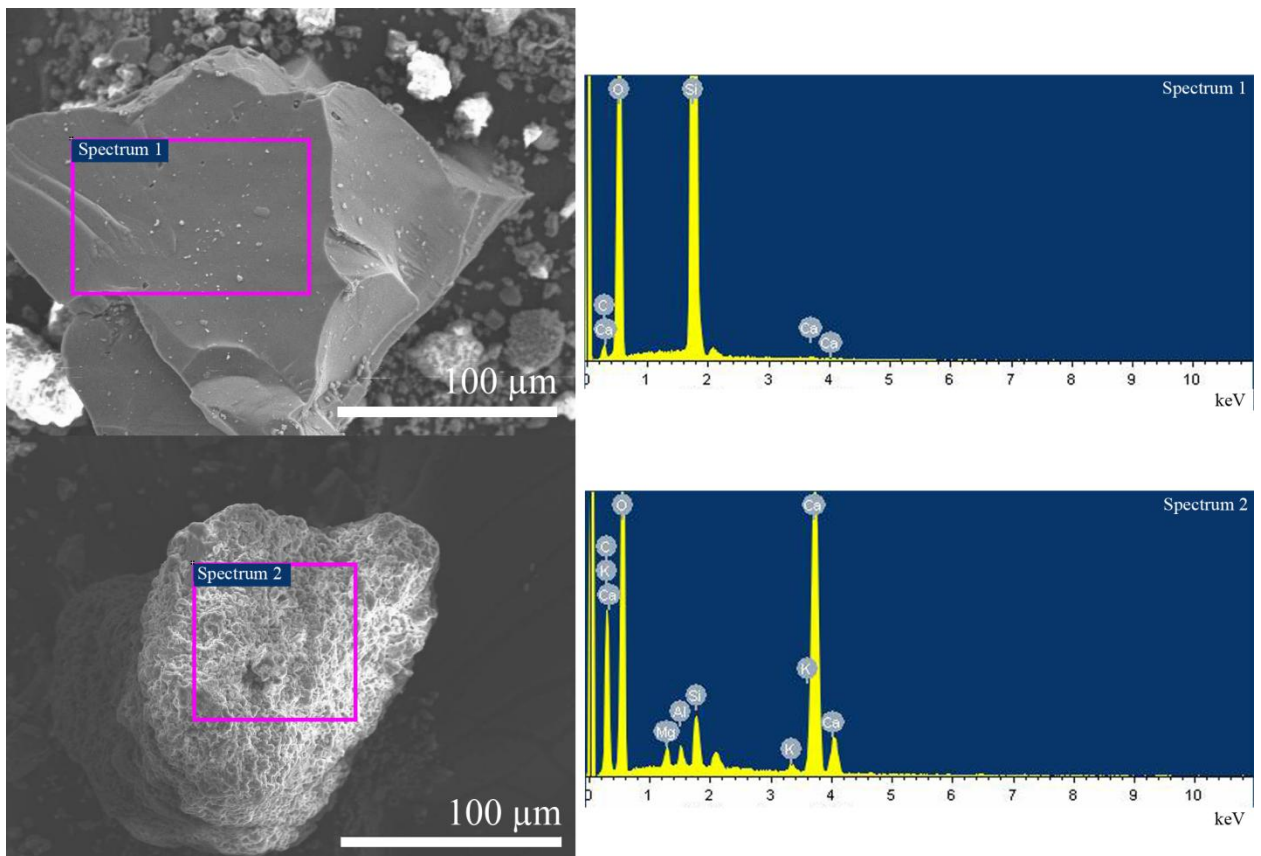


Рисунок 3.38. ЭДС образцов иммобилизованной формы.

В последующих экспериментах использованы иммобилизованные на диатомите высушенные бактериальные образцы, добавленные непосредственно в цементную смесь на основе среды Дика с глюкозой. Иммобилизованную форму вводили в состав цемента в виде сухого порошка в количестве 3% (по массе). В качестве затворителя при приготовлении цементного раствора использовалась среда Дика с глюкозой при значении В/Ц 0,3. Для сравнения формовали образцы цемента с добавлением исходного адсорбента, диатомита, в том же количестве. Результаты определения прочностных характеристик цемента представлены на рисунках 3.39 и 3.40.

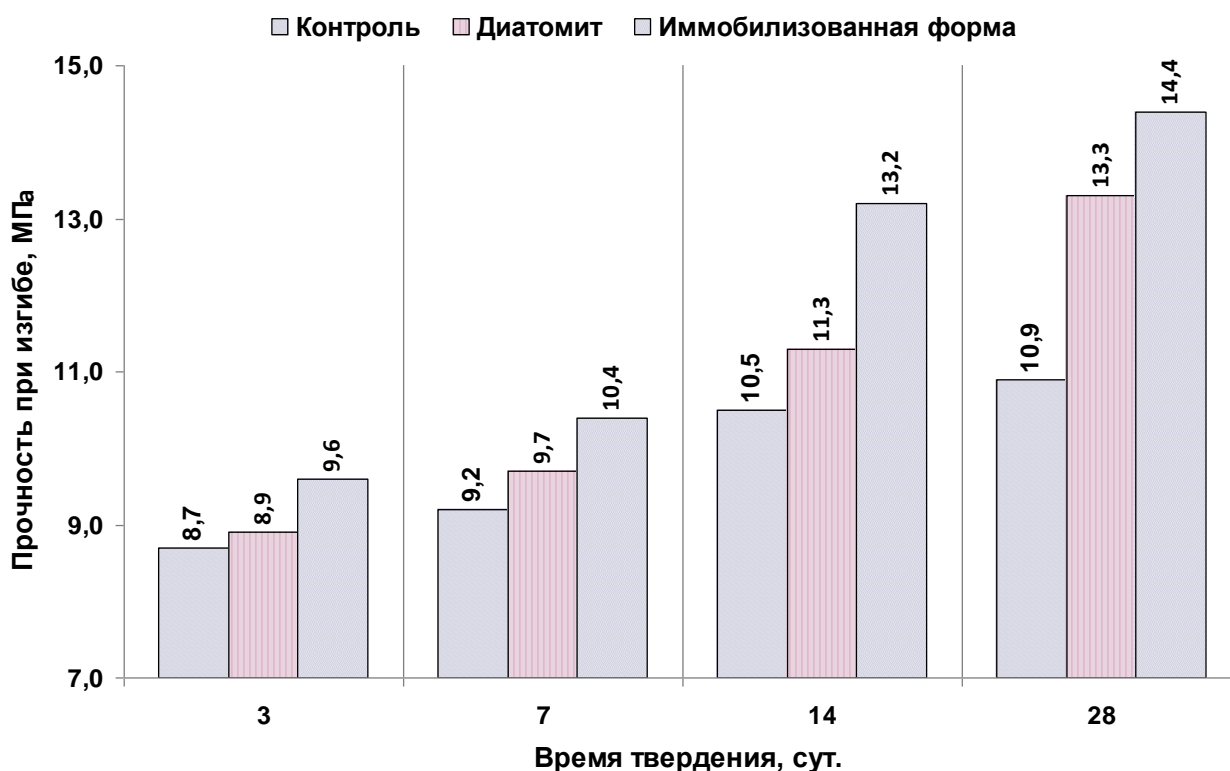


Рисунок 3.39. Влияние иммобилизованной формы *Lysinibacillus macroides* на прочность цементного камня при изгибе.

При исследовании прочности на изгиб (Рисунок 3.39) наблюдали незначительное повышение прочности цемента с иммобилизованными в диатомите бактериями *Lysinibacillus macroides*, что связано, вероятно, с заполнением части пор цементного камня образующимся в результате биоминерализации карбонатом кальция.

При исследовании прочности цементного камня на сжатие (Рисунок 3.40) к 28 суткам наблюдали повышение прочности образцов с иммобилизованной формой культуры *Lysinibacillus macroides* на 85,2% по сравнению с контрольными, в то же время применение диатомита на основе среды Дика без бактерий практически не оказывало влияния на процессы твердения.

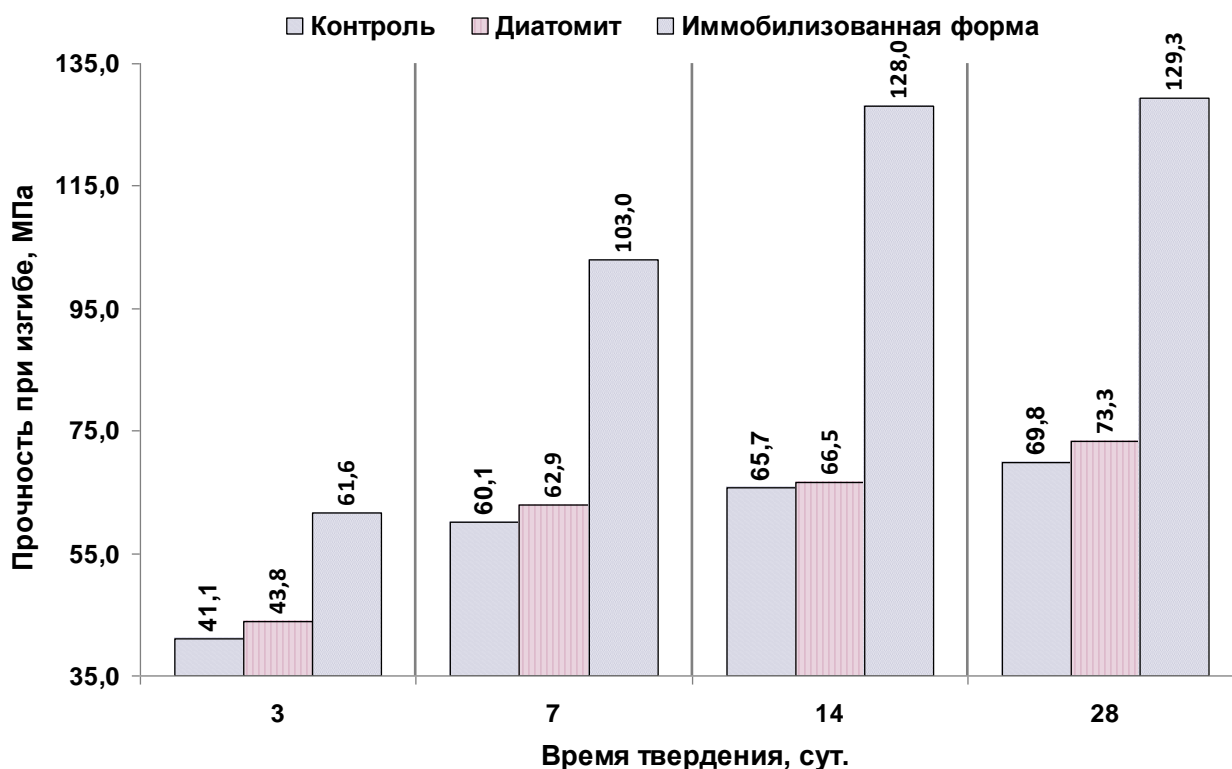


Рисунок 3.40. Влияние иммобилизованной формы *Lysinibacillus macroides* на прочность цементного камня при сжатии.

При исследовании структурных характеристик цементного камня показано, что использование микробиологической добавки приводит к осаждению CaCO_3 в поровом пространстве образцов, уплотняя структуру и снижая пористость цемента, а также к 28 суткам уменьшает капиллярное водопоглощение цементного камня в 1,6 раза (Таблица 3.12).

Таким образом, использование иммобилизованной культуры *Lysinibacillus macroides* в качестве добавки к цементу приводило к повышению его прочностных и улучшению структурных характеристик, как и при использовании культур живых бактерий. Применение иммобилизованной формы культуры позволит снизить скорость разрушения изделия в результате индуцированного бактериями «залечивания» микротрещин на начальном этапе возникновения, а также благодаря снижению числа открытых капиллярных пор повысить стойкость цементного камня к агрессивным средам.

Таблица 3.12. Характеристики образцов после твердения в течение 28 суток.

Образец	Открытая пористость, см ³ /г	Коэффициент капиллярного водопоглощения, кг/м ² ·с ^{0,5}
Контроль (цемент + среда Дика)	0,158	0,0575
Цемент + среда Дика + диатомит	0,132	0,0473
Цемент + среда Дика + иммобилизованная форма	0,063	0,0355

Повышение прочности образцов цемента, сформированных в присутствии *Lysinibacillus macroides*, свидетельствует о сохранении жизнеспособности и функциональной активности бактерий. Наибольшая прочность на сжатие достигнута для образцов с иммобилизованными в диатомите бактериальными клетками, причем сорбент здесь тоже играет важную роль – заполняя поры, дополнительно укрепляет цемент.

3.7.7. “Залечивание” трещин в бетоне с применением препаратов уробактерий

Эффективность использования уробактерий для залечивания трещин в бетоне анализировали путем погружения образцов цементного камня в питательную среду Дика с 7,5 г/л CaCl₂ и суспензией вегетативных клеток и спор (с остатками инактивированных клеток) бактерий *Lysinibacillus macroides*. Состояние трещин контролировали через 7, 21 и 28 суток (Рисунок 3.41).

В среде с вегетативными клетками заметно заполнение трещин на 21 и 28 сутки образовавшимся карбонатом кальция, а также образование белого налета на поверхности образцов. Трещины в цементных образцах, погруженных в среду с суспензией спорулирующей культуры бактерий и спор, обладающих высокой проникающей способностью, визуально исчезли.

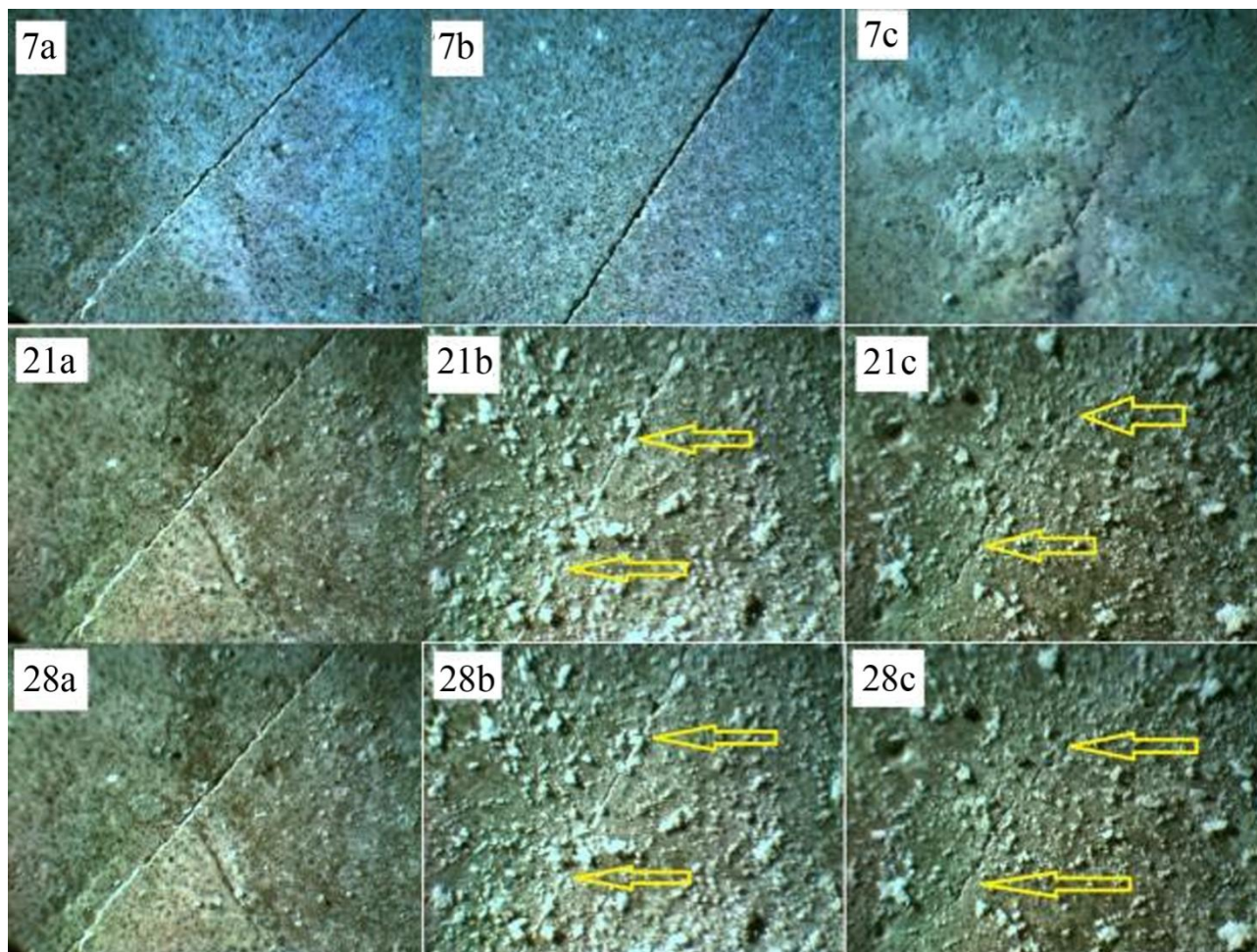


Рисунок 3.41. Заполнение трещин в цементном камне карбонатом кальция: *a* – контроль, *b* – вегетативные клетки, *c* – взвесь спор и остатки инактивированных клеток. Цифрами указано время процесса: 7, 21 и 28 суток.

Биотехнологический потенциал бактерий рода *Bacillus*, выделенных из гиперсоленых сред и обладающих способностью к биоосаждению кальция, может быть использован для получения биопрепаратов и применения в воспроизводимой природоподобной технологии индуцированного микроорганизмами осаждения кальция.

Введение выделенных бактерий в состав цементной смеси на основе питательной среды Дика приводит к существенному увеличению прочности цементного камня при изгибе и сжатии, особенно в поздние (14 и 28 суток) сроки твердения. Наибольшее повышение прочности наблюдали при использовании

бактерий *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis*, которые проявляют высокую уреазную активность, устойчивы к щелочным средам и способны к биоосаждению кальция. Эти культуры могут быть использованы для эффективного залечивания трещин в поврежденных бетонных конструкциях.

Повышение прочности цементного камня под воздействием бактерий связано с уплотнением структуры цементного камня, уменьшением его капиллярной пористости вследствие образования дополнительных количеств карбоната кальция, образующегося в результате взаимодействия портландита, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ с продуктами жизнедеятельности бактерий.

Использование для приготовления цементной смеси на основе питательной среды Дика иммобилизованной формы спор бактерий в диатомите позволяет значительно повысить прочность цементного камня в процессе твердения. Иммобилизованная форма бактериального препарата высокотехнологична, удобна в использовании и обеспечивает его длительное хранение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлены результаты исследований, направленных на совершенствование биотехнологического культивирования и применения продуктов биосинтеза экстремально галофильных микроорганизмов на основе детального учёта уникальных свойств этой группы специфических микроорганизмов. Для галоархей, как модельных экстремально галофильных микроорганизмов, разработаны новые композиции питательных сред, показано влияние и возможное действие продуктов химического/фотохимического окисления, как самих компонентов питательной среды, так и возможных метаболитов на биосинтетическую активность разных штаммов–продуцентов бактериородопсина и каротиноидов.

Изучены биотехнологические аспекты, способные обеспечить высокоплотностное культивирование галоархей, прежде всего – антиоксидантные свойства, химическая/фотохимическая трансформация компонентов питательной среды и метаболитов клеток *Hbt. salinarum*, а также режимы освещения растущих культур. Комплексный подход в данных исследованиях определялся тем, что перечисленные параметры находятся в тесной взаимосвязи и определяют итоговую биосинтетическую активность штаммов-продуцентов значимых целевых БАС. На основании исследования этих связей впервые предложен алгоритм и программное обеспечение для управления режимами высокоплотностного культивирования *Hbt. salinarum*, обеспечивающий возможность задавать направленность биосинтетических активностей клеток этих галоархей.

Впервые для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* использованы ферментолизаты зерновых как источники аминокислотного питания и ростовых факторов.

Оптимизирован процесс распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum*, исследовано длительное хранение высушенной биомассы, изучен характер сопутствующих повреждений клеток экстремально галофильных архей.

Доказано, что при нестерильном культивировании экстремально галофильных архей и высокогалотолерантных бактерий возможна контаминация и быстрое замещение исходных культур микроорганизмов-продуцентов. Впервые показана возможность развития негалотолерантных бактерий рода *Bacillus* совместно с экстремально галофильными археями или высокогалотолерантными бактериями в условиях экстремально высокой солености среды. Показана возможность индукции галовирусов непосредственно в ходе культивирования экстремально галофильных архей.

Из микробных сообществ гиперсоленых сред выделены в чистом виде бактериальные культуры, обладающие высокой уреазной активностью и способностью к биокальцинированию. Изучена возможность использования биопрепаратов на основе культур биокальцинирующих бактерий для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона.

Получены высокопродуктивные штаммы галоархей *Hbt. salinarum* для биотехнологического применения: новые штаммы-продуценты фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина, отличающиеся сниженным уровнем спонтанных мутаций; штамм-продуцент С₅₀-каротиноидов, обладающий повышенной устойчивостью к поражению вирусами.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые варианты синтетических питательных сред для экстремофильных галоархей продуцентов каротиноидов и бактериородопсина (*Hbt. salinarum* 353П и *Hbt. salinarum* ET-1001), в которых по сравнению с базовым вариантом исключен ряд аминокислот, а АМФ и УМФ заменены препаратом рибонуклеиновой кислоты дрожжей *Torula utilis*. При оптимизации синтетической питательной среды для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* было показано стрессирующее действие продуктов окисления/фотоокисления ароматических кислот, что влияет как на уровень накопления биомассы, так и на уровень биосинтеза каротиноидов и бактериородопсина. Преимущество синтетической питательной среды, разработанной для продуцента бактериородопсина, состоит в отсутствие посторонних примесей липидной и белковой природы, которые усложняют выделение этого белка.

2. Показано, что антиоксидантные свойства, химическая/фотохимическая трансформация компонентов питательной среды и метаболитов клеток *Hbt. salinarum*, а также режимы освещения растущей культуры находятся в тесной взаимосвязи и определяют биосинтетическую активность штаммов-продуцентов при любом режиме культивирования галоархей, в том числе высокоплотностном. На основании исследования этих связей впервые предложен адаптивный алгоритм управления режимами высокоплотностного культивирования галоархей *Hbt. salinarum* и направленности биосинтетических активностей клеток этих продуцентов.

3. Получены новые высокопродуктивные штаммы галоархей *Hbt. salinarum*: несколько штаммов-продуцентов фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина, отличающиеся сниженным уровнем спонтанных мутаций; штамм-продуцент C_{50} -каротиноидов, обладающий повышенной устойчивостью к поражению вирусами. Новые культуры депонированы в официальных Коллекциях микроорганизмов (Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НБЦ ВКПМ и коллекции уникальных и экстремофильных

микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения (UNIQEM).

4. Предложены следующие технологические подходы для повышения эффективности процессов культивирования экстремальных галофильных продуцентов: метод подготовки посевного материала с внесением адсорбента (MN500 или инкапсулированный активированный уголь АГ-3), уменьшающий вероятность спонтанных мутаций штамма-продуцента, увеличивающий жизнеспособность клеток и срок хранения посевного материала (инокулята); применение антиоксидантов (цистеина, токоферола, аскорбиновой кислоты) при культивировании для снижения окислительных повреждений среды, а также спектральные характеристики и режимы освещения, оптимальные для культивирования продуцентов бактериородопсина и каротиноидов.

5. Разработаны высокоавтоматизированные режимы непрерывного и высокоплотностного культивирования галоархей *Hbt. salinarum* для штаммов-продуцентов каротиноидов и бактериородопсина. Для штамма *Hbt. salinarum* КСК-03307 в процессе с доливом питательной среды, субстратными подпитками и рециклом культуральной жидкости через адсорбент, за 8 суток накапливалось до 45 г/л биомассы при суммарном содержании БР 1,750 г/л. При данном режиме культивирования в лизате биомассы практически отсутствуют каротиноиды, что позволяет существенно облегчить выделение бактериородопсина. Для штамма *Hbt. salinarum* 353 П-1 в мембранном реакторе за 7 суток культивирования содержание биомассы достигало 48 г/л при содержании каротиноидов до 35 мг/100 г биомассы.

6. Создан высокоавтоматизированный комплекс для культивирования галофильных микроорганизмов, разработан опытно-промышленный регламент эксплуатации этого комплекса и программное обеспечение “BioDrome 3.0” для управления биосинтетическими процессами, в которое интегрирована экспресс-методика определения содержания бактериородопсина. Управление комплексом обеспечивает поддержание оптимизированных режимов культивирования и

разработанных вариантов автоматической регуляции биосинтеза серии целевых БАС, синтезируемых галофильными микроорганизмами.

7. На основе ферментоллизатов пшеничной и ячневой круп составлены питательные среды для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* 353П, которые по своим характеристикам превосходят стандартные среды для культивирования галоархей на комплексных субстратах – источниках аминокислот и ростовых факторов, включающие дорогостоящие триптон, пептон и дрожжевой экстракт. Важной составляющей разработанных питательных сред являются источники микроэлементов, оптимальные концентрации которых подобраны: соли Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , которые влияют на протеолитическую активность галоархей, степень потребления белка, накопление биомассы и каротиноидов.

8. С помощью искусственных нейронных сетей определены оптимальные режимы распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum* для получения высушенного продукта с остаточной влажностью <5%. Показано, что температура входного сушильного газа должна находиться в пределах от 120 до 130 °С; расход сушильного газа – в диапазоне от 30 до 31 м³/ч; расход сжатого воздуха – 831 л/час; скорость подачи суспензии биомассы зависит от условий культивирования и составляет 5,7 г/мин для стандартного варианта, и 5,0 г/мин для культивирования с удалением метаболитов, влияющих на выработку каротиноидов.

9. Изучены характеристики инкапсулированных в соль клеток галоархей, полученных при распылительной сушке. С помощью электронной микроскопии установлен характер повреждений клеток в процессе длительного хранения высушенного продукта.

10. Установлен факт сохраняющейся активности и способности к восстановлению жизнеспособности клеток галоархей после длительного хранения в высушенном состоянии в солевых гранулах при низкой остаточной влажности до 5% и температуре 4 °С. Максимум улучшения характеристик реактивации приходится на 4 месяц хранения. Для комплексного описания высушенных

образцов предложено использовать характеристики глубинного культивирования, отражающие скорость реактивации клеток.

11. Показано отрицательное влияние метаболитов, вырабатываемых при культивировании галоархей, на показатели реактивации при длительном хранении после высушивания биомассы. Удаление метаболитов при культивировании галоархей после распылительной сушки способствует более длительному сохранению жизнеспособности части клеток – они лучше сохраняют свою структуру при внедрении в кристалл и в некоторых случаях сохраняют способность к реактивации на агаризованной среде после 2-х лет хранения.

12. В нестерильных экспериментах с экстремально галофильными археями *Hbt. salinarum* и высокогалотолерантными бактериями *Halomonas utahensis* выделена и охарактеризована контаминирующая микрофлора, которая в некоторых случаях замещала исходную культуру. Установлено влияние различных факторов на развитие контаминирующих микроорганизмов, представители которых относились к родам *Natronococcus*, *Alkalibacillus*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Lysinibacillus* и *Bacillus*. Последние два вида бактерий, не являясь высокогалотолерантными, были способны размножиться в модельных опытах и в той или иной степени подавлять рост *Hbt. salinarum* или *Halomonas utahensis* при совместном культивировании. На основе проведенных исследований предложены подходы, снижающие отрицательные эффекты контаминации при нестерильном культивировании экстремальных галофилов. Отмечены случаи спонтанной индукции вирусов из лизогенных клеток галоархей и в целом негативное влияние вирусов на процессы высокоплотного культивирования.

13. Произведена технико-экономическая оценка производства биомассы *Hbt. salinarum* и бактериородопсина при различных вариантах культивирования продуцентов. Разработан опытно-промышленный регламент производства биомассы экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum* и фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина.

14. Разработан лабораторный технологический регламент производства иммобилизованной формы биопрепарата, обладающего высокой биокальцинирующей активностью и устойчивостью к щелочной среде для использования в качестве технической добавки, улучшающей функциональные и защитные характеристики бетона. Основой биопрепарата являются чистые культуры бактерий *Lysinibacillus macroides*, выделенные из микробного сообщества гиперсоленого озера. Разработанный регламент обеспечивает биотехнологическое получение биопрепарата и его длительное хранение.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Garrels R. M., Thompson M. E. A chemical model for sea water at 25 degrees C and one atmosphere total pressure // *American Journal of Science*. 1962. № 260. P. 57-66.
2. Oren A. Ecology of halophiles. // In: Koki Horikoshi (eds). *Extremophiles handbook*. 2011. P. 343-361.
3. Oren A. *Halophilic microorganisms and their environments*. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.
4. Javor B. J. *Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry*. Springer Science & Business Media, 2012.
5. Belmonte G., Moscatello S., Batogova E. A., Pavlovskaya T., Shadrin N. V., Litvinchuk L. F. Fauna of hypersaline lakes of the Crimea (Ukraine) // *Thalassia Salentina*. 2012. № 34. P. 11-24.
6. Antunes A., Ngugi D. K., Stingl U. Microbiology of the Red Sea (and other) deep-sea anoxic brine lakes // *Environmental microbiology reports*. 2011. № 3(4). P. 416-433.
7. Larson R., Eilers J., Kreuz K., Pecher W. T., DasSarma S., Dougill S. Recent desiccation-related ecosystem changes at Lake Abert, Oregon: a terminal alkaline salt lake // *Western North American Naturalist*. 2016. № 76(4). P. 389-404.
8. Shumilin E., Grajeda-Muñoz M., Silverberg N., Sapozhnikov D. Observations on trace element hypersaline geochemistry in surficial deposits of evaporation ponds of Exportadora de Sal, Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico // *Marine Chemistry*. 2002. № 79(3-4). P. 133-153.
9. Cita M. B. Exhumation of Messinian evaporites in the deep-sea and creation of deep anoxic brine-filled collapsed basins // *Sedimentary Geology*. 2006. № 188. P. 357-378.
10. Asencio A. D. Permanent salt evaporation ponds in a semi-arid Mediterranean region as model systems to study primary production processes under hypersaline conditions // *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2013. № 124. P. 24-33.

11. McGenity T. J., Oren A. Hypersaline environments // In: Bell E.M. (eds). *Life at extremes: environments, organisms and strategies for survival*. 2012. P. 402-437.
12. Mondino L. J., Asao M., Madigan M. T. Cold-active halophilic bacteria from the ice-sealed Lake Vida, Antarctica // *Archives of microbiology*. 2009. № 191(10). P. 785-790.
13. Goordial J., Lamarche-Gagnon G., Lay C. Y., Whyte L. Left out in the cold: life in cryoenvironments // In: Seckbach J., Oren A. and Stan-Lotter H. (eds). *Polyextremophiles*. Springer, Dordrecht. 2013. P. 335-363.
14. DasSarma S., DasSarma P. Halophiles // *eLS*. 2017. P. 1-13.
15. Edbeib M. F., Wahab R. A., Huyop, F. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016. № 32(8). P. 1-23.
16. Spear J. R., Ley R. E., Berger A. B., Pace N. R. Complexity in natural microbial ecosystems: the Guerrero Negro experience // *The Biological Bulletin*. 2003. № 204(2). P. 168-173.
17. Ley R. E., Harris J. K., Wilcox J., Spear J. R., Miller S. R., Bebout B. M., Maresca J.A., Bryant D.A., Sogin M.L., Pace N. R. Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat // *Applied and environmental microbiology*. 2006. № 72(5). P. 3685-3695.
18. Burns B. P., Goh F., Allen M., Neilan B. A. Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia // *Environmental Microbiology*. 2004. № 6(10). P. 1096-1101.
19. Baxter B. K., Zalar P. The Extremophiles of great salt lake: complex microbiology in a dynamic hypersaline ecosystem. In: Seckbach J. and Rampelotto P. // *Model Ecosystems in Extreme Environments*. Academic Press. 2019. P. 57-99.
20. Krijgsman W., Hilgen F. J., Raffi I., Sierro F. J., Wilson D. S. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis // *Nature*. № 400(6745). P. 652-655.

21. Oren A. The dying Dead Sea: the microbiology of an increasingly extreme environment // *Lakes & Reservoirs: Research & Management*. 2010. № 15(3). P. 215-222.
22. Imhoff J. F., Sahl H. G., Soliman G. S., Trüper H. G. The Wadi Natrun: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes // *Geomicrobiology Journal*. 1979. № 1(3). P. 219-234.
23. Ward B. B., Martino D. P., Diaz M. C., Joye S. B. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences // *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. № 66(7). P. 2873-2881.
24. Pikuta E. V., Detkova E. N., Bej A. K., Marsic D., Hoover R. B. Anaerobic halo-alkaliphilic bacterial community of athalassic hypersaline from Mono Lake and Owens Lake in California // In: Hoover R.B., Rozanov A. Yu. and Paepe R.R. (eds). *Instruments, methods, and missions for astrobiology*. International Society for Optics and Photonics. 2003. P. 130-144.
25. Rees H. C., Grant W. D., Jones B. E., Heaphy S. Diversity of Kenyan soda lake alkaliphiles assessed by molecular methods // *Extremophiles*. 2004. № 8(1). P. 63-71.
26. Jones B. E., Grant W. D., Duckworth A. W., Owenson G. G. Microbial diversity of soda lakes // *Extremophiles*. 1998. № 2(3). P. 191-200.
27. Antony C. P., Kumaresan D., Hunger S., Drake H. L., Murrell J. C., Shouche Y. S. Microbiology of Lonar Lake and other soda lakes // *The ISME journal*. 2013. № 7(3). P. 468-476.
28. Deng Y., Liu Y., Dumont M., Conrad R. Salinity affects the composition of the aerobic methanotroph community in alkaline lake sediments from the Tibetan Plateau // *Microbial ecology*. 2017. № 73(1). P. 101-110.
29. Foti M. J., Sorokin D. Y., Zacharova E. E., Pimenov N. V., Kuenen J. G., Muyzer G. Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia) // *Extremophiles*. 2008. № 12(1). P. 133-145.

30. Yang J., Jiang H., Wu G., Dong H. Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes // Scientific reports. 2016. № 6. P. 1-6.
31. Mapelli F., Borin S., Daffonchio D. Microbial diversity in deep hypersaline anoxic basins // In: Stan-Lotter H. and Fendrihan S. (eds). Adaption of microbial life to environmental extremes. Springer, Vienna. 2012. P. 21-36.
32. Antunes A. Extreme Red Sea: life in the deep-sea anoxic brine lakes // In: Agius D.A., Khalil E., Scerri E.M.L. and Williams A. (eds). Human Interaction with the Environment in the Red Sea. Brill. 2017. P. 30-47.
33. Merlino G., Barozzi A., Michoud G., Ngugi D. K., Daffonchio D. Microbial ecology of deep-sea hypersaline anoxic basins // FEMS microbiology ecology. 2018. № 94(7). P. 1-15.
34. Varrella S., Tangherlini M., Corinaldesi C. Deep Hypersaline Anoxic Basins as Untapped Reservoir of Polyextremophilic Prokaryotes of Biotechnological Interest // Marine drugs. 2020. № 18(2). P. 1-32.
35. Antunes A., Kaartvedt S., Schmidt M. Geochemistry and life at the interfaces of brine-filled deeps in the Red Sea // In: Rasul N. M. A. and Stewart I. C. F. (eds). Oceanographic and Biological Aspects of the Red Sea. Springer, Cham. 2019. P. 185-194.
36. Duarte C. M., Røstad A., Michoud G., Barozzi A., Merlino G., Delgado-Huertas A., Hession B. C., Mallon F. L., Afifi A. M., Daffonchio D. Discovery of Afifi, the shallowest and southernmost brine pool reported in the Red Sea // Scientific reports. 2020. № 10(1). P. 1-17.
37. La Cono V., Bortoluzzi G., Messina E., La Spada G., Smedile F., Giuliano L., Borghini M., Stumpp C., Schmitt-Kopplin P., Harir M., O'Neill W. K., Hallsworth J. E., Yakimov M. The discovery of Lake Hephaestus, the youngest athalassohaline deep-sea formation on Earth // Scientific reports. 2019. № 9(1). P. 1-11.
38. Aiello I. W., Beaufort L., Goldhammer T., Heuer V. B., Hinrichs K. U., Zabel M. Anatomy of a 'suspended' seafloor in the dense brine waters of the deep

hypersaline Urania Basin // Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography. 2020. № 171. P. 1-14.

39. Steinle L., Knittel K., Felber N., Casalino C., de Lange G., Tessarolo C., Stadnitskaia A., Sinninghe Damsté J. S., Zopfi J., Lehmann M. F., Treude T., Niemann H. Life on the edge: active microbial communities in the Kryos MgCl₂-brine basin at very low water activity // The ISME journal. 2018. № 12(6). P. 1414-1426.

40. Joye S. B., MacDonald I. R., Montoya J. P., Peccini M. Geophysical and geochemical signatures of Gulf of Mexico seafloor brines // Biogeosciences. 2005. № 2. P. 295–309.

41. Schmidt M., Al-Farawati R., Botz, R. Geochemical classification of brine-filled Red Sea deeps // In: Rasul N. M. A. and Stewart I. C. F. (eds). The Red Sea. Springer, Berlin, Heidelberg. 2015. P. 219-233.

42. Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity // Saline systems. 2008. № 4(1). P. 1-13.

43. Kushner D. J. Microbial life in extreme environments. Academic Press, 1978.

44. Oren A. Microbial diversity and microbial abundance in salt-saturated brines: why are the waters of hypersaline lakes red? // Natural Resources and Environmental Issues. 2009. № 15(1). P. 247-255.

45. Oren A. Life in hypersaline environments // In: Hurst C. J. (eds). Their World: A Diversity of Microbial Environments. Springer, Cham. 2016. P. 301-339.

46. Oren A. Life in High-Salinity Environments // In: Yates M.V., Nakatsu C.H., Miller R.V. and Pillai S.D. (eds). Manual of Environmental Microbiology. 2016. P. 1-13.

47. Walsby A. E. The pressure relationships of gas vacuoles // Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences. 1971. № 178(1052). P. 301-326.

48. Kempf B., Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments // Archives of microbiology. 1998. № 170(5). P. 319-330.

49. Roberts M. F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms // Saline systems. 2005. № 1(1). P. 1-30.
50. Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations // FEMS microbiology reviews. 2018. № 42(3). P. 353-375.
51. Ventosa A., Nieto J. J., Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria // Microbiology and molecular biology reviews. 1998. № 62(2). P. 504-544.
52. Roberts M. F. Osmoadaptation and osmoregulation in archaea: update 2004 // Frontiers in Bioscience. 2004. № 9. P. 1999-2019.
53. Oren A. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes // Frontiers in microbiology. 2013. № 4. P. 1-6.
54. Oren A. Intracellular salt concentrations of the anaerobic halophilic eubacteria *Haloanaerobium praevalens* and *Halobacteroides halobius* // Canadian journal of microbiology. 1986. № 32(1). P. 4-9.
55. Oren A. The order Haloanaerobiales // Prokaryotes. 2006. № 4. P. 809-822.
56. Oren A., Mana L. Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium // Extremophiles. 2002. № 6(3). P. 217-223.
57. Vaisman N., Oren A. *Salisaeta longa* gen. nov., sp. nov., a red, halophilic member of the Bacteroidetes // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. № 59(10). P. 2571-2574.
58. Christian J. H. B., Waltho J. A. Solute concentrations within cells of halophilic and non // Biochim. Biophys. Acta. 1962. № 65. P. 506-508.
59. Ginzburg M., Sachs L., Ginzburg B. Z. Ion Metabolism in a *Halobacterium*: I. Influence of age of culture on intracellular concentrations // The Journal of general physiology. 1970. № 55 (2). P. 187-207.
60. Lanyi J. K., Silverman M. P. The state of binding of intracellular K⁺ in *Halobacterium cutirubrum* // Canadian journal of microbiology. 1972. № 18(7). P. 993-995.

61. Engel M. B., Catchpole H. R. A microprobe analysis of inorganic elements in *Halobacterium salinarum* // *Cell biology international*. 2005. № 29(8). P. 616-622.
62. Brown A. D., Simpson J. R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols // *Microbiology*. 1972. № 72(3). P. 589-591.
63. Brown A. D. *Microbial water stress physiology. Principles and perspectives*. John Wiley & Sons, 1990.
64. Stan-Lotter H., Fendrihan S. Survival strategies of halophilic oligotrophic and desiccation resistant prokaryotes // In: Seckbach J., Oren A. and Stan-Lotter H. (eds). *Polyextremophiles*. Springer, Dordrecht. 2013. P. 233-248.
65. Chaudhuri P., Rashid N., Thapliyal C. Osmolyte system and its biological significance // In: Singh L. R. and Dar T. A. (eds). *Cellular Osmolytes*. Springer, Singapore. 2017. P. 1-34.
66. Somero G. N., Yancey P. H. Osmolytes and cell-volume regulation: Physiological and evolutionary principles // In: Terjung R. (eds). *Comprehensive physiology*. 2010. P. 441-484.
67. Yancey P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // *Journal of experimental biology*. 2005. № 208(15). P. 2819-2830.
68. Kunte H. J. Osmoregulation in bacteria: compatible solute accumulation and osmosensing // *Environmental Chemistry*. 2006. № 3(2). P. 94-99.
69. Wolf A., Krämer R., Morbach S. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress // *Molecular microbiology*. 2003. № 49(4). P. 1119-1134.
70. Galinski E. A., Herzog R. M. The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*) // *Archives of Microbiology*. 1990. № 153(6). P. 607-613.
71. Platt T., Rao D. V. S., Irwin B. Photosynthesis of picoplankton in the oligotrophic ocean // *Nature*. 1983. № 301(5902). P. 702-704.
72. D'Ortenzio F., Marullo S., Ragni M., d'Alcalà M. R., Santoleri R. Validation of empirical SeaWiFS algorithms for chlorophyll-a retrieval in the

Mediterranean Sea: A case study for oligotrophic seas // *Remote Sensing of Environment*. 2002. № 82(1). P. 79-94.

73. Donis D., McGinnis D. F., Holtappels M., Felden J., Wenzhoefer F. Assessing benthic oxygen fluxes in oligotrophic deep sea sediments (HAUSGARTEN observatory) // *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 2016. № 111. P. 1-10.

74. Slomp C. P., Mort H. P., Jilbert T., Reed D. C., Gustafsson B. G., Wolthers M. Coupled dynamics of iron and phosphorus in sediments of an oligotrophic coastal basin and the impact of anaerobic oxidation of methane // *PloS one*. 2013. № 8(4). P. 1-13.

75. de Castro V. H. L., Schroeder L. F., Quirino B. F., Kruger R. H., Barreto C. C. Acidobacteria from oligotrophic soil from the Cerrado can grow in a wide range of carbon source concentrations // *Canadian Journal of Microbiology*. 2013. № 59(11). P. 746-753.

76. Godinho V. M., Gonçalves V. N., Santiago I. F., Figueredo H. M., Vitoreli G. A., Schaefer C. E., Barbosa E. C., Oliveira J. G., Alves T. M. A., Zani C. L., Junior P. A. S., Murta S. M. F., Romanha A. J., Geessien Kroon E., Cantrell C. L., Wedge D. E., Duke S. O., Ali A., Rosa C.A., Rosa L.H. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica // *Extremophiles*. 2015. № 19(3). P. 585-596.

77. Colangelo-Lillis J., Wing B. A., Raymond-Bouchard I., Whyte L. G. Viral induced microbial mortality in Arctic hypersaline spring sediments // *Frontiers in microbiology*. 2017. № 7. P. 1-15.

78. Ewert M., Deming J. W. Sea ice microorganisms: Environmental constraints and extracellular responses // *Biology*. 2013. № 2(2). P. 603-628.

79. Egli T. How to live at very low substrate concentration // *Water research*. 2010. № 44(17). P. 4826-4837.

80. Stan-Lotter H., Fendrihan S. Halophilic archaea: life with desiccation, radiation and oligotrophy over geological times // *Life*. 2015. № 5(3). P. 1487-1496.

81. Bolhuis H., Palm P., Wende A., Falb M., Rampp M., Rodriguez-Valera F., Pfeiffer F., Oesterhelt D. The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity // BMC genomics. 2006. № 7(1). P. 1-12.
82. Bolhuis H. Walsby's square archaeon; it's hip to be square but even more hip to be culturable // In: Gunde-Cimerman N., Oren A. and Plemenitaš A. (eds). Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Springer, Dordrecht. 2005. P. 185-199.
83. Pohlschroder M., Schulze S. *Haloferax volcanii* // Trends in microbiology. 2019. № 27(1). P. 86-87.
84. Alpert P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life // Integrative and Comparative Biology. 2005. № 45(5). P. 685-695.
85. Billi D., Potts M. Life and death of dried prokaryotes // Research in microbiology. 2002. № 153(1). P. 7-12.
86. Potts M., Slaughter S. M., Hunneke F. U., Garst J. F., Helm R. F. Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells // Integrative and Comparative Biology. 2005. № 45(5). P. 800-809.
87. Ophir T., Gutnick D. L. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation // Applied and Environmental Microbiology. 1994. № 60(2). P. 740-745.
88. Gorbushina A. A. Life on the rocks // Environmental microbiology. 2007. № 9(7). P. 1613-1631.
89. Anderson K. L., Apolinario E. E., Sowers K. R. Desiccation as a long-term survival mechanism for the archaeon *Methanosarcina barkeri* // Applied and environmental microbiology. 2012. № 78(5). P. 1473-1479.
90. Billi D. Anhydrobiotic rock-inhabiting cyanobacteria: potential for astrobiology and biotechnology // In: Stan-Lotter H. and Fendrihan S. (eds). Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes. Springer, Vienna. 2012. P. 119-132.
91. García A. H. Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications // Journal of biosciences. 2011. № 36(5). P. 939-950.

92. Sakamoto T., Yoshida T., Arima H., Hatanaka Y., Takani Y., Tamaru Y. Accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* // *Phycological Research*. 2009. № 57(1). P. 66-73.
93. Norton C. F., Grant W. D. Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt crystals // *Microbiology*. 1988. № 134(5). P. 1365-1373.
94. Schubert B. A., Lowenstein T. K., Timofeeff M. N. Microscopic identification of prokaryotes in modern and ancient halite, Saline Valley and Death Valley, California // *Astrobiology*. 2009. № 9(5). P. 467-482.
95. Schubert B. A., Lowenstein T. K., Timofeeff M. N., Parker M. A. Halophilic archaea cultured from ancient halite, Death Valley, California // *Environmental microbiology*. 2010. № 12(2). P. 440-454.
96. Cline S. W., Doolittle W. F. Transformation of members of the genus *Haloarcula* with shuttle vectors based on *Halobacterium halobium* and *Haloferax volcanii* plasmid replicons // *Journal of bacteriology*. 1992. № 174(3). P. 1076-1080.
97. Fendrihan S., Dornmayr-Pfaffenhuemer M., Gerbl F. W., Holzinger A., Grösbacher M., Briza P., Erler A., Gruber C., Platzer K., Stan-Lotter, H. Spherical particles of halophilic archaea correlate with exposure to low water activity—implications for microbial survival in fluid inclusions of ancient halite // *Geobiology*. 2012. № 10(5). P. 424-433.
98. Jaakkola S. T., Ravantti J. J., Oksanen H. M., Bamford D. H. Buried alive: microbes from ancient halite // *Trends in microbiology*. 2016. № 24(2). P. 148-160.
99. Webb K. M., DiRuggiero J. Radiation resistance in extremophiles: fending off multiple attacks // In: Seckbach J., Oren A. and Stan-Lotter H. (eds). *Polyextremophiles*. Springer, Dordrecht. 2013. P. 249-267.
100. Arts M. T., Robarts R. D., Kasai F., Waiser M. J., Tumber V. P., Plante A. J., Rai H., de Lange H. J. The attenuation of ultraviolet radiation in high dissolved organic carbon waters of wetlands and lakes on the northern Great Plains // *Limnology and Oceanography*. 2000. № 45(2). P. 292-299.
101. Jolivet E., Corre E., L'Haridon S., Forterre P., Prieur D. *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic

archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation // *Extremophiles*. 2004. № 8(3). P. 219-227.

102. Jolivet E. l'Haridon S., Corre E., Forterre P., Prieur D. *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003. № 53(3). P. 847-851.

103. Charmasson S., Sarradin P. M., Le Faouder A., Agarande M., Loyen J., Desbruyeres D. High levels of natural radioactivity in biota from deep-sea hydrothermal vents: a preliminary communication // *Journal of environmental radioactivity*. 2009. № 100(6). P. 522-526.

104. Rastogi R. P., Kumar A., Tyagi M. B., Sinha R. P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair // *Journal of nucleic acids*. 2010. № 2010. P. 1-32.

105. Chatterjee N., Walker G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis // *Environmental and molecular mutagenesis*. 2017. № 58(5). P. 235-263.

106. Voss P., Hajimiragha H., Engels M., Ruhwiedel C., Calles C., Schroeder P., Grune T. Irradiation of GAPDH: a model for environmentally induced protein damage // *Biological chemistry*. 2007. № 388(6). P. 583-592.

107. Feeney L., Berman E. R. Oxygen toxicity: membrane damage by free radicals // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1976. № 15(10). P. 789-792.

108. Farmer E. E., Mueller M. J. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling // *Annual review of plant biology*. 2013. № 64. P. 429-450.

109. McCready S., Marcello L. Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum* // *Biochemical Society Transactions*. 2003. № 31(3). P. 694-698.

110. Baxter B. K., Eddington B., Riddle M. R., Webster T. N., Avery B. J. Great Salt Lake halophilic microorganisms as models for astrobiology: evidence for desiccation tolerance and ultraviolet irradiation resistance // *Instruments, methods, and missions for astrobiology X*. International Society for Optics and Photonics. 2007. № 6694. P. 1-10.

111. Capece M. C., Clark E., Saleh J. K., Halford D., Heinl N., Hoskins S., Rothschild L. J. Polyextremophiles and the constraints for terrestrial habitability // In: Seckbach J., Oren A. and Stan-Lotter H. (eds). Polyextremophiles. Springer, Dordrecht. 2013. P. 3-59.
112. Feller G., Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation // Nature reviews microbiology. 2003. № 1(3). P. 200-208.
113. Cavicchioli R. Cold-adapted archaea // Nature Reviews Microbiology. 2006. № 4(5). P. 331-343.
114. Auman A. J., Breezee J. L., Gosink J. J., Kämpfer P., Staley J. T. *Psychromonas ingrahamii* sp. nov., a novel gas vacuolate, psychrophilic bacterium isolated from Arctic polar sea ice // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006. № 56(5). P. 1001-1007.
115. von Klein D., Arab H., Völker H., Thomm M. *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea // Extremophiles. 2002. № 6(2). P. 103-110.
116. Weinstein R. N., Palm M. E., Johnstone K., Wynn-Williams D. D. Ecological and physiological characterization of *Humicola marvinii*, a new psychrophilic fungus from fellfield soils in the maritime Antarctic // Mycologia. 1997. № 89(5). P. 706-711.
117. Bakermans C. Limits for microbial life at subzero temperatures // In: Margesin R., Schinner F., Marx J. C. and Gerday C. (eds). Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg. 2008. P. 17-28.
118. Doyle S., Dieser M., Broemsen E., Christner B. General characteristics of cold-adapted microorganisms // In: Miller R. V. and Whyte L. G. (eds). Polar microbiology: life in a deep freeze. 2011. P. 101-125.
119. Bakermans C. Determining the limits of microbial life at subzero temperatures // In: Margesin R. (eds). Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology. – Springer, Cham. 2017. P. 21-38.
120. Lyons W. B., Mikucki J. A., German L. A., Welch K. A., Welch S. A., Gardner C. B., Tulaczyk S. M., Pettit E. C., Kowalski J., Dachwald B., the EnEx Team.

The geochemistry of englacial brine from Taylor Glacier, Antarctica // Journal of Geophysical Research: Biogeosciences. 2019. № 124(3). P. 633-648.

121. Mikucki J. A., Priscu J. C. Bacterial diversity associated with Blood Falls, a subglacial outflow from the Taylor Glacier, Antarctica // Applied and Environmental Microbiology. 2007. № 73(12). P. 4029-4039.

122. German L., Mikucki J. A., Welch S. A., Kathleen A. W., Lutton A., Dachwald B., Kowalski J., Heinen D., Feldmann M., Francke G., Espe C., Lyons B. Validation of sampling antarctic subglacial hypersaline waters with an electrothermal ice melting probe (IceMole) for environmental analytical geochemistry // International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2019. P. 1-14.

123. Rutishauser A., Blankenship D. D., Sharp M., Skidmore M. L., Greenbaum J. S., Grima C., Schroeder D. M., Dowdeswell J.A., Young, D. A. Discovery of a hypersaline subglacial lake complex beneath Devon Ice Cap, Canadian Arctic // Science advances. 2018. № 4(4). P. 1-6.

124. Mykytczuk N. C. S., Foote S. J., Omelon C. R., Southam G., Greer C. W., Whyte L. G. Bacterial growth at -15°C ; molecular insights from the permafrost bacterium *Planococcus halocryophilus* Or1 // The ISME journal. 2013. № 7(6). P. 1211-1226.

125. Mykytczuk N. C. S., Wilhelm R. C., Whyte L. G. *Planococcus halocryophilus* sp. nov., an extreme sub-zero species from high Arctic permafrost // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2012. № 62(8). P. 1937-1944.

126. Marx J. G., Carpenter S. D., Deming J. W. Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions // Canadian journal of microbiology. 2009. № 55(1). P. 63-72.

127. Casanueva A., Tuffin M., Cary C., Cowan D. A. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies // Trends in microbiology. 2010. № 18(8). P. 374-381.

128. Reed C. J., Lewis H., Trejo E., Winston V., Evilia C. Protein adaptations in archaeal extremophiles // *Archaea*. 2013. № 2013. P. 1-14.
129. Grosjean H., Oshima T. How nucleic acids cope with high temperature // In: Gerday C. and Glansdorff N. (eds). *Physiology and biochemistry of extremophiles*. American Society of Microbiology. 2007. P. 39-56.
130. Koga Y. Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes // *Archaea*. 2012. № 2012. P. 1-6.
131. Luo H., Robb F. T. Thermophilic protein folding systems // In: Koki Horikoshi (eds). *Extremophiles handbook*. 2011. P. 583-599.
132. Trivedi S., Rao S. R., Gehlot H. S. Nucleic acid stability in thermophilic prokaryotes: a review // *Journal of Cell and Molecular Biology*. 2005. № 4. P. 61-69.
133. Oger P. M., Cario A. Adaptation of the membrane in Archaea // *Biophysical chemistry*. 2013. № 183. P. 42-56.
134. Ulrich N. P., Gmajner D., Raspor P. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea // *Applied microbiology and biotechnology*. 2009. № 84(2). P. 249-260.
135. Mesbah N. M., Wiegel J. Halophilic thermophiles: a novel group of extremophiles // *Microbial diversity: current perspectives and potential applications*. IK Publishing House, New Delhi. 2005. P. 91-118.
136. Banciu H. L., Muntyan M. S. Adaptive strategies in the double-extremophilic prokaryotes inhabiting soda lakes // *Current opinion in microbiology*. 2015. № 25. P. 73-79.
137. Albers S. V., Vossenberg J. L., Driessen A. J., Konings W. N. Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions // *Extremophiles*. 2001. № 5(5). P. 285-294.
138. Horikoshi K. Alkaliphiles // *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2004. № 80(4). P. 166-178.
139. Oren A. The family *Halobacteriaceae* // In: Rosenberg E., DeLong E. F., Lory S., Stackebrandt E. and Thompson F. (eds). *The prokaryotes*. 2014. P. 41-121.

140. Gupta R. S., Naushad S., Baker S. Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2015. № 65(3). P. 1050-1069.
141. Krulwich T. A., Sachs G., Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis // Nature Reviews Microbiology. 2011. № 9(5). P. 330-343.
142. Reyes-Prieto A., Barquera B., Juarez O. Origin and Evolution of the Sodium -Pumping NADH: Ubiquinone Oxidoreductase // PLoS ONE. 2014. № 9(5). P. 1-14.
143. Grischuk Y. V., Muntyan M. S., Popova I. V., Sorokin D. Y. Ion transport coupled to terminal oxidase functioning in the extremely alkaliphilic halotolerant bacterium *Thioalkalivibrio* // Biochemistry. 2003. № 68(4). P. 385-390.
144. Muntyan M. S., Cherepanov D. A., Malinen A. M., Bloch D. A., Sorokin D. Y., Severina I. I., Ivashina T. V., Lahti R., Muyzer G., Skulachev V. P. Cytochrome *cbb₃* of *Thioalkalivibrio* is a Na⁺-pumping cytochrome oxidase // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. № 112(25). P. 7695-7700.
145. Muyzer G., Sorokin D. Y., Mavromatis K., Lapidus A., Clum A., Ivanova N., Pati A., D'haeseleer P., Woyke T., Kyrpides N. C. Complete genome sequence of “*Thioalkalivibrio sulfidophilus*” HL-EbGr7 // Standards in genomic sciences. 2011. № 4(1). P. 23-35.
146. Muyzer G., Sorokin D. Y., Mavromatis K., Lapidus A., Foster B., Sun H., Ivanova N., Pati A., D'haeseleer P., Woyke T., Kyrpides N. C. Complete genome sequence of *Thioalkalivibrio* sp. K90mix // Standards in genomic sciences. 2011. № 5(3). P. 341-355.
147. Mesbah N. M., Wiegel J. Life under multiple extreme conditions: diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles // Applied and environmental microbiology. 2012. № 78(12). P. 4074-4082.

148. Trotsenko Y. A., Doronina N. V., Li T. D., Reshetnikov A. S. Moderately haloalkaliphilic aerobic methylobacteria // *Microbiology*. 2007. № 76(3). P. 253-265.
149. Banciu H., Sorokin D. Y., Rijpstra W. I. C., Sinninghe Damste J. S., Galinski E. A., Takaichi S., Muyzer G., Kuenen J. G. Fatty acid, compatible solute and pigment composition of obligately chemolithoautotrophic alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes // *FEMS microbiology letters*. 2005. № 243(1). P. 181-187.
150. Banciu H. L., Sorokin D. Y., Tourova T. P., Galinski E. A., Muntyan M. S., Kuenen J. G., Muyzer G. Influence of salts and pH on growth and activity of a novel facultatively alkaliphilic, extremely salt-tolerant, obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing Gammaproteobacterium *Thioalkalibacter halophilus* gen. nov., sp. nov. from South-Western Siberian soda lakes // *Extremophiles*. 2008. № 12(3). P. 391-404.
151. Galinski E. A., Trüper H. G. Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris* // *FEMS Microbiology Letters*. 1982. № 13(4). P. 357-360.
152. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Henstra A. M., Stams A. J., Galinski E. A., Muyzer G. Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatronospira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatronospira delicata* sp. nov. – a novel lineage of *Deltaproteobacteria* from hypersaline soda lakes // *Microbiology*. 2008. № 154(5). P. 1444-1453.
153. Yayanos A. Piezophiles // *eLS*. 2008. P. 1-10.
154. Fang J., Zhang L., Bazylnski D. A. Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry // *Trends in microbiology*. 2010. № 18(9). P. 413-422.
155. Zerkle A. L., Claire M. W., Domagal-Goldman S. D., Farquhar J., Poulton S. W. A bistable organic-rich atmosphere on the Neoproterozoic Earth // *Nature Geoscience*. 2012. № 5(5). P. 359-363.
156. Anbar A. D., Duan Y., Lyons T. W., Arnold G. L., Kendall B., Creaser R. A., Kaufman A. J., Gordon G. W., Scott C., Garvin J., Buick R. A whiff of oxygen before the great oxidation event? // *Science*. 2007. № 317(5846). P. 1903-1906.

157. Liu Y., Beer L. L., Whitman W. B. Methanogens: a window into ancient sulfur metabolism // Trends in microbiology. 2012. № 20(5). P. 251-258.
158. Liamleam W., Annachhatre A. P. Electron donors for biological sulfate reduction // Biotechnology advances. 2007. № 25(5). P. 452-463.
159. Morozkina E. V., Kurakov A. V. Dissimilatory nitrate reduction in fungi under conditions of hypoxia and anoxia: a review // Applied Biochemistry and Microbiology. 2007. № 43(5). P. 544-549.
160. Zhu I., Getting T. A review of nitrate reduction using inorganic materials // Environmental Technology Reviews. 2012. № 1(1). P. 46-58.
161. De la Haba R. R., Sánchez-Porro C., Márquez M. C., Ventosa A. Taxonomy of halophiles // In: Koki Horikoshi (eds). Extremophiles handbook. 2011. P. 255-308.
162. Boone D. R. *Methanohalophilus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-4.
163. Genus *Methanohalophilus* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/methanohalophilus> (дата обращения: 01.12.2020).
164. Sorokin D. Y., Merkel A. Y. *Methanosalsum* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-8.
165. Genus *Methanosalsum* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/methanosalsum> (дата обращения: 01.12.2020).
166. Zhilina T. N., Merkel A. Y. *Methanohalobium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.
167. Genus *Methanohalobium* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/methanohalobium> (дата обращения: 01.12.2020).
168. Boone D. R., Whitman W. B., Koga Y. *Methanospirillaceae* fam. Nov. // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-1.

169. Zhou L., Dong X. *Methanospirillum* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
170. Genus *Methanospirillum* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/methanospirillum> (дата обращения: 01.12.2020).
171. Oren A., Ventosa A., Kamekura M. *Halobacteria* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
172. Oren A., Ventosa A., Kamekura M. *Halobacteriaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
173. Oren A., Ventosa A. *Haloarculaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
174. Oren A., Ventosa A. *Halococcaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-4.
175. Oren A., Ventosa A. *Haloferacaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
176. Oren A., Ventosa A. *Halorubraceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-4.
177. Oren A., Ventosa A. *Natrialbaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
178. Hirsch P. *Dichotomicrobium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-10.
179. Imhoff J. F., Hiraishi A. *Rhodobium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.
180. Díaz-Cárdenas C., Rubiano-Labrador C., Baena S. *Tistlia* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-9.
181. Lai Q., Yuan J., Gu L., Shao Z. *Marispirillum indicum* gen. nov., sp. nov., isolated from a deep-sea environment //International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. № 59(6). P. 1278-1281.
182. Imhoff J. F. *Rhodovibrio* // Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. 2015. P. 1-5.

183. Imhoff J. F., Gorlenko V. M. *Roseospira* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.
184. Abraham W. R. *Hyphomonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-14.
185. Abraham W. R., Rohde M. *Henriciella* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-10.
186. Abraham W. R. *Woodsholea* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.
187. Imhoff J. F. *Rhodovulum* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-8.
188. Labrenz M., Hirsch P. *Antarctobacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
189. Choi D. H., Cho B. C. *Citreimonas salinaria* gen. nov., sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade isolated from a solar saltern // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006. № 56(12). P. 2799-2803.
190. Choi D. H., Cho J. C., Lanoil B. D., Giovannoni S. J., Cho B. C. *Maribius salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a solar saltern and *Maribius pelagius* sp. nov., cultured from the Sargasso Sea, belonging to the *Roseobacter* clade // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. № 57(2). P. 270-275.
191. Yoon J. H., Kang S. J., Lee S. Y., Jung Y. T., Lee J. S., Oh T. K. *Marivita hallyeonensis* sp. nov., isolated from seawater, reclassification of *Gaetbulicola byunsanensis* as *Marivita byunsanensis* comb. nov. and emended description of the genus *Marivita* Hwang et al. 2009 // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2012. № 62(4). P. 839-843.
192. Doronina N. V., Trotsenko Y. A. *Methylarcula* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-4.
193. Sorokin D. Y., Rainey F. A., Webb R. I., Fuerst J. A. *Sulfitobacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-8.
194. Cho J. C., Giovannoni S. J. *Oceanicola granulosis* gen. nov., sp. nov. and *Oceanicola batsensis* sp. nov., poly- β -hydroxybutyrate-producing marine bacteria in the

order 'Rhodobacterales' // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. № 54(4). P. 1129-1136.

195. Albuquerque L., França L., Taborda M., La Cono V., Yakimov M., Da Costa M. S. *Palleronia abyssalis* sp. nov., isolated from the deep Mediterranean Sea and the emended description of the genus *Palleronia* and of the species *Palleronia marisminoris* // Antonie van Leeuwenhoek. 2015. № 107(2). P. 633-642.

196. van Spanning R. J. M., Stouthamer A. H., Baker S. C., van Verseveld H. W. *Paracoccus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-14.

197. Hwang C. Y., Cho B. C. *Ponticoccus litoralis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium in the family *Rhodobacteraceae* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № 58(6). P. 1332-1338.

198. Imhoff J. F. Incertae Sedis XXVI. *Rhodothalassium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-7.

199. *Roseibium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-2.

200. Labrenz M., Lawson P. A., Tindall B. J., Collins M. D., Hirsch P. *Roseisalinus antarcticus* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic bacteriochlorophyll a-producing α -proteobacterium isolated from hypersaline Ekho Lake, Antarctica // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2005. № 55(1). P. 41-47.

201. Labrenz M., Hirsch P. *Roseovarius* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.

202. Yoon J. H., Kang S. J., Lee S. Y., Oh T. K. *Salinihabitans flavidus* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine solar saltern // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. № 59(10). P. 2561-2564.

203. Martínez-Cánovas M. J., Quesada E., Martínez-Checa F., del Moral A., Bejar V. *Salipiger mucescens* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium isolated from hypersaline soil, belonging to the

α-Proteobacteria // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2004. № 54(5). P. 1735-1740.

204. Wang Y. X., Wang Z. G., Liu J. H., Chen Y. G., Zhang X. X., Wen M. L., Xu L. H., Peng Q., Cui, X. L. *Sediminimonas qiaohouensis* gen. nov., sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade in the order *Rhodobacterales* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. № 59(7). P. 1561-1567.

205. Choi D. H., Cho B. C. *Shimia marina* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium of the *Roseobacter* clade isolated from biofilm in a coastal fish farm // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006. № 56(8). P. 1869-1873.

206. Sorokin D. Y., Rainey F. A., Webb R. I., Fuerst J. A. *Sulfitobacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-8.

207. Wagner-Döbler I., Rheims H., Felske A., Pukall R., Tindall B. J. *Jannaschia helgolandensis* gen. nov., sp. nov., a novel abundant member of the marine *Roseobacter* clade from the North Sea // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2003. № 53(3). P. 731-738.

208. Harwati T. U., Kasai Y., Kodama Y., Susilaningsih D., Watanabe K. *Tropicibacter naphthalenivorans* gen. nov., sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. № 59(2). P. 392-396.

209. Dai X., Wang B. J., Yang Q. X., Jiao N. Z., Liu S. J. *Yangia pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel member of the *Roseobacter* clade from coastal sediment of the East China Sea // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006. № 56(3). P. 529-533.

210. Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T. *Oceanospirillales ord. nov* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-1.

211. Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T. *Halomonadaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-1.

212. Vreeland R. H. *Halomonas* // Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. 2015. P. 1-20.

213. Li S., Narsing Rao M. P., Li W. J. *Aidingimonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.
214. Garriga M., Ehrmann M. A., Arnau J., Hugas M., Vogel R. F. *Carnimonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
215. Ventosa A., de la Haba R. R. *Chromohalobacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-16.
216. Romanenko L. A., Tanaka N., Svetashev V. I., Falsen E. Description of *Cobetia amphilecti* sp. nov., *Cobetia litoralis* sp. nov. and *Cobetia pacifica* sp. nov., classification of *Halomonas halodurans* as a later heterotypic synonym of *Cobetia marina* and emended descriptions of the genus *Cobetia* and *Cobetia marina* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2013. № 63(1). P. 288-297.
217. Ntougias S., Zervakis G. I. *Halotalea* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-7.
218. Fendrich C. *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid Eubacterium from Great Salt Lake, Utah, USA // Systematic and applied microbiology. 1988. № 11(1). P. 36-43.
219. Sanchez-Porro C., Rafael R., Soto-Ramirez N., Márquez M. C., Montalvo-Rodríguez R., Ventosa A. Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Halomonadaceae*, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas indalinina* as *Kushneria indalinina* comb. nov. and of *Halomonas avicenniae* as *Kushneria avicenniae* comb. nov. // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. № 59(2). P. 397-405.
220. Ventosa A., *Larsenimonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2020. P. 1-5.
221. Ben Ali Gam Z., Casalot L., Labat M. *Modicisalibacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2019. P. 1-4.
222. Xu Z. X., Du Z. J. *Pistricoccus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2019. P. 1-6.

223. Plotnikova E. G., Anan'ina L. N., Ariskina E. V., Evtushenko L. I. *Salinicola* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2020. P. 1-29.
224. Zepeda V. K., Busse H. J., Golke J., Saw J. H., Alam M., Donachie S. *P. Terasakiispira papahanaumokuakeensis* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium from Pearl and Hermes Atoll, Northwestern Hawaiian Islands // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2015. № 65(10). P. 3609-3617.
225. Genus *Halomonas* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/halomonas> (дата обращения: 01.12.2020).
226. Bowman J. P., McMeekin T. A. *Marinobacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.
227. Genus *Marinobacter* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/marinobacter> (дата обращения: 01.12.2020).
228. *Idiomarina* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-2.
229. Jang G. I., Hwang C. Y., Choi H. G., Kang S. H., Cho B. C. Description of *Spongiibacter borealis* sp. nov., isolated from Arctic seawater, and reclassification of *Melitea salexigens* Urios et al. 2008 as a later heterotypic synonym of *Spongiibacter marinus* Graeber et al. 2008 with emended descriptions of the genus *Spongiibacter* and *Spongiibacter marinus* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2011. № 61(12). P. 2895-2900.
230. Yi H., Bae K. S., Chun J. *Aestuariibacter salexigens* gen. nov., sp. nov. and *Aestuariibacter halophilus* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of *Alteromonas macleodii* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2004. № 54(2). P. 571-576.
231. Bowman J. P., McMeekin T. A. *Alteromonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-7.

232. Van Trappen S., Tan T. L., Yang J., Mergaert J., Swings J. *Glacielcola polaris* sp. nov., a novel budding and prosthecate bacterium from the Arctic Ocean, and emended description of the genus *Glacielcola* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2004. № 54(5). P. 1765-1771.
233. Urios L., Intertaglia L., Lesongeur F., Lebaron P. *Haliaea salexigens* gen. nov., sp. nov., a member of the *Gammaproteobacteria* from the Mediterranean Sea // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № 58(5). P. 1233-1237.
234. González J. M. *Marinobacterium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-3.
235. González J. M. *Microbulbifer* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-2.
236. Jean W. D., Shieh W. Y., Chiu H. H. *Pseudidiomarina taiwanensis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from shallow coastal water of An-Ping Harbour, Taiwan, and emended description of the family *Idiomarinaceae* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006. № 56(4). P. 899-905.
237. Bowman J. P., McMeekin T. A. *Pseudoalteromonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-22.
238. *Terrimonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-3.
239. Imhoff J. F. *Chromatiales ord. nov* // Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. 2015. P. 1-7.
240. Imhoff J. F. *Ectothiorhodospiraceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
241. Yakimov M. M., Giuliano L., Chernikova T. N., Gentile G., Abraham W. R., Lünsdorf H., Timmis K. N., Golyshin P. N. *Alcalilimnicola halodurans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, moderately halophilic and extremely halotolerant bacterium, isolated from sediments of soda-depositing Lake Natron, East Africa Rift Valley //

International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2001. № 51(6). P. 2133-2143.

242. Gorlenko V. M., Bryantseva I. A., Panteleeva E. E., Tourova T. P., Kolganova T. V., Makhneva Z. K., Moskalenko A. A. *Ectothiorhodosinus mongolicum* gen. nov., sp. nov., a new purple bacterium from a soda lake in Mongolia // Microbiology. 2004. № 73(1). P. 66-73.

243. Imhoff J. F. *Ectothiorhodospira* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-12.

244. *Thioalkalivibrio* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-2.

245. Sorokin D. Y., Merkel A. Y., Muyzer G. *Thiohalospira* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-7.

246. Zhang Y. J., Jia M., Ma Y. C., Lu K. Y., Tian F., Klenk H. P., Zhou Y., Tang, S. K. *Aquisalimonas halophila* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a hypersaline mine // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2014. № 64(7). P. 2210-2216.

247. Tanner R. S., Imhoff J. F. *Arhodomonas* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-4.

248. Imhoff J. F. *Halorhodospira* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-9.

249. Imhoff J. F. *Marichromatium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.

250. Kelly D. P., Wood A. P. *Halothiobacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-3.

251. Imhoff J. F. *Marichromatium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.

252. Imhoff J. F., Caumette P. *Thiohalocapsa* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.

253. Sorokin D. Y., Merkel A. Y., Muyzer G. *Thioalkalibacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2020. P. 1-6.

254. Galushko A., Kuever J. *Desulfosoma* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2019. P. 1-4.
255. Galushko A., Kuever J. *Desulfohalobium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2019. P. 1-4.
256. Galushko A., Kuever J. *Desulfonatronospira* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2019. P. 1-4.
257. Galushko A., Kuever J. *Desulfovermiculus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2019. P. 1-4.
258. Galushko A., Kuever J. *Desulfovibrio* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2019. P. 1-4.
259. Sorokin D. Y., Merkel A. Y. *Desulfurivibrio* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2020. P. 1-5.
260. Vandamme P., Dewhirst F. E., Paster B. J., On S. L. *Arcobacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-8.
261. Inagaki F., Takai K., Kobayashi H., Nealson K. H., Horikoshi K. *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing ϵ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003. № 53(6). P. 1801-1805.
262. Inagaki F., Takai K., Kobayashi H., Horikoshi K. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. № 54(5). P. 1477-1482.
263. Ludwig W., Schleifer K. H., Whitman W. B. *Bacilli class. nov* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-1.
264. Logan N. A., Vos P. D. *Bacillaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-1.
265. Logan N. A., Vos P. D. *Bacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-164.

266. Vos P. D. *Alkalibacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
267. Márquez M. C., Carrasco I. J., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D., Ventosa A. *Aquisalibacillus elongatus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium of the family Bacillaceae isolated from a saline lake // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № 58(8). P. 1922-1926.
268. Schlesner H. *Filobacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-4.
269. *Gracilibacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-8.
270. Echigo A., Fukushima T., Mizuki T., Kamekura M., Usami R. *Halalkalibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a non-saline soil sample in Japan // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. № 57(5). P. 1081-1085.
271. Ishikawa M., Yamasato K. *Halolactibacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-10.
272. Spring S. *Halobacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-10.
273. Heyrman J., Vos P. D. *Lentibacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-6.
274. Heyrman J., Vos P. D. *Oceanobacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-9.
275. Bagheri M., Amoozegar M. A., Schumann P., Didari M., Mehrshad M., Spröer C., Sanchez-Porro C., Ventosa A. *Ornithinibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic, Gram-stain-positive, endospore-forming bacterium from a hypersaline lake // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2013. № 63(3). P. 844-848.
276. Yamasato K., Ishikawa M. *Paraliobacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-9.

277. Vos P. D. *Pontibacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-4.
278. Yoon J. H., Kang S. J., Oh T. K. Reclassification of *Marinococcus albus* Hao et al. 1985 as *Salimicrobium album* gen. nov., comb. nov. and *Bacillus halophilus* Ventosa et al. 1990 as *Salimicrobium halophilum* comb. nov., and description of *Salimicrobium luteum* sp. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. № 57(10). P. 2406-2411.
279. Ren P. G., Zhou P. J. *Salinibacillus aidingensis* gen. nov., sp. nov. and *Salinibacillus kushneri* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from a neutral saline lake in Xin-Jiang, China // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2005. № 55(2). P. 949-953.
280. Albuquerque L., da Costa M. S. *Salirhabdus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2019. P. 1-9.
281. Carrasco I. J., Marquez M. C., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D., Ventosa A. *Salsuginibacillus kocurii* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from soda-lake sediment // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. № 57(10). P. 2381-2386.
282. Carrasco I. J., Marquez M. C., Xue Y., Ma Y., Cowan D. A., Jones B. E., Grant W. D., Ventosa A. *Sediminibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, Gram-positive bacterium from a hypersaline lake // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № 58(8). P. 1961-1967.
283. Vos P. D. *Tenuibacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-2.
284. Ventosa A., Mellado E., Vos P. D. *Thalassobacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-2.
285. Heyrman J., Vos P. D., Logan N. *Virgibacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-15.
286. Clerck E. D., Vos P. D. *Jeotgalibacillus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-3.

287. Yoon J. H., Weiss N., Lee K. C., Lee I. S., Kang K. H., Park Y. H. *Jeotgalibacillus alimentarius* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from jeotgal with L-lysine in the cell wall, and reclassification of *Bacillus marinus* Ruger 1983. as *Marinibacillus marinus* gen nov., comb. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2001. № 51(6). P. 2087-2093.

288. Genus *Jeotgalibacillus* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/jeotgalibacillus> (дата обращения: 01.12.2020).

289. *Jeotigalicoccus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-3.

290. Genus *Jeotigalicoccus* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/jeotigalicoccus> (дата обращения: 01.12.2020).

291. Ventosa A. *Salinicoccus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-7.

292. Genus *Salinicoccus* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/salinicoccus> (дата обращения: 01.12.2020).

293. Oren A. *Halanaerobiaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.

294. Family *Halanaerobiaceae* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/family/halanaerobiaceae> (дата обращения: 01.12.2020).

295. Oren A. *Halobacteroidaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-4.

296. Zhilina T. N., Zavarzin G. A., Detkova E. N., Rainey F. A. *Natroniella acetigena* gen. nov. sp. nov., an extremely haloalkaliphilic, homoacetic bacterium: a new member of *Haloanaerobiales* // Current microbiology. 1996. № 32(6). P. 320-326.

297. Zhilina T. N., Zavarzin G. A. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria //FEMS Microbiology Reviews. 1990. № 7(3-4). P. 315-321.

298. Family *Halobacteroidaceae* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/family/halobacteroidaceae> (дата обращения: 01.12.2020).
299. Trujillo M. E., Goodfellow M. *Actinopolyspora* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-12.
300. Genus *Actinopolyspora* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/actinopolyspora> (дата обращения: 01.12.2020).
301. Lai H., Jiang Y., Chen X., Li Q., Jiang C., Jiang Y., Wei X. *Haloactinomyces albus* gen. nov., sp. nov., isolated from the dead sea // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2017. № 67(5). P. 1163-1168.
302. Lai H., Wei X., Jiang Y., Chen X., Li Q., Jiang Y., Jiang C., Gillerman L. *Halopolysporaalba* gen. nov., sp. nov., isolated from sediment // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2014. № 64(8). P. 2775-2780.
303. Stackebrandt E. *Nesterenkonia* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-12.
304. Genus *Nesterenkonia* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/nesterenkonia> (дата обращения: 01.12.2020).
305. Busse H. J., Glaeser S. P., Kämpfer P. *Georgenia* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2016. P. 1-13.
306. Stackebrandt E., Schumann P. *Isoptericola* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-7.
307. Tang S. K., Zhi X. Y., Li W. J. *Haloactinobacterium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-3.
308. Kim S. B., Goodfellow M. *Prauserella* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-11.
309. Genus *Prauserella* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/prauserella> (дата обращения: 01.12.2020).

310. Tan G. Y. A., Goodfellow M. *Amycolatopsis* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-40.
311. Kim S. B. *Saccharomonospora* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-11.
312. Kim S. B., Goodfellow M. *Saccharopolyspora* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-30.
313. Goodfellow M., Trujillo M. E. *Nocardiaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
314. Guo L., Tuo L., Habden X., Zhang Y., Liu J., Jiang Z., Liu S., Dilbar T., Sun C. *Allosalinactinospora lopnorenensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Nocardiopsaceae* isolated from soil //International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2015. № 65(1). P. 206-213.
315. Fang B. Z., Li W. J. *Marinactinospora* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2020. P. 1-8.
316. Ng Z. Y., Fang B. Z., Li W. J., Tan G. Y. A. *Marinitenerispora sediminis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Nocardiopsaceae* isolated from marine sediment // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2019. № 69(10). P. 3031-3040.
317. Trujillo M. E., Goodfellow M. *Haloactinospora* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.
318. Hozzein W. N., Trujillo M. E. *Nocardiopsis* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-28.
319. Chang X., Liu W., Zhang X. H. *Salinactinospora qingdaonensis* gen. nov., sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a salt pond //International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2012. № 62(4). P. 954-959.
320. Cui X. L. *Streptomonospora* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-10.
321. Bernard K. A., Funke G. *Corynebacterium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-70.

322. Dong L., Salam N., Li W. J. *Haloglycomyces* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.

323. Li X. J., Liu J. M., Wu Y., Zhang W. M., Li J., Liu S. W., Wu G., Hu L., Chen L., Huang D. L., Li R. F., Sun C. H. Description of *Salilacibacter albus* gen. nov., sp. nov., isolated from a dried salt lake, and reclassification of *Paraglycomyces xinjiangensis* Luo et al. 2015 as a later heterotypic synonym of *Salininema proteolyticum* Nikou et al. 2015 with emended descriptions of the genus *Salininema* and *Salininema proteolyticum* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2016. № 66(7). P. 2558-2565.

324. Nikou M. M., Ramezani M., Amoozegar M. A., Rasouli M., Fazeli S. A. S., Schumann P., de la Haba R. R., Ventosa A. *Salininema proteolyticum* gen. nov., sp. nov., a halophilic rare actinomycete isolated from wetland soil, and emended description of the family *Glycomycetaceae* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2015. № 65(10). P. 3727-3733.

325. Munoz R., Rosselló-Móra R., Amann R. Revised phylogeny of *Bacteroidetes* and proposal of sixteen new taxa and two new combinations including *Rhodothermaeota phyl. nov* // Systematic and applied microbiology. 2016. № 39(5). P. 281-296.

326. Hahnke R. L., Meier-Kolthoff J. P., García-López M., Mukherjee S., Huntemann M., Ivanova N. N., Woyke T., Kyrpides N. C., Klenk H. P., Göker M. Genome-based taxonomic classification of *Bacteroidetes* // Frontiers in microbiology. 2016. № 7. P. 1-37.

327. Genus *Rhodothermus* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/rhodothermus> (дата обращения: 01.12.2020).

328. Genus *Natronotalea* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/natronotalea> (дата обращения: 01.12.2020).

329. *Rhodothermus* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-5.

330. Sorokin D. Y., Khijniak T. V., Galinski E. A., Kublanov I. V. *Natronotalea proteinilytica* gen. nov., sp. nov. and *Longimonas haloalkaliphila* sp. nov., extremely haloalkaliphilic members of the phylum *Rhodothermaeota* from hypersaline alkaline lakes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2017. № 67(10). P. 4161-4167.
331. Viver T., Rosselló-Móra R., Antón J. *Salinibacteraceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-4.
332. Family *Salinibacteraceae* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/family/salinibacteraceae> (дата обращения: 01.12.2020).
333. Oren A. *Salisaeta* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2019. P. 1-6.
334. Park M. J., Oh J. H., Yang S. H., Kwon K. K. *Roseithermus sacchariphilus* gen. nov., sp. nov. and proposal of *Salisaetaceae* fam. nov., representing new family in the order *Rhodothermales* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2019. № 69(4). P. 1213-1219.
335. Family *Balneolaceae* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/family/balneolaceae> (дата обращения: 01.12.2020).
336. Urios L., Intertaglia L., Lesongeur F., Lebaron P. *Balneola alkaliphila* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Mediterranean Sea // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № 58(6). P. 1288-1291.
337. Lu D. C., Xia J., Dunlap C. A., Rooney A. P., Du Z. J. *Gracilimonas halophila* sp. nov., isolated from a marine solar saltern // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2017. № 67(9). P. 3251-3255.
338. Wang Y. X., Liu J. H., Xiao W., Zhang X. X., Li Y. Q., Lai Y. H., Ji K. Y., Wen M. L., Cui X. L. *Fodinibius salinus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt mine // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2012. № 62(2). P. 390-396.

339. Xia J., Ling S. K., Wang X. Q., Chen G. J., Du Z. J. *Aliifodinibius halophilus* sp. nov., a moderately halophilic member of the genus *Aliifodinibius*, and proposal of *Balneolaceae* fam. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2016. № 66(6). P. 2225-2233.

340. Xia J., Xie Z. H., Dunlap C. A., Rooney A. P., Du Z. J. *Rhodohalobacter halophilus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic member of the family *Balneolaceae* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2017. № 67(5). P. 1281-1287.

341. Family *Flavobacteriaceae* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/family/flavobacteriaceae> (дата обращения: 01.12.2020).

342. Feng X., Wang Y. R., Zou Q. H., Zhang J. Y., Du Z. J. *Haloflavibacter putidus* gen. nov., sp. nov., isolated from coastal seawater // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2020. № 70(6).

343. Nedashkovskaya O. I., Kim S. B., Han S. K., Lysenko A. M., Rohde M., Rhee M. S., Frolova M. G., Falsen E., Mikhailov V. V., Bae K. S. *Maribacter* gen. nov., a new member of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from marine habitats, containing the species *Maribacter sedimenticola* sp. nov., *Maribacter aquivivus* sp. nov., *Maribacter orientalis* sp. nov. and *Maribacter ulvicola* sp. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2004. № 54(4). P. 1017-1023.

344. Nedashkovskaya O. I., Kim S. B., Kwak J., Mikhailov V. V., Bae K. S. *Mariniflexile gromovii* gen. nov., sp. nov., a gliding bacterium isolated from the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006. № 56(7). P. 1635-1638.

345. Park S. C., Choe H. N., Hwang Y. M., Baik K. S., Kim S. N., Lee Y. S., Jung J. S., Seong C. N. *Marinivirga aestuarii* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from marine environments, and emended descriptions of the genera *Hyunsoonleella*, *Jejuia* and *Pontirhabdus* and the species *Hyunsoonleella jejuensis*, *Jejuia pallidilutea* and *Pontirhabdus pectinivorans* //

International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2013. № 63(4). P. 1524-1531.

346. Zhang D. C., Liu Y. X., Huang H. J., Weber K., Margesin R. *Oceanihabitans sediminis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the Yellow Sea // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2016. № 66(9). P. 3400-3405.

347. Denger K., Warthmann R., Ludwig W., Schink B. *Anaerophaga thermohalophila* gen. nov., sp. nov., a moderately thermohalophilic, strictly anaerobic fermentative bacterium // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2002. № 52(1). P. 173-178.

348. Class *Thermotogae* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/class/thermotogae> (дата обращения: 01.12.2020).

349. Podosokorskaya O. A., Bonch-Osmolovskaya E. A., Godfroy A., Gavrillov S. N., Beskorovaynaya D. A., Sokolova T. G., Kolganova T. V., Toshchakov S. V., Kublanov I. V. *Thermosipho activus* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, hydrolytic bacterium isolated from a deep-sea sample // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2014. № 64(9). P. 3307-3313.

350. Gevertz D., Paterek, J. R., Davey, M. E., & Wood, W. A. Isolation and Characterization of Anaerobic Halophilic Bacteria From Oil Reservoir Brines // Developments in Petroleum Science. Elsevier, 1991. № 31. P. 115-129.

351. Castenholz R. W. General characteristics of the cyanobacteria // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 2015. P. 1-23.

352. Margheri M. C., Ventura S., Kaštovský J., Komárek J. The taxonomic validation of the cyanobacterial genus *Halotheca* // Phycologia. 2008. № 47(5). P. 477-486.

353. Zhang X., Yang S., Sun J., Wu C., Wang J., Zhang G., Ding, C. Morphology, ultrastructure and phylogeny of *Cyanothece* sp. (*Cyanobacteriaceae: Cyanophyceae*) isolated from the eastern Indian Ocean // Acta Oceanologica Sinica. 2018. № 37(10). P. 4-10.

354. Hof T., Frémy P. On *Myxophyceae* living in strong brines // Recueil des travaux botaniques neerlandais. 1933. № 30(1). P. 140-162.

355. Abed R. M., Garcia-Pichel F., Hernández-Mariné M. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov., sp. nov // Archives of Microbiology. 2002. № 177(5). P. 361-370.

356. Choi D. H., Noh J. H., Lee C. M., Rho S. *Rubidibacter lacunae* gen. nov., sp. nov., a unicellular, phycoerythrin-containing cyanobacterium isolated from seawater of Chuuk lagoon, Micronesia // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № 58(12). P. 2807-2811.

357. Chisholm S. W., Frankel S. L., Goericke R., Olson R. J., Palenik B., Waterbury J. B., West-Johnsrud L., Zettler E. R. *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and *b* // Archives of Microbiology. 1992. № 157(3). P. 297-300.

358. Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2000. № 50(3). P. 1265-1277.

359. Antunes A., Rainey F. A., Wanner G., Taborda M., Pätzold J., Nobre M. F., da Costa M. S., Huber R. A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brine-filled deep of the Red Sea // Journal of bacteriology. 2008. № 190(10). P. 3580-3587.

360. Genus *Haloplasma* [Электронный ресурс] // LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: [Сайт]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/haloplasma> (дата обращения: 01.12.2020).

361. Oren A. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments // Journal of Biological Research-Thessaloniki. 2014. № 21(1). P. 1-8.

362. Genus: *Dunaliella* [Электронный ресурс] // AlgaeBase: [Сайт]. URL: <https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=6930> (дата обращения: 01.12.2020).

363. Gharekhan C. H., Upasani V. N. Diatoms from Saline Ecosystems and Biotechnological Applications: An Overview // International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2019. № 9(3). P. 869-877.
364. Ishika T., Bahri P. A., Laird D. W., Moheimani N. R. The effect of gradual increase in salinity on the biomass productivity and biochemical composition of several marine, halotolerant, and halophilic microalgae // Journal of Applied Phycology. 2018. № 30(3). P. 1453-1464.
365. Indrayani I., Moheimani N. R., Borowitzka M. A. Long-term reliable culture of a halophilic diatom, *Amphora* sp. MUR258, in outdoor raceway ponds // Journal of Applied Phycology. 2019. № 31(5). P. 2771-2778.
366. Gunde-Cimerman N., Ramos J., Plemenitaš A. Halotolerant and halophilic fungi // Mycological research. 2009. № 113(11). P. 1231-1241.
367. Bunbury-Blanchette A. L., Walker A. K. Occurrence and Distribution of Fungi in Saline Environments // In: Giri B. and Varma A. (eds). Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions. Springer, Cham. 2019. P. 19-38.
368. Harding T., Simpson A. G. B. Recent advances in halophilic protozoa research // Journal of Eukaryotic Microbiology. 2018. № 65(4). P. 556-570.
369. Harding T., Roger A. J., Simpson A. G. B. Adaptations to high salt in a halophilic protist: differential expression and gene acquisitions through duplications and gene transfers // Frontiers in microbiology. 2017. № 8. P. 1-27.
370. Vicente O., Boscaiu M., Naranjo M. Á., Estrelles E., Bellés J. M., Soriano P. Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (*Plantaginaceae*) // Journal of Arid Environments. 2004. № 58(4). P. 463-481.
371. Yamamoto K., Shiwa Y., Ishige T., Sakamoto H., Tanaka K., Uchino M., Tanaka N., Oguri S., Saitoh H., Tsushima S. Bacterial diversity associated with the rhizosphere and endosphere of two halophytes: *Glaux maritima* and *Salicornia europaea* // Frontiers in microbiology. 2018. № 9. P. 1-12.
372. Yamamoto K., Matsutani M., Shiwa Y., Ishige T., Sakamoto H., Saitoh H., Tsushima S. Comparative Analysis of Bacterial Diversity and Community Structure in the Rhizosphere and Root Endosphere of Two Halophytes, *Salicornia europaea* and

Glaux maritima, Collected from Two Brackish Lakes in Japan // Microbes and environments. 2020. № 35(3). P. 1-12.

373. Torstensson P. Population dynamics of the annual halophyte *Spergularia marina* on a Baltic seashore meadow // Vegetatio. 1987. № 68(3). P. 169-172.

374. Ungar I. A. Population characteristics, growth, and survival of the halophyte *Salicornia europaea* // Ecology. 1987. № 68(3). P. 569-575.

375. Hassine A. B., Ghanem M. E., Bouzid S., Lutts S. An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress // Journal of Experimental Botany. 2008. № 59(6). P. 1315-1326.

376. Thomas J. C., Bohnert H. J. Salt stress perception and plant growth regulators in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* // Plant physiology. 1993. № 103(4). P. 1299-1304.

377. Sobrado M. A. Leaf characteristics and gas exchange of the mangrove *Laguncularia racemosa* as affected by salinity // Photosynthetica. 2005. № 43(2). P. 217-221.

378. Atanasova N. S., Oksanen H. M., Bamford D. H. Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes // Current opinion in microbiology. 2015. № 25. P. 40-48.

379. Pietilä M. K., Laurinmäki P., Russell D. A., Ko C. C., Jacobs-Sera D., Butcher S. J., Bamford D. H., Hendrix R. W. Insights into head-tailed viruses infecting extremely halophilic archaea // Journal of virology. 2013. № 87(6). P. 3248-3260.

380. Pietilä M. K., Laurinmäki P., Russell D. A., Ko C. C., Jacobs-Sera D., Hendrix R. W., Bamford D. H., Butcher S. J. Structure of the archaeal head-tailed virus HSTV-1 completes the HK97 fold story // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013. № 110(2). P. 10604-10609.

381. Senčilo A., Jacobs-Sera D., Russell D. A., Ko C. C., Bowman C. A., Atanasova N. S., Österlund E., Oksanen H. M., Bamford D. H., Hatfull G. F., Roine E., Hendrix R. W. Snapshot of haloarchaeal tailed virus genomes // RNA biology. 2013. № 10(5). P. 803-816.

382. Klein R., Baranyi U., Rössler N., Greineder B., Scholz H., Witte A. *Natrialba magadii* virus ϕ Ch1: first complete nucleotide sequence and functional organization of a virus infecting a haloalkaliphilic archaeon // *Molecular microbiology*. 2002. № 45(3). P. 851-863.
383. Atanasova N. S., Demina T. A., Buivydas A., Bamford D. H., Oksanen H. M. Archaeal viruses multiply: Temporal screening in a solar saltern // *Viruses*. 2015. № 7(4). P. 1902-1926.
384. Pietilä M. K., Atanasova N. S., Manole V., Liljeroos L., Butcher S. J., Oksanen H. M., Bamford D. H. Virion architecture unifies globally distributed pleolipoviruses infecting halophilic archaea // *Journal of virology*. 2012. № 86(9). P. 5067-5079.
385. Pietilä M. K., Roine E., Sencilo A., Bamford D. H., Oksanen H. M. *Pleolipoviridae*, a newly proposed family comprising archaeal pleomorphic viruses with single-stranded or double-stranded DNA genomes // *Archives of virology*. 2016. № 161(1). P. 249-256.
386. Bath C., Cukalac T., Porter K., Dyall-Smith M. L. His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, *Salterprovirus* // *Virology*. 2006. № 350(1). P. 228-239.
387. Pietilä M. K., Atanasova N. S., Oksanen H. M., Bamford D. H. Modified coat protein forms the flexible spindle-shaped virion of haloarchaeal virus His1 // *Environmental microbiology*. 2013. № 15(6). P. 1674-1686.
388. Abrescia N. G. A., Cockburn J. J., Grimes J. M., Sutton G. C., Diprose J. M., Butcher S. J., Fuller S. D., San Martin C., Burnett R. M., Stuart D. I., Bamford D. H., Bamford J. K. H. Insights into assembly from structural analysis of bacteriophage PRD1 // *Nature*. 2004. № 432(7013). P. 68-74.
389. Jaakkola S. T., Penttinen R. K., Vilén S. T., Jalasvuori M., Rönnholm G., Bamford J. K. H., Bamford D. H., Oksanen H. M. Closely related archaeal *Haloarcula hispanica* icosahedral viruses HHIV-2 and SH1 have nonhomologous genes encoding host recognition functions // *Journal of virology*. 2012. № 86(9). P. 4734-4742.

390. Porter K., Tang S. L., Chen C. P., Chiang P. W., Hong M. J., Dyll-Smith M. PH1: an archaeovirus of *Haloarcula hispanica* related to SH1 and HHIV-2 // *Archaea*. 2013. P. 1-17.
391. Zhang Z., Liu Y., Wang S., Yang D., Cheng Y., Hu J., Chen J., Mei Y., Shen., Bamford D. H., Chen X. Temperate membrane-containing halophilic archaeal virus SNJ1 has a circular dsDNA genome identical to that of plasmid pHH205 // *Virology*. 2012. № 434(2). P. 233-241.
392. Aalto A. P., Bitto D., Ravantti J. J., Bamford D. H., Huiskonen J. T., Oksanen H. M. Snapshot of virus evolution in hypersaline environments from the characterization of a membrane-containing *Salisaeta* icosahedral phage 1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. № 109(18). P. 7079-7084.
393. Boughalmi M., Saadi H., Pagnier I., Colson P., Fournous G., Raoult D., La Scola B. High-throughput isolation of giant viruses of the *Mimiviridae* and *Marseilleviridae* families in the Tunisian environment // *Environmental microbiology*. 2013. № 15(7). P. 2000-2007.
394. Sime-Ngando T., Lucas S., Robin A., Tucker K. P., Colombet J., Bettarel Y., Desmond E., Gribaldo S., Forterre P., Forterre M., Prangishvili D. Diversity of virus–host systems in hypersaline Lake Retba, Senegal // *Environmental Microbiology*. 2011. № 13(8). P. 1956-1972.
395. Mei Y., He C., Huang Y., Liu Y., Zhang Z., Chen X., Shen P. Salinity regulation of the interaction of halovirus SNJ1 with its host and alteration of the halovirus replication strategy to adapt to the variable ecosystem // *PloS one*. 2015. № 10(4). P. 1-12.
396. Ventosa A., Arahal D. R. Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity // *Extremophiles*. 2009. № 2. P. 247-262.
397. Javor B. J. Industrial microbiology of solar salt production // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002. № 28(1). P. 42-47.
398. Ventosa A., Fernández A. B., León M. J., Sánchez-Porro C., Rodríguez-Valera F. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments // *Extremophiles*. 2014. № 18(5). P. 811-824.

399. Pedrós-Alió C. Trophic ecology of solar salterns // In: Ventosa A. (eds). Halophilic microorganisms. Springer, Berlin, Heidelberg. 2004. P. 33-48.
400. Rodríguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Cormenzana A. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations // *Microbial Ecology*. 1981. № 7(3). P. 235-243.
401. Rodríguez-Valera F. et al. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern // *Microbial Ecology*. 1985. № 11(2). P. 107-115.
402. Benlloch S., López-López A., Casamayor E. O., Øvreås L., Goddard V., Daae F. L., Smerdon G., Massana R., Joint I., Thingstad F., Pedrós-Alió C., Rodríguez-Valera F. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern // *Environmental Microbiology*. 2002. № 4(6). P. 349-360.
403. Atwood G., Wambeam T. J., Anderson N. J. The present as a key to the past: Paleoshoreline correlation insights from Great Salt Lake // *Developments in earth surface processes*. Elsevier. 2016. № 20. P. 1-27.
404. Hassibe W.R., Keck W.G. The Great Salt Lake. // U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., USA. 1991.
405. Baxter B. K., Litchfield C. D., Sowers K., Griffith J. D., Dassarma P. A., Dassarma S. Microbial diversity of Great Salt Lake // In: Gunde-Cimerman N., Oren A. and Plemenitaš A. (eds). Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Springer, Dordrecht. 2005. P. 9-25.
406. ZoBell C. E. Direct microscopic evidence of an autochthonous bacterial flora in Great Salt Lake // *Ecology*. 1937. № 18(3). P. 453-458.
407. Baxter B. K. Great Salt Lake microbiology: a historical perspective // *International Microbiology*. 2018. № 21(3). P. 79-95.
408. Post F. J. Life in the Great Salt Lake // *Utah Science*. 1975.
409. Post F. J. The microbial ecology of the Great Salt Lake // *Microbial ecology*. 1977. № 3(2). P. 143-165.
410. Post F. J. Microbiology of the Great Salt Lake north arm // *Salt Lakes*. Springer, Dordrecht. 1981. P. 59-69.

411. Felix E. A., Rushforth S. R. The algal flora of Great Salt Lake, Utah: A preliminary report // Utah State University, DA, USA. 1977.
412. Felix E. A., Rushforth S. R. The algal flora of the Great Salt Lake, Utah, USA // *Nona Hedwigia*. 1979. № 31(1-3). P. 163-195.
413. Felix E. A., Rushforth S. R. Biology of the south arm of the Great Salt Lake, Utah // *Great Salt Lake: A scientific, historical, and economic overview*. 1980. № 305. P. 312.
414. Rushforth S. R., Felix E. A. Biotic adjustments to changing salinities in the Great Salt Lake, Utah, USA // *Microbial ecology*. 1982. № 8(2). P. 157-161.
415. Cronin E. A., Post F. J. Report of a dematiaceous hyphomycete from the Great Salt Lake, Utah // *Mycologia*. 1977. № 69(4). P.846-847.
416. Fendrich C., Schink B. Degradation of glucose, glycerol and acetate by aerobic bacteria in surface water of Great Salt Lake, Utah, USA // *Systematic and Applied Microbiology*. 1988. № 11(1). P. 94-96.
417. Tazi L., Breakwell D. P., Harker A. R., Crandall K. A. Life in extreme environments: microbial diversity in Great Salt Lake, Utah // *Extremophiles*. 2014. № 18(3). P. 525-535.
418. Wilkansky B. Life in the dead sea // *Nature*. 1936. № 138 (3489). P. 467-467.
419. Elazari-Volcani B. Algae in the bed of the Dead Sea // *Nature*. 1940. № 145(3686). P. 975-975.
420. Elazari-Volcani B. A dimastigamoeba in the bed of the Dead Sea // *Nature*. 1943. № 152(3854). P. 301-302.
421. Elazari-Volcani B. A ciliate from the Dead Sea // *Nature*. 1944. № 154(3906). P. 335-335.
422. Volcani B. E. The microorganisms of the Dead Sea // *Papers collected to commemorate the 70th anniversary of Dr. Chaim Weizmann*. 1944. № 71. P. 85.
423. Oren A., Ginzburg M., Ginzburg B. Z., Hochstein L. I., Volcani B. E. *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic

bacterium from the Dead Sea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1990. № 40(2). P. 209-210.

424. Mullakhanbhai M. F., Larsen H. *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement // Archives of microbiology. 1975. № 104(1). P. 207-214.

425. Oren A. *Halobacterium sodomense* sp. nov., a Dead Sea halobacterium with an extremely high magnesium requirement // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1983. № 33(2). P. 381-386.

426. Oren A., Gurevich P., Gemmell R. T., Teske A. *Halobaculum gomorreense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1995. № 45(4). P. 747-754.

427. Bardavid R. E., Mana L., Oren A. *Haloplanus natans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic, gas-vacuolate archaeon isolated from Dead Sea–Red Sea water mixtures in experimental outdoor ponds // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. № 57(4). P. 780-783.

428. Elazari-Volcani B. E. Studies on the microflora of the Dead Sea // Cooperative Press "Hapoel hazair", Tel-Aviv. 1940.

429. Huval J. H., Latta R., Wallace R., Kushner D. J., Vreeland R. H. Description of two new species of *Halomonas*: *Halomonas israelensis* sp. nov. and *Halomonas canadensis* sp. nov // Canadian journal of microbiology. 1995. № 41(12). P. 1124-1131.

430. Arahall D. R., Marquez M. C., Volcani B. E., Schleifer K. H., Ventosa A. *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1999. № 49(2). P. 521-530.

431. Oren A., Weisburg W. G., Kessel M., Woese C. R. *Halobacteroides halobius* gen. nov., sp. nov., a Moderately Halophilic Anaerobic Bacterium from the Bottom Sediments of the Dead Sea // Systematic and applied microbiology. 1984. № 5(1). P. 58-70.

432. Oren A., Pohla H., Stackebrandt E. Transfer of *Clostridium lortetii* to a New Genus *Sporohalobacter* gen. nov. as *Sporohalobacter lortetii* comb. nov., and Description of *Sporohalobacter marismortui* sp. nov // Systematic and Applied Microbiology. 1987. № 9(3). P. 239-246.

433. Blum J. S., Stolz J. F., Oren A., Oremland R. S. *Selenihalanaerobacter shrifitii* gen. nov., sp. nov., a halophilic anaerobe from Dead Sea sediments that respire selenate // Archives of Microbiology. 2001. № 175(3). P. 208-219.

434. Bodaker I., Beja O., Sharon I., Feingersch R., Rosenberg M., Oren A., Hindiyyeh M. Y., Malkawi H. I. Archaeal diversity in the Dead Sea: microbial survival under increasingly harsh conditions // Natural Resources and Environmental Issues. 2009. № 15(1). P.137-143.

435. Bodaker I., Sharon I., Suzuki M. T., Feingersch R., Shmoish M., Andreishcheva E., Sogin M. L., Rosenberg M., Maguire M. E., Belkin S., Oren A., Beja O. Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment //The ISME journal. – 2010. – T. 4. – №. 3. – C. 399-407.

436. Oren A. Two centuries of microbiological research in the Wadi Natrun, Egypt: a model system for the study of the ecology, physiology, and taxonomy of haloalkaliphilic microorganisms // In: Seckbach J., Oren A. and Stan-Lotter H. (eds). Polyextremophiles. Springer, Dordrecht. 2013. P. 101-119.

437. Sickenberger E. Briefe aus Egypten. I. Wady Atrun. Das Natronthal // Chemiker-Zeitung. 1892. № 16. P. 1645-1646.

438. Mesbah N. M., Abou-El-Ela S. H., Wiegel J. Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the Wadi An Natrun, Egypt // Microbial ecology. 2007. № 54(4). P. 598-617.

439. Aloisi G., Drews M., Wallmann K., Bohrmann G. Fluid expulsion from the Dvurechenskii mud volcano (Black Sea): Part I. Fluid sources and relevance to Li, B, Sr, I and dissolved inorganic nitrogen cycles // Earth and Planetary Science Letters. 2004. № 225(3-4). P. 347-363.

440. Watson S. W., Waterbury J. B. The sterile hot brines of the Red Sea // In: Degens E. T. and Ross D. A. (eds). Hot brines and recent heavy metal deposits in the Red Sea. Springer, Berlin, Heidelberg. 1969. P. 272-281.
441. Blum N., Puchelt H. Sedimentary-hosted polymetallic massive sulfide deposits of the Kebrit and Shaban Deeps, Red Sea // Mineralium Deposita. 1991. № 26(3). P. 217-227.
442. Faber E., Botz R., Poggenburg J., Schmidt M., Stoffers P., Hartmann M. Methane in Red Sea brines // Organic geochemistry. 1998. № 29(1-3). P. 363-379.
443. Michaelis W., Jenisch A., Richnow H. H. Hydrothermal petroleum generation in Red Sea sediments from the Kebrit and Shaban Deeps // Applied Geochemistry. 1990. № 5(1-2). P. 103-114.
444. Eder W., Ludwig W., Huber R. Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrit Deep, Red Sea // Archives of microbiology. 1999. № 172 (4). P. 213-218.
445. Eder W., Jahnke L. L., Schmidt M., Huber R. Microbial diversity of the brine-seawater interface of the Kebrit Deep, Red Sea, studied via 16S rRNA gene sequences and cultivation methods // Applied and Environmental Microbiology. 2001. № 67(7). P. 3077-3085.
446. MacDonald I. R., Reilly J. F., Guinasso N. L., Brooks J. M., Carney R. S., Bryant W. A., Bright T. J. Chemosynthetic mussels at a brine-filled pockmark in the northern Gulf of Mexico // Science. 1990. № 248(4959). P. 1096-1099.
447. Nix E. R., Fisher C. R., Vodenichar J., Scott, K. M. Physiological ecology of a mussel with methanotrophic endosymbionts at three hydrocarbon seep sites in the Gulf of Mexico // Marine Biology. 1995. № 122(4). P. 605-617.
448. Batang Z. B., Papathanassiou E., Al-Suwailem A., Smith C., Salomidi M., Petihakis G., Alikunhi N. M., Smith L., Mallon F., Yapici T., Fayad N. First discovery of a cold seep on the continental margin of the central Red Sea // Journal of Marine Systems. 2012. № 94. P. 247-253.
449. Niemann H., Linke P., Knittel K., MacPherson E., Boetius A., Brückmann W., Larvik G., Wallmann K., Schacht U., Omoregie E., Hilton D., Brown K., Rehder

G. Methane-carbon flow into the benthic food web at cold seeps—a case study from the Costa Rica subduction zone // *PLoS One*. 2013. № 8(10). P. 1-10.

450. Vestheim H., Kaartvedt S. A deep sea community at the Kebrit brine pool in the Red Sea // *Marine Biodiversity*. 2016. № 46(1). P. 59-65.

451. Barozzi A., Mapelli F., Michoud G., Crotti E., Merlino G., Molinari F., Borin S., Daffonchio D. Microbial diversity and biotechnological potential of microorganisms thriving in the deep-sea brine pools // In: Durvasula R. V. and Subba Rao D.V. (eds). *Extremophiles*. CRC Press. 2018. P. 19-32.

452. Danovaro R., Corinaldesi C., D'Onghia G., Galil B., Gambi C., Gooday A. J., Lampadariou N., Luna G. M., Morigi C., Olu K., Polymenakou P., Ramirez-Llodra E., Sabbatini A., Sarda F., Sibuet M., Tselepidis A. Deep-sea biodiversity in the Mediterranean Sea: the known, the unknown, and the unknowable // *PloS one*. 2010. № 5(8). P. 1-25.

453. La Cono V., Smedile F., Bortoluzzi G., Arcadi E., Maimone G., Messina E., Borghini M., Oliveri E., Mazzola S., L'Haridon S., Toffin L., Genovese L., Ferrer M., Giuliano L., Golyshin P. N., Yakimov M. M. Unveiling microbial life in new deep-sea hypersaline Lake Thetis. Part I: Prokaryotes and environmental settings // *Environmental Microbiology*. 2011. № 13(8). P. 2250–2268.

454. Daffonchio D., Borin S., Brusa T., Brusetti L., Van der Wielen P. W., Bolhuis H., Yakimov M. M., D'Auria G., Giuliano L., Marty D., Tamburini C., McGenity T. J., Hallsworth J. E., Sass A. M., Timmis K. N., Tselepidis A., de Lange G. J., Hubner A., Thomson J., Varnavas S. P., Gasparoni F., Gerber H. W., Malinverno E., Corselli C., Biodeep Scientific Party. Stratified prokaryote network in the oxic–anoxic transition of a deep-sea halocline // *Nature*. 2006. № 440(7081). P. 203-207.

455. Yakimov M. M., La Cono V., Denaro R., D'auria G., Decembrini F., Timmis K. N., Timmis K. N., Golyshin P. N., Giuliano L. Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L'Atalante, Eastern Mediterranean Sea // *The ISME journal*. 2007. № 1(8). P. 743-755.

456. Yakimov M. M., Giuliano L., Cappello S., Denaro R., Golyshin P. N. Microbial community of a hydrothermal mud vent underneath the deep-sea anoxic brine lake Urania (Eastern Mediterranean) // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 2007. № 37(2). P. 177-188.

457. Borin S., Brusetti L., Mapelli F., d'Auria G., Brusa T., Marzorati M., Rizzi A., Yakimov M., Marty D., De Lange G. J., Van der Wielen P., Bolhuis H., McGenity T.J., Polymenakou P. N., Malinvernoj E., Giuliano L., Corsellij C., Daffonchio D. Sulfur cycling and methanogenesis primarily drive microbial colonization of the highly sulfidic Urania deep hypersaline basin // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. № 106(23). P. 9151-9156.

458. Yakimov M. M., La Cono V., Spada G. L., Bortoluzzi G., Messina E., Smedile F., Arcadi E., Borghini M., Ferrer M., Schmitt-Kopplin P., Hertkorn N., Cray J. A., Hallsworth J. E., Golyshin P. N., Giuliano L. Microbial community of the deep-sea brine Lake Kryos seawater–brine interface is active below the chaotropy limit of life as revealed by recovery of mRNA // *Environmental microbiology*. 2015. № 17(2). P. 364-382.

459. van der Wielen P. W. J. J., Bolhuis H., Borin S., Daffonchio D., Corselli C., Giuliano L., D'Auria G., de Lange G. J., Huebner A., Varnavas S. P., Thomson J., Tamburini C., Marty D., McGenity T. J., Timmis K. N., BioDeep Scientific Party. The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins // *Science*. 2005. № 307(5706). P. 121-123.

460. Wais A. C. Cellular morphogenesis in a halophilic archaeobacterium // *Current Microbiology*. 1985. № 12 (4). P. 191-195.

461. Kostrikina N. A., Zvyagintseva I. S., Duda V. I. Cytological peculiarities of some extremely halophilic soil archaeobacteria // *Archives of microbiology*. 1991. № 156 (5). P. 344-349.

462. Klingl A. S-layer and cytoplasmic membrane—exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes // *Frontiers in microbiology*. 2014. № 5. P. 624.

463. Sára M., Sleytr U. B. S-layer proteins // *Journal of bacteriology*. 2000. № 182(4). P. 859-868.
464. Llamas I., Quesada E., Martínez-Cánovas M. J., Gronquist M., Eberhard A., Gonzalez J. E. Quorum sensing in halophilic bacteria: detection of N-acyl-homoserine lactones in the exopolysaccharide-producing species of *Halomonas* // *Extremophiles*. 2005. № 9(4). P. 333-341.
465. Cho K. Y., Doy C. H., Mercer E. H. Ultrastructure of the obligate halophilic bacterium *Halobacterium halobium* // *Journal of bacteriology*. 1967. № 94(1). P. 196-201.
466. Alba I., Torreblanca M., Sánchez M., Colom M., Meseguer I. Isolation of the fibrocrystalline body, a structure present in haloarchaeal species, from *Halobacterium salinarum* // *Extremophiles*. 2001. № 5(3). P. 169-175.
467. Ruepp A., Wanner G., Soppa J. A 71-kDa protein from *Halobacterium salinarum* belongs to a ubiquitous P-loop ATPase superfamily with head-rod-tail structure // *Archives of microbiology*. 1997. № 169(1). P. 1-9.
468. Herrmann U., Soppa J. Cell cycle-dependent expression of an essential SMC-like protein and dynamic chromosome localization in the archaeon *Halobacterium salinarum* // *Molecular microbiology*. 2002. № 46(2). P. 395-409.
469. Alam M., Oesterhelt D. Morphology, function and isolation of halobacterial flagella // *Journal of molecular biology*. 1984. № 176(4). P. 459-475.
470. Alam M., Oesterhelt D. Purification, reconstitution and polymorphic transition of halobacterial flagella // *Journal of molecular biology*. 1987. № 194(3). P. 495-499.
471. De Rosa M., Gambacorta A., Nicolaus B., Ross H. N. M., Grant W. D., Bu'Lock J. D. An asymmetric archaeobacterial diether lipid from alkaliphilic halophiles // *Microbiology*. 1982. № 128(2). P. 343-348.
472. de Rosa M., Gambacorta A., Nicolaus B., Grant W. D. A C₂₅,C₂₅ diether core lipid from archaeobacterial haloalkaliphiles // *Microbiology*. 1983. № 129(8). P. 2333-2337.

473. Morth S., Tindall B. J. Variation of polar lipid composition within haloalkaliphilic archaeobacteria // Systematic and applied microbiology. 1985. № 6(3). P. 247-250.

474. Morth S., Tindall B. J. Evidence that changes in the growth conditions affect the relative distribution of diether lipids in haloalkaliphilic archaeobacteria // FEMS microbiology letters. 1985. № 29(3). P. 285-288.

475. Tindall B. J. Qualitative and quantitative distribution of diether lipids in haloalkaliphilic archaeobacteria // Systematic and applied microbiology. 1985. № 6(3). P. 243-246.

476. Franzmann P. D., Stackebrandt E., Sanderson K., Volkman J. K., Cameron D. E., Stevenson P. L., McMeekin T.A., Burton H. R. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica // Systematic and Applied Microbiology. 1988. № 11(1). P. 20-27.

477. Upasani V. N., Desai S. G., Moldoveanu N., Kates M. Lipids of extremely halophilic archaeobacteria from saline environments in India: a novel glycolipid in *Natronobacterium* strains // Microbiology. 1994. № 140(8). P. 1959-1966.

478. Corcelli A., Lobasso S. Characterization of lipids of halophilic archaea // Methods in microbiology. Academic Press. 2006. № 35. P. 585-613.

479. Vargas C., Kallimanis A., Koukkou A. I., Calderon M. I., Canovas D., Iglesias-Guerra F., Drainas C., Ventosa A., Nieto J. J. Contribution of chemical changes in membrane lipids to the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* // Systematic and applied microbiology. 2005. № 28(7). P. 571-581.

480. Monteoliva-Sanchez M., Ramos-Cormenzana A. Effect of growth temperature and salt concentration on the fatty acid composition of *Flavobacterium halmephilum* CCM2831 // FEMS microbiology letters. 1986. № 33(1). P. 51-54.

481. Monteoliva-Sanchez M., Ferrer M. R., Ramos-Cormenzana A., Quesada E., Monteoliva M. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration // Microbiology. 1988. № 134(1). P. 199-203.

482. Monteoliva-Sanchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N. J. The effect of salinity and compatible solutes on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Pseudomonas halosaccharolytica* // *Microbiology*. 1993. № 139(8). P. 1877-1884.
483. Houwink A. L. Flagella, gas vacuoles and cell-wall structure in *Halobacterium halobium*; an electron microscope study // *Microbiology*. 1956. № 15 (1). P. 146-150.
484. Oren A. The function of gas vesicles in halophilic archaea and bacteria: theories and experimental evidence // *Life*. 2013. № 3(1). P. 1-20.
485. Walsby A. E. The pressure relationships of gas vacuoles // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. 1971. № 178 (1052). P. 301-326.
486. Walsby A. E. Structure and function of gas vacuoles // *Bacteriological reviews*. 1972. № 36(1). P. 1-32.
487. Walsby A. E. The properties and buoyancy-providing role of gas vacuoles in *Trichodesmium* Ehrenberg // *British Phycological Journal*. 1978. № 13(2). P. 103-116.
488. Rodriguez-Valera F., Lillo J. G., Antón J., Meseguer I. Biopolymer production by *Haloferax mediterranei* // In: Rodriguez-Valera F. (eds). *General and applied aspects of halophilic microorganisms*. Springer, Boston, MA. 1991. P. 373-380.
489. Nicolaus B., Lama L., Esposito E., Manca M. C., Improta R., Bellitti M. R., Duckworth A. W., Grant W. D., Gambacorta A. *Haloarcula* spp able to biosynthesize exo- and endopolymers // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1999. № 23(6). P. 489-496.
490. Quillaguamán J., Guzmán H., Van-Thuoc D., Hatti-Kaul R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. № 85(6). P. 1687-1696.
491. Eichler J., Abu-Qarn M., Konrad Z., Magidovich H., Plavner N., Yurist-Doutsch S. The cell envelopes of haloarchaea: staying in shape in a world of salt // In: König H., Claus H. and Varma A. (eds). *Prokaryotic Cell Wall Compounds*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010. P. 253-270.

492. Stoeckenius W., Rowen R. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration // *The Journal of cell biology*. 1967. № 34(1). P. 365-393.
493. Steensland H., Larsen H. A study of the cell envelope of the halobacteria // *Microbiology*. 1969. № 55(3). P. 325-336.
494. Kirk R. G., Ginzburg M. Ultrastructure of two species of halobacterium // *Journal of ultrastructure research*. 1972. № 41(1-2). P. 80-94.
495. Blaurock A. E., Stoeckenius W., Oesterhelt D., Scherfhof G. L. Structure of the cell envelope of *Halobacterium halobium* // *The Journal of cell biology*. 1976. № 71(1). P. 1-22.
496. Mescher M. F., Strominger J. L. Structural (shape-maintaining) role of the cell surface glycoprotein of *Halobacterium salinarium* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976. № 73(8). P. 2687-2691.
497. Kessel M., Wildhaber I., Cohen S., Baumeister W. Three-dimensional structure of the regular surface glycoprotein layer of *Halobacterium volcanii* from the Dead Sea // *The EMBO Journal*. 1988. № 7(5). P. 1549-1554.
498. Engelhardt H. Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited // *Journal of structural biology*. 2007. № 160(2). P. 115-124.
499. Eichler J. Facing extremes: archaeal surface-layer (glyco) proteins // *Microbiology*. 2003. № 149(12). P. 3347-3351.
500. Jarrell K. F., Jones G. M., Kandiba L., Nair D. B., Eichler J. S-layer glycoproteins and flagellins: reporters of archaeal posttranslational modifications // *Archaea*. 2010. № 2010. P. 1-13.
501. Sumper M., Berg E., Mengele R., Strobel I. Primary structure and glycosylation of the S-layer protein of *Haloferax volcanii* // *Journal of Bacteriology*. 1990. № 172(12). P. 7111-7118.
502. Helenius A., Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum // *Annual review of biochemistry*. 2004. № 73(1). P. 1019-1049.

503. Abu-Qarn M., Eichler J. Protein N-glycosylation in Archaea: defining *Haloferax volcanii* genes involved in S-layer glycoprotein glycosylation // Molecular microbiology. 2006. № 61(2). P. 511-525.

504. Abu-Qarn M., Yurist-Doutsch S., Giordano A., Trauner A., Morris H. R., Hitchen P., Medalia O., Dell A., Eichler J. *Haloferax volcanii* AglB and AglD are involved in N-glycosylation of the S-layer glycoprotein and proper assembly of the surface layer // Journal of molecular biology. 2007. № 374(5). P. 1224-1236.

505. Meyer B. H., Albers S. V. Archaeal cell walls // eLS. 2014. P. 1-13.

506. Konrad Z., Eichler J. Lipid modification of proteins in Archaea: attachment of a mevalonic acid-based lipid moiety to the surface-layer glycoprotein of *Haloferax volcanii* follows protein translocation // Biochemical Journal. 2002. № 366(3). P. 959-964.

507. Burns D. G., Janssen P. H., Itoh T., Kamekura M., Li Z., Jensen G., Rodriguez-Valera F., Bolhuis H., Dyall-Smith M. L. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007. № 57(2). P. 387-392.

508. Zenke R., von Gronau S., Bolhuis H., Gruska M., Pfeiffer F., Oesterhelt D. Fluorescence microscopy visualization of halomucin, a secreted 927 kDa protein surrounding *Haloquadratum walsbyi* cells // Frontiers in microbiology. 2015. № 6. P. 1-6.

509. Tomkiewicz D., Nouwen N., van Leeuwen R., Tans S., Driessen A. J. SecA supports a constant rate of preprotein translocation // Journal of Biological Chemistry. 2006. № 281(23). P. 15709-15713.

510. Kandler O., König H. Cell envelopes of archaea: structure and chemistry // New Comprehensive Biochemistry. Elsevier. 1993. № 26. P. 223-259.

511. Kandler O., König H. Cell wall polymers in *Archaea* (Archaeobacteria) // Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 1998. №. 54(4). P. 305-308.

512. Niemetz R., Kärcher U., Kandler O., Tindall B. J., König H. The cell wall polymer of the extremely halophilic archaeon *Natronococcus occultus* // European Journal of Biochemistry. 1997. № 249(3). P. 905-911.

513. Albers S. V., Konings W. N., Driessen A. J. M. Solute transport // In: Cavicchioli R. (eds). Archaea. Molecular and cellular biology. ASM Press, Washington, DC. 2007. P. 354-368.

514. Kunte H. J. K⁺ transport and its role for osmoregulation in a halophilic member of the Bacteria domain: characterization of the K⁺ uptake systems from *Halomonas elongata* // In: Seckbach J. (eds). Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Springer, Dordrecht. 2005. P. 287-300.

515. Albers S. V., Vossenbergh J. L., Driessen A. J., Konings W. N. Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions // Extremophiles. 2001. № 5(5). P. 285-294.

516. Konings W. N., Albers S. V., Koning S., Driessen A. J. The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments // Antonie Van Leeuwenhoek. 2002. № 81(1-4). P. 61-72.

517. Konings W. N. Microbial transport: adaptations to natural environments // Antonie Van Leeuwenhoek. 2006. № 90(4). P. 325-342.

518. Booth I. R., Edwards M. D., Black S., Schumann U., Miller S. Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? // Nature Reviews Microbiology. 2007. № 5(6). P. 431-440.

519. Kung C., Martinac B., Sukharev S. Mechanosensitive channels in microbes // Annual review of microbiology. 2010. № 64. P. 313-329.

520. Árnadóttir J., Chalfie M. Eukaryotic mechanosensitive channels // Annual review of biophysics. 2010. № 39. P. 111-137.

521. Jin P., Jan L. Y., Jan Y. N. Mechanosensitive ion channels: structural features relevant to mechanotransduction mechanisms // Annual review of neuroscience. 2020. № 43. P. 1-23.

522. Lolkema J. S., Poolman B., Konings W. N. Secondary transporters and metabolic energy generation in bacteria // In: Konings W.N., Kaback H.R. and Lolkema J.S. (eds). Handbook of biological physics. North-Holland. 1996. № 2. P. 229-260.

523. Jaehme M., Slotboom D. J. Diversity of membrane transport proteins for vitamins in bacteria and archaea // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2015. № 1850(3). P. 565-576.

524. Mulligan C., Fischer M., Thomas G. H. Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea // FEMS microbiology reviews. 2011. № 35(1). P. 68-86.

525. Morth J. P., Pedersen B. P., Buch-Pedersen M. J., Andersen J. P., Vilsen B., Palmgren M. G., Nissen P. A structural overview of the plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps // Nature reviews Molecular cell biology. 2011. № 12(1). P. 60-70.

526. Kumari J., Rathore M. S. Na⁺/K⁺-ATPase a Primary Membrane Transporter: An Overview and Recent Advances with Special Reference to Algae // The Journal of Membrane Biology. 2020. № 253. P. 191–204.

527. Grote M., Engelhard M., Hegemann P. Of ion pumps, sensors and channels—Perspectives on microbial rhodopsins between science and history // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 2014. № 1837(5). P. 533-545.

528. Higgins C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview // Research in microbiology. 2001. № 152(3-4). P. 205-210.

529. Albers S. V., Koning S. M., Konings W. N., Driessen A. J. Insights into ABC transport in archaea // Journal of bioenergetics and biomembranes. 2004. № 36(1). P. 5-15.

530. Francl A. L., Thongaram T., Miller M. J. The PTS transporters of *Lactobacillus gasser* ATCC 33323 // BMC microbiology. 2010. № 10(1). P. 1-13.

531. Jeckelmann J. M., Erni B. Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria // Pflugers Archiv: European journal of physiology. 2020. №472. P. 1129-1153.

532. Ren Q., Paulsen I. T. Large-scale comparative genomic analyses of cytoplasmic membrane transport systems in prokaryotes // Journal of molecular microbiology and biotechnology. 2007. № 12(3-4). P. 165-179.

533. Wood J. M. Bacterial osmosensing transporters // Methods in enzymology. Academic Press. 2007. № 428. P. 77-107.

534. Raval V. H., Bhatt H. B., Singh S. P. Adaptation Strategies in Halophilic Bacteria // In: Durvasula R. V. and Subba Rao D. V. (eds). Extremophiles. CRC Press. 2018. P. 137-164.

535. Ng W. V., Kennedy S. P., Mahairas G. G., Berquist B., Pan M., Shukla H. D., Lasky S. R., Baliga N. S., Thorsson V., Sbrogna J., Swartzell S., Weir D., Hall J., Dahl T. A., Welti R., Goo Y. A., Leithauser B., Keller K., Cruz R., Danson M. J., Hough D. W., Maddocks D. G., Jablonski P. E., Krebs M. P., Angevine C. M., Dale H., Isenbarger T. A., Peck R. F., Pohlschroder M., Spudich J. L., Jung K. H., Alam M., Freitas T., Hou S., Daniels J. J., Dennis P. P., Omer A. D., Ehardt H., Lowe T. M., Liang P., Riley M., Hood L., DasSarma S. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000. № 97(22). P. 12176-12181.

536. Tawara E., Kamo N. Glucose transport of *Haloferax volcanii* requires the Na⁺-electrochemical potential gradient and inhibitors for the mammalian glucose transporter inhibit the transport // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1991. № 1070(2). P. 293-299.

537. Greene R. V., MacDonald R. E. Partial purification and reconstitution of the aspartate transport system from *Halobacterium halobium* // Archives of biochemistry and biophysics. 1984. № 229(2). P. 576-584.

538. Tascón I., Sousa J. S., Corey R. A., Mills D. J., Griwatz D., Aumüller N., Mikusevic M., Stansfeld P. J., Vonck J., Hänelt I. Structural basis of proton-coupled potassium transport in the KUP family // Nature communications. 2020. № 11(1). P. 1-10.

539. Corratgé-Faillie C., Jabnourne M., Zimmermann S., Véry A. A., Fizames C., Sentenac H. Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT

transporter family // Cellular and Molecular Life Sciences. 2010. № 67(15). P. 2511-2532.

540. Ballal A., Basu B., Apte S. K. The Kdp-ATPase system and its regulation // Journal of biosciences. 2007. № 32(3). P. 559-568.

541. Mosimann M., Goshima S., Wenzler T., Lüscher A., Uozumi N., Mäser P. A Trk/HKT-type K⁺ transporter from *Trypanosoma brucei* // Eukaryotic cell. 2010. № 9(4). P. 539-546.

542. Strahl H., Greie J. C. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* R1 responds to potassium limitation by expression of the K⁺-transporting KdpFABC P-type ATPase and by a decrease in intracellular K⁺ // Extremophiles. 2008. № 12(6). P. 741-752.

543. Kixmüller D., Strahl H., Wende A., Greie J. C. Archaeal transcriptional regulation of the prokaryotic KdpFABC complex mediating K⁺ uptake in *H. salinarum* // Extremophiles. 2011. № 15(6). P. 643-652.

544. Kixmüller D., Greie J. C. An ATP-driven potassium pump promotes long-term survival of *Halobacterium salinarum* within salt crystals // Environmental microbiology reports. 2012. № 4(2). P. 234-241.

545. Mongodin E. F., Nelson K. E., Daugherty S., DeBoy R. T., Wister J., Khouri H., Weidman J., Walsh D. A., Papke R. T., Sanchez Perez G., Sharma A. K., Nesbø C. L., MacLeod D., Baptiste E., Doolittle W. F., Charlebois R. L., Legault B., Rodriguez-Valera F. The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005. № 102(50). p. 18147-18152.

546. Wijayasinghe Y. S., Tyagi A., Poddar N. K. Regulation of Cell Volume by Osmolytes // In: Singh L. R. and Dar T. A. (eds). Cellular Osmolytes. Springer, Singapore. 2017. P. 196-222.

547. Lucht J. M., Bremer E. Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU // FEMS microbiology reviews. 1994. № 14(1). P. 3-20.

548. Kraegeloh A., Kunte H. Novel insights into the role of potassium for osmoregulation in *Halomonas elongata* // *Extremophiles*. 2002. № 6(6). P. 453-462.

549. Kindzierski V., Raschke S., Knabe N., Siedler F., Scheffer B., Pflüger-Grau K., Pfeiffer F., Oesterhelt 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). P. 1-22.

550. Strom A. R., Kaasen I. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression // *Molecular microbiology*. 1993. № 8(2). P. 205-210.

551. Horlacher R., Xavier K. B., Santos H., DiRuggiero J., Kossmann M., Boos W. Archaeal binding protein-dependent ABC transporter: molecular and biochemical analysis of the trehalose/maltose transport system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* // *Journal of bacteriology*. 1998. № 180(3). P. 680-689.

552. Silva Z., Sampaio M. M., Henne A., Böhm A., Gutzat R., Boos W., da Costa M. S., Santos H. The high-affinity maltose/trehalose ABC transporter in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27 also recognizes sucrose and palatinose // *Journal of bacteriology*. 2005. № 187(4). P. 1210-1218.

553. Plourde-Owobi L., Durner S., Parrou J. L., Wieczorke R., Goma G., François J. *AGT1*, Encoding an α -Glucoside Transporter Involved in Uptake and Intracellular Accumulation of Trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of bacteriology*. 1999. № 181(12). P. 3830-3832.

554. Oren A. Bioenergetic aspects of halophilism // *Microbiology and molecular biology reviews*. 1999. № 63(2). P. 334-348.

555. Haardt M., Kempf B., Faatz E., Bremer E. The osmoprotectant proline betaine is a major substrate for the binding-protein-dependent transport system ProU of *Escherichia coli* K-12 // *Molecular and General Genetics MGG*. 1995. № 246(6). P. 783-796.

556. Farwick M., Siewe R. M., Krämer R. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum* // *Journal of bacteriology*. 1995. № 177(16). P. 4690-4695.

557. Peter H., Burkovski A., Krämer R. Isolation, characterization, and expression of the *Corynebacterium glutamicum betP* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine // *Journal of bacteriology*. 1996. № 178(17). P. 5229-5234.
558. Boch J., Kempf B., Bremer E. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline // *Journal of Bacteriology*. 1994. № 176(17). P. 5364-5371.
559. Kempf B., Bremer E. OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis* // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. № 270(28). P. 16701-16713.
560. Pflüger K., Müller V. Transport of compatible solutes in extremophiles // *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2004. № 36(1). P. 17-24.
561. Kunte H. J. Osmoregulation in bacteria: compatible solute accumulation and osmosensing // *Environmental Chemistry*. 2006. № 3(2). P. 94-99.
562. Gul N., Poolman B. Functional reconstitution and osmoregulatory properties of the ProU ABC transporter from *Escherichia coli* // *Molecular Membrane Biology*. 2013. № 30(2). P. 138-148.
563. Bouvier J., Bordes P., Romeo Y., Fourçans A., Bouvier I., Gutierrez C. Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of *Lactococcus lactis* // *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2000. № 2(2). P. 199-205.
564. Chen C., Beattie G. A. Characterization of the osmoprotectant transporter OpuC from *Pseudomonas syringae* and demonstration that cystathionine- β -synthase domains are required for its osmoregulatory function // *Journal of bacteriology*. 2007. № 189(19). P. 6901-6912.
565. Annamalai T., Venkitanarayanan K. Role of proP and proU in betaine uptake by *Yersinia enterocolitica* under cold and osmotic stress conditions // *Applied and environmental microbiology*. 2009. № 75(6). P. 1471-1477.
566. Schlegel K., Müller V. Osmoadaptation in methanogenic archaea: physiology, genetics, and regulation in *Methanosarcina mazei* Gö1 // In: Koki Horikoshi (eds). *Extremophiles handbook*. 2011. P. 327-342.

567. Schmidt S., Pflüger K., Kögl S., Spanheimer R., Müller V. The salt-induced ABC transporter Ota of the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 is a glycine betaine transporter // FEMS microbiology letters. 2007. № 277(1). P. 44-49.
568. Gudhka R. K., Neilan B. A., Burns B. P. Adaptation, ecology, and evolution of the halophilic stromatolite archaeon *Halococcus hamelinensis* inferred through genome analyses // Archaea. 2015. № 2015. P. 1-11.
569. MacMillan S. V., Alexander D. A., Culham D. E., Kunte H. J., Marshall E. V., Rochon D., Wood J. M. The ion coupling and organic substrate specificities of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1999. № 1420 (1-2). P. 30-44.
570. Tøndervik A., Strøm A. R. Membrane topology and mutational analysis of the osmotically activated BetT choline transporter of *Escherichia coli* // Microbiology. 2007. № 153(3). P. 803-813.
571. Ly A., Henderson J., Lu A., Culham D. E., Wood J. M. Osmoregulatory systems of *Escherichia coli*: identification of betaine-carnitine-choline transporter family member BetU and distributions of *betU* and *trkG* among pathogenic and nonpathogenic isolates // Journal of bacteriology. 2004. № 186(2). P. 296-306.
572. Lamark T., Styrvold O. B., Strøm A. R. Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli* // FEMS microbiology letters. 1992. № 96(2-3). P. 149-154.
573. Grammann K., Volke A., Kunte H. J. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581T // Journal of bacteriology. 2002. № 184(11). P. 3078-3085.
574. León M. J., Hoffmann T., Sánchez-Porro C., Heider J., Ventosa A., Bremer E. Compatible solute synthesis and import by the moderate halophile *Spiribacter salinus*: physiology and genomics // Frontiers in microbiology. 2018. № 9. P. 1-18.
575. Levina N., Töttemeyer S., Stokes N. R., Louis P., Jones M. A., Booth I. R. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and

MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity // The EMBO journal. 1999. № 18(7). P. 1730-1737.

576. Hofmeister F. Zur lehre von der wirkung der salze //Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 1888. № 25(1). P. 1-30.

577. Bolhuis A., Kwan, D., & Thomas, J. R. Halophilic adaptations of proteins // In: Khawar S. S. and Torsten T. (eds). Protein adaptation in extremophiles. Nova Biomedical Books, New York. 2008. P. 71-104.

578. Madern D., Ebel C., Zaccai G. Halophilic adaptation of enzymes // Extremophiles. 2000. № 4(2). P. 91-98.

579. Fukuchi S., Yoshimune K., Wakayama M., Moriguchi M., Nishikawa K. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria // Journal of molecular biology. 2003. № 327(2). P. 347-357.

580. Reed C. J., Lewis H., Trejo E., Winston V., Evilia C. Protein adaptations in archaeal extremophiles // Archaea. 2013. № 2013. P. 1-14.

581. Graziano G., Merlino A. Molecular bases of protein halotolerance // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. 2014. № 1844(4). P. 850-858.

582. DasSarma S., DasSarma P. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use // Current opinion in microbiology. 2015. № 25. P. 120-126.

583. Nath A. Insights into the sequence parameters for halophilic adaptation // Amino Acids. 2016. № 48(3). P. 751-762.

584. Lanyi J. K. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria // Bacteriological reviews. 1974. № 38(3). P. 272-290.

585. Frolov F., Harell M., Sussman J. L., Mevarech M., Shoham M. Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin // Nature structural biology. 1996. № 3(5). P. 452-458.

586. Britton K. L., Stillman T. J., Yip K. S., Forterre P., Engel P. C., Rice D. W. Insights into the molecular basis of salt tolerance from the study of glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum* // Journal of Biological Chemistry. 1998. № 273(15). P. 9023-9030.

587. Kastritis P. L., Papandreou N. C., Hamodrakas S. J. Haloadaptation: insights from comparative modeling studies of halophilic archaeal DHFRs // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007. № 41(4). P. 447-453.
588. Tadeo X., López-Méndez B., Trigueros T., Laín A., Castaño D., Millet O. Structural basis for the amino acid composition of proteins from halophilic archaea // *PLoS Biol*. 2009. № 7(12). P. 1-9.
589. Nayek A., Gupta P. S. S., Banerjee S., Mondal B., Bandyopadhyay A. K. Salt-bridge energetics in halophilic proteins // *Plos one*. 2014. № 9(4). P. 1-11.
590. Mevarech M., Frolow F., Gloss L. M. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt // *Biophysical chemistry*. 2000. № 86(2-3). P. 155-164.
591. Jones D. L., Baxter B. K. DNA repair and photoprotection: Mechanisms of overcoming environmental ultraviolet radiation exposure in halophilic archaea // *Frontiers in microbiology*. 2017. № 8. P. 1-16.
592. Kawanishi S., Hiraku T. Sequence-Specific DNA Damage Induced by UVA Radiation in the Presence of Endogenous and Exogenous Photosensitizers // In: Thiele J. and Elsner P. (eds). *Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology. Current Problems in Dermatology*. Basel: Karger. 2001. № 29. P. 74-82.
593. Chelikani P., Fita I., Loewen P. C. Diversity of structures and properties among catalases // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2004. № 61(2). P. 192-208.
594. Kirkman H. N., Gaetani G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries // *Trends in biochemical sciences*. 2007. № 32(1). P. 44-50.
595. Díaz A., Loewen P. C., Fita I., Carpena X. Thirty years of heme catalases structural biology // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012. № 525(2). P. 102-110.
596. von Ossowski I., Hausner G., Loewen P. C. Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase // *Journal of molecular evolution*. 1993. № 37(1). P. 71-76.
597. Klotz M. G., Loewen P. C. The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota

and from bacteria into eukaryota // *Molecular biology and evolution*. 2003. № 20(7). P. 1098-1112.

598. Singh R., Wiseman B., Deemagarn T., Jha V., Switala J., Loewen P. C. Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs) // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008. № 471(2). P. 207-214.

599. Faguy D. M. Horizontal transfer of catalase-peroxidase genes between archaea and pathogenic bacteria // *Trends Genet*. 2000. № 16. P. 196-197.

600. Passardi F., Zamocky M., Favet J., Jakopitsch C., Penel C., Obinger C., Dunand C. Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are there patches of order in chaos? // *Gene*. 2007. № 397(1-2). P. 101-113.

601. Shima S., Netrusov A., Sordel M., Wicke M., Hartmann G. C., Thauer R. K. Purification, characterization, and primary structure of a monofunctional catalase from *Methanosarcina barkeri* // *Archives of microbiology*. 1999. № 171(5). P. 317-323.

602. Shima S., Sordel-Klippert M., Brioukhanov A., Netrusov A., Linder D., Thauer R. K. Characterization of a Heme-Dependent Catalase from *Methanobrevibacter arboriphilus* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. № 67(7). P. 3041-3045.

603. Long S., Salin M. L. Archaeal promoter-directed expression of the *Halobacterium salinarum* catalase-peroxidase gene // *Extremophiles*. 2000. № 4 (6). P. 351-356.

604. Yamada Y., Saijo S., Sato T., Igarashi N., Usui H., Fujiwara T., Tanaka N. Crystallization and preliminary X-ray analysis of catalase-peroxidase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* // *Acta Crystallographica Section D*. 2001. № 57(8). P. 1157-1158.

605. Kengen S. W., Bikker F. J., Hagen W. R., Vos W. M., Oost J. Characterization of a catalase-peroxidase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus* // *Extremophiles*. 2001. № 5(5). P. 323-332.

606. Whittaker J. W. Non-heme manganese catalase—the ‘other’ catalase // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012. № 525(2). P. 111-120.

607. Zamocky M., Furtmüller P. G., Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans // *Antioxidants & redox signaling*. 2008. № 10(9). P. 1527-1548.
608. Ighodaro O. M., Akinloye O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid // *Alexandria journal of medicine*. 2018. № 54(4). P. 287-293.
609. Gill S. S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant physiology and biochemistry*. 2010. № 48(12). P. 909-930.
610. May B. P., Dennis P. P. Superoxide dismutase from the extremely halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum* // *Journal of bacteriology*. 1987. № 169(4). P. 1417-1422.
611. May B. P., Tam P., Dennis P. P. The expression of the superoxide dismutase gene in *Halobacterium cutirubrum* and *Halobacterium volcanii* // *Canadian Journal of Microbiology*. 1989. № 35(1). P. 171-175.
612. Daly M. J., Gaidamakova E. K., Matrosova V. Y., Vasilenko A., Zhai M., Venkateswaran A., Hess M., Omelchenko M. V., Kostandarithes H. M., Makarova K. S., Wackett L. P., Fredrickson J. K., Ghosal D. Accumulation of Mn (II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance // *Science*. 2004. № 306(5698). P. 1025-1028.
613. Fredrickson J. K., Shu-mei W. L., Gaidamakova E. K., Matrosova V. Y., Zhai M., Sulloway H. M., Scholten J. C., Brown M. G., Balkwill D. L., Daly M. J. Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? // *The ISME journal*. 2008. № 2(4). P. 393-403.
614. Kish A., Kirkali G., Robinson C., Rosenblatt R., Jaruga P., Dizdaroglu M., DiRuggiero J. Salt shield: intracellular salts provide cellular protection against ionizing radiation in the halophilic archaeon, *Halobacterium salinarum* NRC-1 // *Environmental Microbiology*. 2009. № 11(5). P. 1066-1078.
615. Sharma A., Gaidamakova E. K., Grichenko O., Matrosova V. Y., Hoeke V., Klimenkova P., Conze I. H., Volpe R. T., Tkavc R., Gostincar C., Gunde-Cimerman

N., DiRuggiero J., Shuryak I., Ozarowskii A., Hoffmann B. M., Daly M. J. Across the tree of life, radiation resistance is governed by antioxidant Mn^{2+} , gauged by paramagnetic resonance // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017. № 114(44). P. 1-8.

616. Webb K. M., DiRuggiero J. Role of Mn^{2+} and compatible solutes in the radiation resistance of thermophilic bacteria and archaea // Archaea. 2012. № 2012. P. 1-11.

617. Daly M. J., Gaidamakova E. K., Matrosova V. Y., Kiang J. G., Fukumoto R., Lee D. Y., Wehr N. B., Viteri G. A., Berlett B. S., Levine R. L. Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans* // PloS one. 2010. № 5(9). P. 1-15.

618. Robinson C. K., Webb K., Kaur A., Jaruga P., Dizdaroglu M., Baliga N. S., Place A., DiRuggiero J. A major role for nonenzymatic antioxidant processes in the radioresistance of *Halobacterium salinarum* // Journal of bacteriology. 2011. № 193(7). P. 1653-1662.

619. Webb K. M., Yu J., Robinson C. K., Noboru T., Lee Y. C., DiRuggiero J. Effects of intracellular Mn on the radiation resistance of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* // Extremophiles. 2013. № 17(3). P. 485-497.

620. Shahmohammadi H. R., Asgarani E., Terato H., Saito T., Ohyama Y., Gekko K., Yamamoto O., Ide H. Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of *Halobacterium salinarium* against DNA-damaging agents // Journal of radiation research. 1998. № 39(4). P. 251-262.

621. Ward J. F., Kuo I. Steady state and pulse radiolysis of aqueous chloride solutions of nucleic acid components // In: Hart E. J. (eds). Radiation Chemistry. American Chemical Society, Washington, D.C. 1968. P. 368-373.

622. Peng X., Xiong Y. L., Kong B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance // Food Chemistry. 2009. № 113(1). P. 196-201.

623. Sheih I. C., Wu T. K., Fang T. J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems // *Bioresource Technology*. 2009. № 100(13). P. 3419-3425.

624. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds). *Carotenoids. Volume 4: Natural Functions*. Birkhäuser Basel. 2008.

625. de Lourdes Moreno M., Sánchez-Porro C., García M. T., Mellado E. Carotenoids' production from halophilic bacteria // In: Barredo J. L. (eds). *Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae*. Humana Press, Totowa, NJ. 2012. P. 207-217.

626. Jehlička J., Edwards H. G. M., Oren A. Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic Archaea and Bacteria: a Raman spectroscopic study // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2013. № 106. P. 99-103.

627. de la Vega M., Sayago A., Ariza J., Barneto A. G., León R. Characterization of a bacterioruberin-producing Haloarchaea isolated from the marshlands of the Odiel river in the southwest of Spain // *Biotechnology Progress*. 2016. № 32(3). P. 592-600.

628. Giani M., Garbayo I., Vílchez C., Martínez-Espinosa R. M. Haloarchaeal carotenoids: healthy novel compounds from extreme environments // *Marine drugs*. 2019. № 17(9). P. 1-13.

629. Lazrak T., Wolff G., Albrecht A. M., Nakatani Y., Ourisson G., Kates M. Bacterioruberins reinforce reconstituted *Halobacterium* lipid membranes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1988. № 939(1). P. 160-162.

630. Rønnekleiv M., Lenes M., Norgård S., Liaaen-Jensen S. Three dodecaene C₅₀-carotenoids from halophilic bacteria // *Phytochemistry*. 1995. № 39(3). P. 631-634.

631. Rodrigo-Baños M., Garbayo I., Vílchez C., Bonete M. J., Martínez-Espinosa R. M. Carotenoids from *Haloarchaea* and their potential in biotechnology // *Marine Drugs*. 2015. № 13(9). P. 5508-5532.

632. Calegari-Santos R., Diogo R. A., Fontana J. D., Bonfim T. M. B. Carotenoid production by halophilic archaea under different culture conditions // Current microbiology. 2016. № 72(5). P. 641-651.
633. Heider S. A. E., Peters-Wendisch P., Wendisch V. F. Carotenoid biosynthesis and overproduction in *Corynebacterium glutamicum* // BMC microbiology. 2012. № 12(1). P. 1-11.
634. Henke N. A., Heider S. A., Peters-Wendisch P., Wendisch V. F. Production of the marine carotenoid astaxanthin by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* // Marine drugs. 2016. № 14(7). P. 1-21.
635. Tao L., Yao H., Cheng Q. Genes from a *Dietzia* sp. for synthesis of C₄₀ and C₅₀ β -cyclic carotenoids // Gene. 2007. № 386(12). P. 90-97.
636. Venugopalan V., Tripathi S. K., Nahar P., Saradhi P. P., Das R. H., Gautam H. K. Characterization of canthaxanthin isomers isolated from a new soil *Dietzia* sp. and their antioxidant activities // J. Microbiol. Biotechnol. 2013. № 23(2). P. 237-245.
637. Osawa A., Ishii Y., Sasamura N., Morita M., Kasai H., Maoka T., Shindo K. Characterization and antioxidative activities of rare C₅₀ carotenoids-sarcinaxanthin, sarcinaxanthin monoglucoside, and sarcinaxanthin diglucoside-obtained from *Micrococcus yunnanensis* // Journal of Oleo Science. 2010. № 59(12). P. 653-659.
638. Giuffrida D., Sutthiwong N., Dugo P., Donato P., Cacciola F., Girard-Valenciennes E., Mao Y. L., Monnet C., Fouillaud M., Caro Y., Dufossé L. Characterisation of the C₅₀ carotenoids produced by strains of the cheese-ripening bacterium *Arthrobacter arilaitensis* // International Dairy Journal. 2016. № 55. P. 10-16.
639. Walter M. H., Strack D. Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions // Natural product reports. 2011. № 28(4). P. 663-692.
640. Yang Y., Yatsunami R., Ando A., Miyoko N., Fukui T., Takaichi S., Nakamura S. Complete biosynthetic pathway of the C₅₀ carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica* // Journal of bacteriology. 2015. № 197(9). P. 1614-1623.

641. Dogbo O., Laferrière A., d'Harlingue A., Camara B. Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1988. № 85(19). P. 7054-7058.
642. Peck R. F., Echavarri-Erasun C., Johnson E. A., Ng W. V., Kennedy S. P., Hood L., DasSarma S., Krebs M. P. *brp* and *blh* are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in *Halobacterium salinarum* // Journal of Biological Chemistry. 2001. № 276(8). P. 5739-5744.
643. DasSarma S., Kennedy S. P., Berquist B., Ng W. V., Baliga N. S., Spudich J. L., Krebs M. P., Eisen J. A., Johnson C. H., Hood L. Genomic perspective on the photobiology of *Halobacterium* species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon // Photosynthesis Research. 2001. № 70(1). P. 3-17.
644. Paniagua-Michel J., Olmos-Soto J., Ruiz M. A. Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae // In: Barredo J. L. (eds). Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae. Humana Press, Totowa, NJ. 2012. P. 1-12.
645. Dummer A. M., Bonsall J. C., Cihla J. B., Lawry S. M., Johnson G. C., Peck R. F. Bacterioopsin-mediated regulation of bacterioruberin biosynthesis in *Halobacterium salinarum* // Journal of bacteriology. 2011. № 193(20). P. 5658-5667.
646. Dundas I. D., Larsen H. A study on the killing by light of photosensitized cells of *Halobacterium salinarium* // Archiv für Mikrobiologie. 1963. № 46(1). P. 19-28.
647. Rodriguez-Valera F., Albert F. J., Gibson J. Effect of light on growing and starved populations of extremely halophilic bacteria // FEMS Microbiology Letters. 1982. № 14(3). P. 155-158.
648. Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M., Rice-Evans C. A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls // FEBS letters. 1996. № 384(3). P. 240-242.
649. Fiedor J., Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease // Nutrients. 2014. № 6(2). P. 466-488.
650. Takaichi S., Shimada K. Characterization of carotenoids in photosynthetic bacteria // Methods in enzymology. Academic Press. 1992. № 213. P. 374-385.

651. El-Sayed W. S. M., Takaichi S., Saida H., Kamekura M., Abu-Shady M., Seki H., Kuwabara T. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids // *Plant and cell physiology*. 2002. № 43(4). P. 379-383.
652. Martin H. D., Ruck C., Schmidt M., Sell S., Beutner S., Mayer B., Walsh R. Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions // *Pure and applied chemistry*. 1999. № 71(12). P. 2253-2262.
653. El-Agamey A., Lowe G. M., McGarvey D. J., Mortensen A., Phillip D. M., Truscott T. G., Young A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2004. № 430(1). P. 37-48.
654. Kispert L. D., Konovalova T., Gao Y. Carotenoid radical cations and dications: EPR, optical, and electrochemical studies // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2004. № 430(1). P. 49-60.
655. Chen C. H., Han R. M., Liang R., Fu L. M., Wang, P., Ai X. C., Zhang J. P., Skibsted L. H. Direct observation of the β -carotene reaction with hydroxyl radical // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2011. № 115(9). P. 2082-2089.
656. Polyakov N. E., Focsan A. L., Bowman M. K., Kispert L. D. Free radical formation in novel carotenoid metal ion complexes of astaxanthin // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010. № 114(50). P. 16968-16977.
657. Khachik F., Beecher G. R., Smith Jr J. C. Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer // *Journal of Cellular Biochemistry*. 1995. № 59(S22). P. 236-246.
658. Aust O., Ale-Agha N., Zhang L., Wollersen H., Sies H., Stahl W. Lycopene oxidation product enhances gap junctional communication // *Food and Chemical Toxicology*. 2003. № 41(10). P. 1399-1407.
659. Kennedy T. A., Liebler D. C. Peroxyl radical oxidation of β -carotene: formation of β -carotene epoxides // *Chemical research in toxicology*. 1991. № 4(3). P. 290-295.

660. Stratton S. P., Schaefer W. H., Liebler D. C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene // Chemical research in toxicology. 1993. № 6(4). P. 542-547.
661. Kish A., DiRuggiero J. DNA replication and repair in halophiles // In: Vreeland R. H. (eds). Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms. Springer, Dordrecht. 2012. P. 163-198.
662. Cadet J., Sage E., Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA // Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2005. № 571(1-2). P. 3-17.
663. Brettel K., Byrdin M. Reaction mechanisms of DNA photolyase // Current opinion in structural biology. 2010. № 20(6). P. 693-701.
664. Gill S. S., Anjum N. A., Gill R., Jha M., Tuteja N. DNA damage and repair in plants under ultraviolet and ionizing radiations // The Scientific World Journal. 2015. № 2015. P. 1-11.
665. Liu Z., Wang L., Zhong D. Dynamics and mechanisms of DNA repair by photolyase // Physical Chemistry Chemical Physics. 2015. № 17(18). P. 11933-11949.
666. Sancar A. Mechanisms of DNA repair by photolyase and excision nuclease (Nobel Lecture) // Angewandte Chemie International Edition. 2016. № 55(30). P. 8502-8527.
667. McCready S., Marcello L. Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum* // Biochemical Society Transactions. 2003. № 31(3). P. 694-698.
668. Baliga N. S., Bjork S. J., Bonneau R., Pan M., Iloanusi C., Kottmann M. C., Hood L., DiRuggiero J. Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halobacterium* NRC-1 // Genome research. 2004. № 14(6). P. 1025-1035.
669. Reardon J. T., Sancar A. Nucleotide excision repair // Progress in nucleic acid research and molecular biology. 2005. № 79. P. 183-235.
670. Schäfer O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes // Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013. № 5(10). P. 1-20.

671. Kumar N., Raja S., Van Houten B. The involvement of nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA damage // *Nucleic Acids Research*. 2020. № 48(20). P. 11227-11243.
672. Truglio J. J., Croteau D. L., Van Houten B., Kisker C. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system // *Chemical reviews*. 2006. № 106(2). P. 233-252.
673. Kisker C., Kuper J., Van Houten B. Prokaryotic nucleotide excision repair // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013. № 5(3). P. 1-19.
674. Crowley D. J., Boubriak I., Berquist B. R., Clark M., Richard E., Sullivan L., DasSarma S., McCready S. The *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* genes are required for repair of ultraviolet light induced DNA photoproducts in *Halobacterium* sp. NRC-1 // *Saline systems*. 2006. № 2(1). P. 1-13.
675. Zhao A., Gray F. C., MacNeill S. A. ATP-and NAD⁺-dependent DNA ligases share an essential function in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* // *Molecular microbiology*. 2006. № 59(3). P. 743-752.
676. Savery N. J. The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair // *Trends in microbiology*. 2007. № 15(7). P. 326-333.
677. Hanawalt P. C., Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises // *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008. № 9(12). P. 958-970.
678. Ganesan A., Spivak G., Hanawalt P. C. Transcription-coupled DNA repair in prokaryotes // *Progress in molecular biology and translational science*. Academic Press. 2012. № 110. P. 25-40.
679. Stantial N., Dumpe J., Pietrosimone K., Baltazar F., Crowley D. J. Transcription-coupled repair of UV damage in the halophilic archaea // *DNA repair*. 2016. № 41. P. 63-68.
680. White M. F., Allers T. DNA repair in the Archaea—an emerging picture // *FEMS microbiology reviews*. 2018. № 42(4). P. 514-526.
681. Chatterjee N., Walker G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis // *Environmental and molecular mutagenesis*. 2017. № 58(5). P. 235-263.

682. Krokan H. E., Bjørås M. Base excision repair // Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013. № 5(4). P. 1-22.
683. Sage E., Harrison L. Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell survival // Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2011. № 711(1-2). P. 123-133.
684. Dudáš A., Chovanec M. DNA double-strand break repair by homologous recombination // Mutation Research. Reviews in Mutation Research. 2004. № 566(2). P. 131-167.
685. Li X., Heyer W. D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance // Cell research. 2008. № 18(1). P. 99-113.
686. Shuman S., Glickman M. S. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining // Nature Reviews Microbiology. 2007. № 5(11). P. 852-861.
687. Davis A. J., Chen D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining // Translational cancer research. 2013. № 2(3). P. 130-143.
688. Krebs J. E., Goldstein E. S., Kilpatrick S. T. Lewin's genes XII. Jones & Bartlett Learning, 2017.
689. Woods W. G., Dyll-Smith M. L. Construction and analysis of a recombination-deficient (*radA*) mutant of *Haloferax volcanii* // Molecular microbiology. 1997. № 23(4). P. 791-797.
690. Boubriak I., Ng W. L., DasSarma P., DasSarma S., Crowley D. J., McCready S. J. Transcriptional responses to biologically relevant doses of UV-B radiation in the model archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1 // Saline Systems. 2008. № 4 (1). P. 1-14.
691. Kish A., DiRuggiero J. Rad50 is not essential for the Mre11-dependent repair of DNA double-strand breaks in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 // Journal of bacteriology. 2008. № 190(15). P. 5210-5216.
692. DasSarma S., Capes M., DasSarma P. Haloarchaeal megaplasms // In: Schwartz E. (eds). Microbial megaplasms. Springer, Berlin, Heidelberg. 2009. P. 3-30.

693. Baliga N. S., Bonneau R., Facciotti M. T., Pan M., Glusman G., Deutsch E. W., Shannon P., Chiu Y., Weng R. S., Gan R. R., Hung P., Hung P., Date S. V., Marcotte E., Hood L., Ng W. V. Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea // *Genome research*. 2004. № 14(11). P. 2221-2234.
694. Ng W. V., Ciuffo S. A., Smith T. M., Bumgarner R. E., Baskin D., Faust J., Hall B., Loretz C., Seto J., Slagel J., Hood L., DasSarma S. Snapshot of a large dynamic replicon in a halophilic archaeon: megaplasmid or minichromosome? // *Genome research*. 1998. № 8(11). P. 1131-1141.
695. Hartman A. L., Norais C., Badger J. H., Delmas S., Haldenby S., Madupu R., Robinson J., Khouri H., Ren Q., Lowe T. M., Maupin-Furlow J., Pohlschroder M., Daniels C., Pfeiffer F., Allers T., Eisen J.A. The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon // *PloS one*. 2010. № 5(3). P. 1-20.
696. Han J., Zhang F., Hou J., Liu X., Li M., Liu H., Cai L., Zhang B., Chen Y., Zhou J., Hu S., Xiang H. Complete genome sequence of the metabolically versatile halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, a poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) producer // *Journal of Bacteriology*. 2012. № 194(16). P. 4463-4464.
697. Bolhuis H., Palm P., Wende A., Falb M., Rampp M., Rodriguez-Valera F., Pfeiffer F., Oesterhelt D. The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity // *BMC genomics*. 2006. № 7(1). P. 1-12.
698. López-García P., St Jean A., Amils R., Charlebois R. L. Genomic stability in the archaeae *Haloferax volcanii* and *Haloferax mediterranei* // *Journal of bacteriology*. 1995. № 177(5). P. 1405-1408.
699. Breuert S., Allers T., Spohn G., Soppa J. Regulated polyploidy in halophilic archaea // *PloS one*. 2006. № 1(1). P. 1-10.
700. Reeve J. N., Sandman K. Chromatin and regulation // In: Garrett R. and Klenk H. P. (eds). *Archaea. Evolution, Physiology, and Molecular Biology*. Blackwell Publishing Ltd. 2007. P. 147-158.
701. Mellor J. The dynamics of chromatin remodeling at promoters // *Molecular cell*. 2005. № 19(2). P. 147-157.

702. Xie Y., Reeve J. N. Transcription by an archaeal RNA polymerase is slowed but not blocked by an archaeal nucleosome // *Journal of bacteriology*. 2004. № 186(11). P. 3492-3498.
703. Falb M., Müller K., Königsmaier L., Oberwinkler T., Horn P., von Gronau S., Gonzalez O., Pfeiffer F., Bornberg-Bauer E., Oesterhelt D. Metabolism of halophilic archaea // *Extremophiles*. 2008. № 12(2). P. 177-196.
704. Gonzalez O., Gronau S., Falb M., Pfeiffer F., Mendoza E., Zimmer R., Oesterhelt D. Reconstruction, modeling & analysis of *Halobacterium salinarum* R-1 metabolism // *Molecular BioSystems*. 2008. № 4(2). P. 148-159.
705. Gonzalez O., Gronau S., Pfeiffer F., Mendoza E., Zimmer R., Oesterhelt D. Systems analysis of bioenergetics and growth of the extreme halophile *Halobacterium salinarum* // *PLoS Comput Biol*. 2009. № 5(4). P. 1-12.
706. Liu X. D., Wu C. W., Ding D. W. The structure and function of complex *Halobacterium salinarum* metabolic network // *International Journal of Physical Sciences*. 2010. № 5(11). P. 1744-1751.
707. Rosko A. S. Genome-wide Metabolic Reconstruction and Flux Balance Analysis Modeling of *Haloferax volcanii* : дис. – Duke University, 2018.
708. Kim B., Gadd G. Glycolysis // In: Kim B. and Gadd G. (eds). *Prokaryotic Metabolism and Physiology*. Cambridge: Cambridge University Press. 2019. P. 58-79.
709. Sakuraba H., Ohshima T. Novel energy metabolism in anaerobic hyperthermophilic archaea: a modified Embden-Meyerhof pathway // *Journal of bioscience and bioengineering*. 2002. № 93(5). P. 441-448.
710. Reher M., Gebhard S., Schönheit P. Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase (GAPOR) and nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN), key enzymes of the respective modified Embden–Meyerhof pathways in the hyperthermophilic crenarchaeota *Pyrobaculum aerophilum* and *Aeropyrum pernix* // *FEMS microbiology letters*. 2007. № 273(2). P. 196-205.
711. Rawal N. Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaeobacteria // *Ind. J. Biochem. Biophys.* 1988. № 25. P. 674-686.

712. Altekar W., Rangaswamy V. Degradation of endogenous fructose during catabolism of sucrose and mannitol in halophilic archaeobacteria // *Archives of microbiology*. 1992. № 158(5). P. 356-363.
713. Johnsen U., Selig M., Xavier K. B., Santos H., Schönheit P. Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus* // *Archives of microbiology*. 2001. № 175(1). P. 52-61.
714. Peekhaus N., Conway T. What's for dinner? Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli* // *Journal of bacteriology*. 1998. № 180(14). P. 3495-3502.
715. Ahmed H., Ettema T. J., Tjaden B., Geerling A. C., van der Oost J., Siebers B. The semi-phosphorylative Entner–Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation // *Biochemical Journal*. 2005. № 390(2). P. 529-540.
716. Kim B., Gadd G. Heterotrophic metabolism on substrates other than glucose // In: Kim B. and Gadd G. (eds). *Prokaryotic Metabolism and Physiology*. Cambridge: Cambridge University Press. 2019. P. 185-229.
717. Aitken D. M., Brown A. D. Citrate and glyoxylate cycles in the halophil, *Halobacterium salinarium* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1969. № 177(2). P. 351-354.
718. Rajagopalan R., Altekar W. Characterisation and purification of ribulose-bisphosphate carboxylase from heterotrophically grown halophilic archaeobacterium, *Haloferax mediterranei* // *European journal of biochemistry*. 1994. № 221(2). P. 863-869.
719. Sato T., Atomi H., Imanaka T. Archaeal type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism // *Science*. 2007. № 315(5814). P. 1003-1006.
720. Finn M. W., Tabita F. R. Modified pathway to synthesize ribulose 1,5-bisphosphate in methanogenic archaea // *Journal of bacteriology*. 2004. № 186(19). P. 6360-6366.
721. Nishihara M., Yamazaki T., Oshima T., Koga Y. sn-Glycerol-1-phosphate-forming activities in Archaea: separation of archaeal phospholipid biosynthesis and glycerol catabolism by glycerophosphate enantiomers // *Journal of bacteriology*. 1999. № 181(4). P. 1330-1333.

722. Kim B., Gadd G. Tricarboxylic acid (TCA) cycle, electron transport and oxidative phosphorylation // In: Kim B. and Gadd G. (eds). Prokaryotic Metabolism and Physiology. Cambridge: Cambridge University Press. 2019. P. 80-114.
723. Ghosh M., Sonawat H. M. Krebs' TCA cycle in *Halobacterium salinarum* investigated by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy // Extremophiles. 1998. № 2(4). P. 427-433.
724. Serrano J. A., Bonete M. J. Sequencing, phylogenetic and transcriptional analysis of the glyoxylate bypass operon (*ace*) in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression. 2001. № 1520(2). P. 154-162.
725. Kim B., Gadd G. Biosynthesis and growth // In: Kim B. and Gadd G. (eds). Prokaryotic Metabolism and Physiology. Cambridge: Cambridge University Press. 2019. P. 115-184.
726. Miziorko H. M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis // Archives of biochemistry and biophysics. 2011. № 505(2). P. 131-143.
727. Smit A., Mushegian A. Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in Archaea: the lost pathway // Genome Research. 2000. № 10(10). P. 1468-1484.
728. Boucher Y., Kamekura M., Doolittle W. F. Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea // Molecular microbiology. 2004. № 52(2). P. 515-527.
729. Vinokur J. M., Korman T. P., Cao Z., Bowie J. U. Evidence of a novel mevalonate pathway in archaea // Biochemistry. 2014. № 53 (25). P. 4161-4168.
730. Pugh E. L., Kates M. Acylation of proteins of the archaeobacteria *Halobacterium cutirubrum* and *Methanobacterium thermoautotrophicum* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1994. № 1196(1). P. 38-44.
731. Kolbe M., Besir H., Essen L. O., Oesterhelt D. Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution // Science. 2000. № 288(5470). P. 1390-1396.

732. Dibrova D. V., Galperin M. Y., Mulkidjanian A. Y. Phylogenomic reconstruction of archaeal fatty acid metabolism // *Environmental microbiology*. 2014. № 16(4). P. 907-918.
733. Cerletti M., Giménez M. I., Tröetschel C., D'Alessandro C., Poetsch A., De Castro R. E., Paggi R. A. Proteomic Study of the Exponential–Stationary Growth Phase Transition in the Haloarchaea *Natrialba magadii* and *Haloferax volcanii* // *Proteomics*. 2018. № 18(4). P. 1-10.
734. Ekiel I., Sprott G. D., Smith I. C. Mevalonic acid is partially synthesized from amino acids in *Halobacterium cutirubrum*: a ^{13}C nuclear magnetic resonance study // *Journal of bacteriology*. 1986. № 166(2). P. 559-564.
735. Bhaumik S. R., Sonawat H. M. Pyruvate metabolism in *Halobacterium salinarium* studied by intracellular ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Journal of bacteriology*. 1994. № 176(8). P. 2172-2176.
736. Engelhard M., Hess B., Emeis D., Metz G., Kreutz W., Siebert F. Magic angle sample spinning ^{13}C nuclear magnetic resonance of isotopically labeled bacteriorhodopsin // *Biochemistry*. 1989. № 28(9). P. 3967-3975.
737. Graupner M., White R. H. *Methanococcus jannaschii* Generates L-proline by Cyclization of L-ornithine // *Journal of bacteriology*. 2001. № 183(7). P. 5203-5205.
738. White R. H. The biosynthesis of cysteine and homocysteine in *Methanococcus jannaschii* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2003. № 1624(1-3). P. 46-53.
739. da Costa T. P. S., Abbott B. M., Gendall A. R., Panjikar S., Perugini M. A. Molecular evolution of an oligomeric biocatalyst functioning in lysine biosynthesis // *Biophysical Reviews*. 2018. № 10(2). P. 153-162.
740. Liu Y., White R. H., Whitman W. B. *Methanococci* use the diaminopimelate aminotransferase (DapL) pathway for lysine biosynthesis // *Journal of bacteriology*. 2010. № 192(13). P. 3304-3310.
741. Hochuli M., Patzelt H., Oesterhelt D., Wüthrich K., Szyperski T. Amino acid biosynthesis in the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica* // *Journal of bacteriology*. 1999. № 181(10). P. 3226-3237.

742. Plugge C. M., van Leeuwen J. M., Hummelen T., Balk M., Stams A. J. Elucidation of the pathways of catabolic glutamate conversion in three thermophilic anaerobic bacteria // Archives of microbiology. 2001. № 176(12). P. 29-36.
743. Hartmann R., Sickinger H. D., Oesterhelt D. Anaerobic growth of halobacteria // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1980. № 77(7). P. 3821-3825.
744. Ruepp A., Soppa J. Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarium* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the *arcRACB* gene cluster // Journal of bacteriology. 1996. № 178(16). P. 4942-4947.
745. Dundas I. E. D., Halvorson H. O. Arginine metabolism in *Halobacterium salinarium*, an obligately halophilic bacterium // Journal of bacteriology. 1966. № 91(1). P. 113-119.
746. Graham D. E., Xu H., White R. H. *Methanococcus jannaschii* uses a pyruvoyl-dependent arginine decarboxylase in polyamine biosynthesis // Journal of Biological Chemistry. 2002. № 277(26). P. 23500-23507.
747. Kasinathan V., Wingler A. Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana* // Physiologia Plantarum. 2004. № 121(1). P. 101-107.
748. Terui Y., Ohnuma M., Hiraga K., Kawashima E., Oshima T. Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* // Biochemical Journal. 2005. № 388(2). P. 427-433.
749. Maeda H., Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants // Annual review of plant biology. 2012. № 63. P. 73-105.
750. White R. H. L-Aspartate semialdehyde and a 6-deoxy-5-ketohexose 1-phosphate are the precursors to the aromatic amino acids in *Methanocaldococcus jannaschii* // Biochemistry. 2004. № 43(23). P. 7618-7627.
751. Stifel F. B., Herman R. H. Histidine metabolism // The American journal of clinical nutrition. 1971. № 24(2). P. 207-217.

752. Kezmarsky N. D., Xu H., Graham D. E., White R. H. Identification and characterization of a L-tyrosine decarboxylase in *Methanocaldococcus jannaschii* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2005. № 1722(2). P. 175-182.
753. Klare J. P., Chizhov I., Engelhard M. Microbial rhodopsins: scaffolds for ion pumps, channels, and sensors // In: Schäfer G. and Penefsky H. S. (eds). *Bioenergetics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 2007. P. 73-122.
754. Mukohata Y., Ihara K., Tamura T., Sugiyama Y. Halobacterial rhodopsins // *The Journal of Biochemistry*. 1999. № 125(4). P. 649-657.
755. Balashov S. P., Imasheva E. S., Boichenko V. A., Antón J., Wang J. M., Lanyi J. K. Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna // *Science*. 2005. № 309(5743). P. 2061-2064.
756. Sharma A. K., Spudich J. L., Doolittle W. F. Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility // *Trends in microbiology*. 2006. № 14(11). P. 463-469.
757. Jung K. H., Trivedi V. D., Spudich J. L. Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria // *Molecular microbiology*. 2003. № 47(6). P. 1513-1522.
758. Blaurock A. E., Stoeckenius W. Structure of the purple membrane // *Nature New Biology*. 1971. № 233(39). P. 152-155.
759. Matsuno-Yagi A., Mukohata Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation // *Biochemical and biophysical research communications*. 1977. № 78(1). P. 237-243.
760. Bogomolni R. A., Spudich J. L. Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982. № 79(20). P. 6250-6254.
761. Takahashi T., Tomioka H., Kamo N., Kobatake Y. A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium* // *FEMS microbiology letters*. 1985. № 28(2). P. 161-164.
762. Sasaki J., Brown L. S., Chon Y. S., Kandori H., Maeda A., Needleman R., Lanyi J. K. Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump // *Science*. 1995. № 269(5220). P. 73-75.

763. Casadio R., Gutowitz H., Mowery P., Taylor M., Stoeckenius W. Light-dark adaptation of bacteriorhodopsin in triton-treated purple membrane // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1980. № 590(1). P. 13-23.
764. Kouyama T., Bogomolni R. A., Stoeckenius W. Photoconversion from the light-adapted to the dark-adapted state of bacteriorhodopsin // *Biophysical journal*. 1985. № 48(2). P. 201-208.
765. Scherrer P., Mathew M. K., Sperling W., Stoeckenius W. Retinal isomer ratio in dark-adapted purple membrane and bacteriorhodopsin monomers // *Biochemistry*. 1989. № 28(2). P. 829-834.
766. Dencher N. A. The five retinal-protein pigments of halobacteria: bacteriorhodopsin, halorhodopsin, P 565, P 370, and slow-cycling rhodopsin // *Photochemistry and photobiology*. 1983. № 38(6). P. 753-768.
767. Zimányi L., Lanyi J. K. Fourier transform Raman study of retinal isomeric composition and equilibration in halorhodopsin // *The Journal of Physical Chemistry B*. 1997. № 101(10). P. 1930-1933.
768. Lozier R. H., Bogomolni R. A., Stoeckenius W. Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium* // *Biophysical journal*. 1975. № 15(9). P. 955-962.
769. Varo G., Lanyi J. K. Thermodynamics and energy coupling in the bacteriorhodopsin photocycle // *Biochemistry*. 1991. № 30(20). P. 5016-5022.
770. Lanyi J. K. Bacteriorhodopsin // *Annu. Rev. Physiol.* 2004. № 66. P. 665-688.
771. Lanyi J. K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2006. № 1757(8). P. 1012-1018.
772. Stoeckenius W., Lozier R. H., Bogomolni R. A. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*. 1979. № 505(3-4). P. 215-278.
773. Stoeckenius W., Bogomolni R. A. Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria // *Annual review of biochemistry*. 1982. № 51(1). P. 587-616.

774. Ram-Mohan N., Oren A., Papke R. T. Analysis of the bacteriorhodopsin-producing haloarchaea reveals a core community that is stable over time in the salt crystallizers of Eilat, Israel // *Extremophiles*. 2016. № 20(5). P. 747-757.

775. Kanekar P. P., Kulkarni S. O., Dhakephalkar P. K., Kulkarni K. G., Saxena N. Isolation of a halophilic, bacteriorhodopsin-producing archaeon, *Haloferax larsenii* RG3D.1 from the Rocky Beach of Malvan, West Coast of India // *Geomicrobiology Journal*. 2017. № 34(3). P. 242-248.

776. Ispirli N. H., Gulluce M., Karadayi M., Demir A. Y. Culturable bacteriorhodopsin-producing haloarchaea of Tuz Lake (Turkey) // *Geomicrobiology Journal*. 2019. № 36(9). P. 831-836.

777. Henderson R. The structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium*: analysis of the X-ray diffraction pattern // *Journal of molecular biology*. 1975. № 93 (2). P. 123-138.

778. Henderson R., Baldwin J. M., Downing K. H., Lepault J., Zemlin F. Structure of purple membrane from *Halobacterium halobium*: recording, measurement and evaluation of electron micrographs at 3.5 Å resolution // *Ultramicroscopy*. 1986. № 19(2). P. 147-178.

779. Kushwaha S. C., Kates M., Martin W. G. Characterization and composition of the purple and red membrane from *Halobacterium cutirubrum* // *Canadian journal of biochemistry*. 1975. № 53(3). P. 284-292.

780. Rogers P. J., Morris C. A. Regulation of bacteriorhodopsin synthesis by growth rate in continuous cultures of *Halobacterium halobium* // *Archives of Microbiology*. 1978. № 119(3). P. 323-325.

781. Betlach M., Friedman J., Boyer H. W., Pfeifer F. Characterization of a halobacterial gene affecting bacterio-opsin gene expression // *Nucleic acids research*. 1984. № 12(20). P. 7949-7959.

782. Betlach M. C., Shand R. F., Leong D. M. Regulation of the bacterio-opsin gene of a halophilic archaebacterium // *Canadian Journal of Microbiology*. 1989. № 35(1). P. 134-140.

783. Shand R. F., Betlach M. C. Expression of the *bop* gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light // Journal of bacteriology. 1991. № 173(15). P. 4692-4699.

784. Gropp F., Betlach M. C. The *bat* gene of *Halobacterium halobium* encodes a trans-acting oxygen inducibility factor // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1994. № 91(12). P. 5475-5479.

785. Deshpande A., Sonar S. Bacterioopsin-triggered retinal biosynthesis is inhibited by bacteriorhodopsin formation in *Halobacterium salinarium* // Journal of Biological Chemistry. 1999. № 274(33). P. 23535-23540.

786. Baliga N. S., Kennedy S. P., Ng W. V., Hood L., DasSarma S. Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. № 98(5). P. 2521-2525.

787. Jarrell K. F., Ng S. Y. M., Chaban B. Flagellation and chemotaxis // In: Cavicchioli R. (eds). Archaea. Molecular and cellular biology. ASM Press, Washington, DC. 2007. P. 385-410.

788. Szurmant H., Ordal G. W. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea // Microbiology and molecular biology reviews. 2004. № 68(2). P. 301-319.

789. Falb M., Pfeiffer F., Palm P., Rodewald K., Hickmann V., Tittor J., Oesterhelt D. Living with two extremes: conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis* // Genome research. 2005. № 15(10). P. 1336-1343.

790. Orekhov P. S., Klose D., Mulkidjanian A. Y., Shaitan K. V., Engelhard M., Klare J. P., Steinhoff H. J. Signaling and adaptation modulate the dynamics of the photosensory complex of *Natronomonas pharaonis* // PLoS Comput Biol. 2015. № 11(10). P. 1-22.

791. Storch K. F., Rudolph J., Oesterhelt D. Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarum* // The EMBO Journal. 1999. № 18(5). P. 1146-1158.

792. Kokoeva M. V., Oesterhelt D. BasT, a membrane-bound transducer protein for amino acid detection in *Halobacterium salinarum* // Molecular microbiology. 2000. № 35(3). P. 647-656.
793. Kokoeva M. V., Storch K. F., Klein C., Oesterhelt D. A novel mode of sensory transduction in archaea: binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids // The EMBO Journal. 2002. № 21(10). P. 2312-2322.
794. Yu H. S., Saw J. H., Hou S., Larsen R. W., Watts K. J., Johnson M. S., Zimmer M. A., Ordal G. W., Taylor B. L., Alam M. Aerotactic responses in bacteria to photoreleased oxygen // FEMS microbiology letters. 2002. № 217(2). P. 237-242.
795. Nutsch T., Marwan W., Oesterhelt D., Gilles E. D. Signal processing and flagellar motor switching during phototaxis of *Halobacterium salinarum* // Genome research. 2003. № 13(11). P. 2406-2412.
796. Gordeliy V. I., Labahn J., Moukhametzianov R., Efremov R., Granzin J., Schlesinger R., Buldt G., Savopol T., Scheidig A. J., Klare J. P., Engelhard M. Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II–transducer complex // Nature. 2002. № 419(6906). P. 484-487.
797. Chen X., Spudich J. L. Five residues in the HtrI transducer membrane-proximal domain close the cytoplasmic proton-conducting channel of sensory rhodopsin I // Journal of Biological Chemistry. 2004. № 279(41). P. 42964-42969.
798. Zhang W., Brooun A., McCandless J., Banda P., Alam M. Signal transduction in the archaeon *Halobacterium salinarium* is processed through three subfamilies of 13 soluble and membrane-bound transducer proteins // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996. № 93(10). P. 4649-4654.
799. Koch M. K., Oesterhelt D. MpcT is the transducer for membrane potential changes in *Halobacterium salinarum* // Molecular microbiology. 2005. № 55(6). P. 1681-1694.
800. Brooun A., Zhang W., Alam M. Primary structure and functional analysis of the soluble transducer protein HtrXI in the archaeon *Halobacterium salinarium* // Journal of bacteriology. 1997. № 179(9). P. 2963-2968.

801. Bibikov S. I., Skulachev V. P. Mechanisms of phototaxis and aerotaxis in *Halobacterium halobium* // FEBS letters. 1989. № 243(2). P. 303-306.
802. Brooun A., Bell J., Freitas T., Larsen R. W., Alam M. An archaeal aerotaxis transducer combines subunit I core structures of eukaryotic cytochrome c oxidase and eubacterial methyl-accepting chemotaxis proteins // Journal of bacteriology. 1998. № 180(7). P. 1642-1646.
803. Hou S., Larsen R. W., Boudko D., Riley C. W., Karatan E., Zimmer M., Orda G. W., Alam M. Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria // Nature. 2000. № 403(6769). P. 540-544.
804. Margesin R., Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology // Extremophiles. 2001. № 5(2). P. 73-83.
805. DasSarma P., Coker J. A., Huse V., DasSarma S. Halophiles, industrial applications // In: Flickinge M. C. (eds). Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. John Wiley & Sons, Inc. 2009. P. 1-43.
806. Litchfield C. D. Potential for industrial products from the halophilic Archaea // Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2011. № 38(10). P. 1635-1647.
807. Yin J., Chen J. C., Wu Q., Chen G. Q. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology // Biotechnology advances. 2015. № 33(7). P. 1433-1442.
808. Charlesworth J. C., Burns B. P. Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea // Archaea. 2015. № 2015. P. 1-7.
809. Waditee-Sirisattha R., Kageyama H., Takabe T. Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology // AIMS Microbiol. 2016. № 2(1). P. 42-54.
810. Singh A., Singh A. K. Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential // Biotechnology letters. 2017. № 39(12). P. 1793-1800.
811. Zhang X., Lin Y., Chen G. Q. Halophiles as chassis for bioproduction // Advanced Biosystems. 2018. № 2(11). P. 1-12.

812. Saisithi P. Traditional fermented fish: fish sauce production // In: Martin A. M. (eds). Fisheries processing. Springer, Boston, MA. 1994. P. 111-131.
813. Beddows C. G. Fermented fish and fish products // In: Wood B. J. B. (eds). Microbiology of Fermented Foods. Thomson Science. 1998. P. 416-440
814. Lopetcharat K., Choi Y. J., Park J. W., Daeschel M. A. Fish sauce products and manufacturing: a review // Food Reviews International. 2001. № 17(1). P. 65-88.
815. Thapa N. Ethnic fermented and preserved fish products of India and Nepal // Journal of Ethnic Foods. 2016. № 3(1). P. 69-77.
816. Koo O. K., Lee S. J., Chung K. R., Jang D. J., Yang H. J., Kwon D. Y. Korean traditional fermented fish products: jeotgal // Journal of Ethnic Foods. 2016. № 3(2). P. 107-116.
817. Saisithi P., Kasemsarn R. O., Liston J., Dollar A. M. Microbiology and chemistry of fermented fish // Journal of Food Science. 1966. № 31(1). P. 105-110.
818. Fukui Y., Yoshida M., Shozen K. I., Funatsu Y., Takano T., Oikawa H., Yano Y., Satomi M. Bacterial communities in fish sauce mash using culture-dependent and-independent methods // The Journal of general and applied microbiology. 2012. № 58(4). P. 273-281.
819. Lee H. S. Diversity of halophilic archaea in fermented foods and human intestines and their application // J Microbiol Biotechnol. 2013. № 23(12). P. 1645-1653.
820. Majumdar R. K., Roy D., Bejjanki S., Bhaskar N. Chemical and microbial properties of shidal, a traditional fermented fish of Northeast India // Journal of Food science and Technology. 2016. № 53(1). P. 401-410.
821. Shivanne Gowda S. G., Narayan B., Gopal S. Bacteriological properties and health-related biochemical components of fermented fish sauce: An overview // Food Reviews International. 2016. № 32(2). P. 203-229.
822. Jiang S., Ma C., Peng Q., Huo D., Li W., Zhang J. Microbial profile and genetic polymorphism of predominant species in some traditional fermented seafoods of the Hainan area in China // Frontiers in Microbiology. 2019. № 10. P. 1-12.

823. Henriot O., Fourmentin J., Delincé B., Mahillon J. Exploring the diversity of extremely halophilic archaea in food-grade salts // International journal of food microbiology. 2014. № 191. P. 36-44.

824. Yachai M., Tanasupawat S., Itoh T., Benjakul S., Visessanguan W., Valyasevi R. *Halobacterium piscisalsi* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № 58(9). P. 2136-2140.

825. Minegishi H, Echigo A, Shimane Y, Kamekura M, Tanasupawat S, Visessanguan W, Usami R. *Halobacterium piscisalsi* Yachai et al. 2008 is a later heterotypic synonym of *Halobacterium salinarum* Elazari-Volcani 1957 // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2012. № 62(9). P. 2160-2162.

826. Namwong S., Tanasupawat S., Kudo T., Itoh T. *Haloarcula salaria* sp. nov. and *Haloarcula tradensis* sp. nov., isolated from salt in Thai fish sauce // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2011. № 61(2). P. 231-236.

827. Namwong S., Tanasupawat S., Visessanguan W., Kudo T., Itoh T. *Halococcus thailandensis* sp. nov., from fish sauce in Thailand // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. № 57(10). P. 2199-2203.

828. Roh S. W., Kim K. H., Nam Y. D., Chang H. W., Park E. J., Bae J. W. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing // The ISME journal. 2010. № 4(1). P. 1-16.

829. Roh S. W., Nam Y. D., Chang H. W., Sung Y., Kim K. H., Oh H. M., Bae J. W. *Halalkalicoccus jeotgali* sp. nov., a halophilic archaeon from shrimp jeotgal, a traditional Korean fermented seafood // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. № 57(10). P. 2296-2298.

830. Roh S. W., Bae J. W. *Halorubrum cibi* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from salt-fermented seafood // The Journal of Microbiology. 2009. № 47(2). P. 162-166.

831. Roh S. W., Nam Y. D., Chang H. W., Kim K. H., Sung Y., Kim M. S., Oh H. M., Bae J. W. *Haloterrigena jeotgali* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from

salt-fermented food // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. № 59(9). P. 2359-2363.

832. Roh S. W., Nam Y. D., Chang H. W., Sung Y., Kim K. H., Lee H. J., Oh H. M., Bae J. *Natronococcus jeotgali* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from shrimp jeotgal, a traditional fermented seafood from Korea // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. № 57(9). P. 2129-2131.

833. Tapingkae W., Tanasupawat S., Itoh T., Parkin K. L., Benjakul S., Visessanguan W., Valyasevi R. *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № 58(10). P. 2378-2383.

834. Sanni A. I., Asiedu M., Ayernor G. S. Microflora and chemical composition of momoni, a Ghanaian fermented fish condiment // Journal of Food Composition and Analysis. 2002. № 15(5). P. 577-583.

835. Fukami K., Funatsu Y., Kawasaki K., Watabe S. Improvement of fish-sauce odor by treatment with bacteria isolated from the fish-sauce mush (moromi) made from frigate mackerel // Journal of food science. 2004. № 69(2). P. 1-5.

836. Ishikawa M. Tanasupawat S., Nakajima K., Kanamori H., Ishizaki S., Kodama K., Okamoto-Kainuma A., Koizumi Y., Yamamoto Y., Yamasato K. *Alkalibacterium thalassium* sp. nov., *Alkalibacterium pelagium* sp. nov., *Alkalibacterium putridalgicola* sp. nov. and *Alkalibacterium kapii* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolated from marine organisms and salted foods collected in Japan and Thailand // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. № 59(5). P. 1215-1226.

837. Taira W., Funatsu Y., Satomi M., Takano T., Abe H. Changes in extractive components and microbial proliferation during fermentation of fish sauce from underutilized fish species and quality of final products // Fisheries Science. 2007. № 73(4). P. 913-923.

838. Maintz L., Novak N. Histamine and histamine intolerance // The American journal of clinical nutrition. 2007. № 85(5). P. 1185-1196.

839. Feng C., Teuber S., Gershwin M. E. Histamine (scombroid) fish poisoning: a comprehensive review // *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2016. № 50(1). P. 64-69.
840. Tapingkae W., Tanasupawat S., Parkin K. L., Benjakul S., & Visessanguan W. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products // *Enzyme and Microbial Technology*. 2010. № 46(2). P. 92-99.
841. Visessanguan W., Benjakul S., Smitinont T., Kittikun C., Thepkasikul P., Panya A. Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham inoculated with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus* // *LWT-Food Science and Technology*. 2006. № 39(7). P. 814-826.
842. Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattanachant S., Benjakul S., Tani A., Maneerat S. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains // *Food Control*. 2011. № 22(3-4). P. 401-407.
843. Shand R. F., Leyva K. J. Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfolobocins // In: Riley M. A. and Chavan M. A. (eds). *Bacteriocins*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2007. P. 93-109.
844. Bindiya E. S., Bhat S. G. Marine bacteriocins: A review // *J Bacteriol Mycol Open Access*. 2016. № 2(5). P. 1-9.
845. Gildberg A., Thongthai C. The effect of reduced salt content and addition of halophilic lactic acid bacteria on quality and composition of fish sauce made from sprat // *Journal of aquatic food Product Technology*. 2001. № 10(1). P. 77-88.
846. Yongsawatdigul J., Rodtong S., Raksakulthai N. Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures // *Journal of Food Science*. 2007. № 72(9). P. 382-390.
847. Bernbom N., Ng, Y. Y., Paludan-Müller, C., & Gram, L. Survival and growth of *Salmonella* and *Vibrio* in som-fak, a Thai low-salt garlic containing fermented fish product // *International journal of food microbiology*. 2009. № 134(3). P. 223-229.

848. Saithong P., Panthavee W., Boonyaratanakornkit M., Sikkhamondhol C. Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaa-som, a Thai fermented fish // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2010. № 110(5). P. 553-557.
849. Yoshikawa S., Kurihara H., Kawai Y., Yamazaki K., Tanaka A., Nishikiori T., Ohta T. Effect of halotolerant starter microorganisms on chemical characteristics of fermented chum salmon (*Oncorhynchus keta*) sauce // Journal of agricultural and food chemistry. 2010. № 58(10). P. 6410-6417.
850. Udomsil N., Rodtong S., Tanasupawat S., Yongsawatdigul J. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds // International Journal of Food Microbiology. 2010. № 141(3). P. 186-194.
851. Zaman M. Z., Bakar F. A., Jinap S., Bakar J. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation // International journal of food microbiology. 2011. № 145(1). P. 84-91.
852. Sinsuwan S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. Hydrolytic activity of *Virgibacillus* sp. SK37, a starter culture of fish sauce fermentation, and its cell-bound proteinases // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2012. № 28(8). P. 2651-2659.
853. Akolkar A. V., Durai D., Desai A. J. *Halobacterium* sp. SP1 (1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation // Journal of Applied Microbiology. 2010. № 109(1). P. 44-53.
854. Ward O. P. Proteases // Comprehensive Biotechnology. 2011. P. 571-582.
855. Mienda B. S., Yahya A., Galadima I. A., Shamsir M. S. An overview of microbial proteases for industrial applications // Res J Pharm Biol Chem Sci. 2014. № 5(1). P. 388-396.
856. Białkowska A., Gromek E., Florczak T., Krysiak J., Szulczewska K., Turkiewicz M. Extremophilic proteases: Developments of their special functions, potential resources and biotechnological applications // In: Rampelotto P. H. (ed). Biotechnology of Extremophiles. Grand Challenges in Biology and Biotechnology/ Springer, Cham. 2016. P. 399-444.

857. EC 3.4 [Электронный ресурс] // International Union of Biochemistry and Molecular Biology: [Сайт]. URL: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/4/> (дата обращения: 01.12.2020).

858. Elleuche S., Schroeder C., Sahn K., Antranikian G. Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms // *Current opinion in biotechnology*. 2014. № 29. P. 116-123.

859. Dumorné K., Córdova D. C., Astorga-Eló M., Renganathan P. Extremozymes: a potential source for industrial applications // *J Microbiol Biotechnol*. 2017. № 27(4). P. 649-659.

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

861. Jin M., Gai Y., Guo X., Hou Y., Zeng R. Properties and applications of extremozymes from deep-sea extremophilic microorganisms: A mini review // *Marine drugs*. 2019. № 17(12). P. 1-16.

862. Vidyasagar M., Prakash S., Litchfield C., Sreeramulu K. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101 // *Archaea*. 2006. № 2(1). P. 51-57.

863. Shi W., Tang X. F., Huang Y., Gan F., Tang B., Shen P. An extracellular halophilic protease SptA from a halophilic archaeon *Natrinema* sp. J7: gene cloning, expression and characterization // *Extremophiles*. 2006. № 10(6). P. 599-606.

864. Izotova L. S., Strongin A. Y., Chekulaeva L. N., Sterkin V. E., Ostoslavskaya V. I., Lyublinskaya L. A., Timokhina E. A., Stepanov V. M. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium* // *Journal of bacteriology*. 1983. № 155(2). P. 826-830.

865. Kamekura M., Seno Y., Dyll-Smith M. Halolysin R4, a serine proteinase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*; gene cloning, expression and structural studies // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1996. № 1294(2). P. 159-167.

866. de Lourdes Moreno M., Pérez D., García M. T., Mellado E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes // *Life*. 2013. № 3(1). P. 38-51.
867. Vidyasagar M., Prakash S., Mahajan V., Shouche Y. S., Sreeramulu K. Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101 // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009. № 40(1). P. 12-19.
868. Karan R., Khare S. K. Purification and characterization of a solvent-stable protease from *Geomicrobium* sp. EMB2 // *Environmental technology*. 2010. № 31(10). P. 1061-1072.
869. Maurer K. H. Detergent proteases // *Current opinion in Biotechnology*. 2004. № 15(4). P. 330-334.
870. Ferrero M. A., Castro G. R., Abate C. M., Baigori M. D., Sineriz F. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996. № 45(3). P. 327-332.
871. Sellami-Kamoun A., Haddar A., Ali N. E. H., Ghorbel-Frikha B., Kanoun S., Nasri M. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations // *Microbiological Research*. 2008. № 163(3). P. 299-306.
872. Hmidet N., Ali N. E. H., Haddar A., Kanoun S., Alya S. K., Nasri M. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive // *Biochemical Engineering Journal*. 2009. № 47(1-3). P. 71-79.
873. Sinha R., Khare S. K. Isolation of a halophilic *Virgibacillus* sp. EMB13: characterization of its protease for detergent application // *Indian Journal of Biotechnology*. 2012. № 11. P. 416-426.
874. Sinha R., Khare S. K. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: differential role of metal ions in stability and activity // *Bioresource technology*. 2013. № 145. P. 357-361.

875. Bajpai B., Chaudhary M., Saxena J. Production and characterization of α -amylase from an extremely halophilic archaeon, *Haloferax* sp. HA10 // Food technology and biotechnology. 2015. № 53(1). P. 11-17.

876. Janeček Š. α -Amylases from Archaea: sequences, structures and evolution // In: Rampelotto P. H. (ed.) Biotechnology of Extremophiles, Grand Challenges in Biology and Biotechnology. Springer, Cham. 2016. P. 505-524.

877. Enache M., Kamekura M. Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values // Rom J Biochem. 2010. № 47(1). P. 46-59.

878. Torregrosa-Crespo J., Pire Galiana C., Martínez-Espinosa R. M. Biocompounds from Haloarchaea and their uses in biotechnology // In: Sghaier H., Najjari A. and Ghedira K. (eds). Archaea - New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications. InTech. 2017. P. 63-82.

879. Janeček Š., Svensson B., MacGregor E. A. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases // Cellular and molecular life sciences. 2014. № 71(7). P. 1149-1170.

880. Glycoside Hydrolase Family 13 [Электронный ресурс] // Carbohydrate-Active enZYmes Database: [Сайт]. URL: <http://www.cazy.org/GH13.html> (дата обращения: 01.12.2020).

881. Kobayashi T., Kanai H., Hayashi T., Akiba T., Akaboshi R., Horikoshi K. Haloalkaliphilic maltotriose-forming alpha-amylase from the archaeobacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36 // Journal of bacteriology. 1992. № 174(11). P. 3439-3444.

882. Kobayashi T., Kanai H., Aono R., Horikoshi K., Kudo T. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the alpha-amylase gene from the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus* sp. strain Ah-36 // Journal of bacteriology. 1994. № 176(16). P. 5131-5134.

883. Onodera M., Yatsunami R., Tsukimura W., Fukui T., Nakasone K., Takashina T., Nakamura S. Gene analysis, expression, and characterization of an intracellular α -amylase from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica* // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2013. № 77(2). P. 281-288.

884. Lei Y., Peng H., Wang Y., Liu Y., Han F., Xiao Y., Gao Y. Preferential and rapid degradation of raw rice starch by an α -amylase of glycoside hydrolase subfamily GH13_37 // *Applied microbiology and biotechnology*. 2012. № 94(6). P. 1577-1584.
885. Good W. A., Hartman P. A. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium* // *Journal of Bacteriology*. 1970. № 104(1). P. 601-603.
886. Perez-Pomares F. et al. α -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* // *Extremophiles*. – 2003. – T. 7. – №. 4. – C. 299-306.
887. Pérez-Pomares F., Bautista V., Ferrer J., Pire C., Marhuenda-Egea F. C., Bonete M. J. Identification of several intracellular carbohydrate-degrading activities from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* // *Extremophiles*. 2009. № 13(4). P. 633-641.
888. Hutcheon G. W., Vasisht N., Bolhuis A. Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica* // *Extremophiles*. 2005. № 9(6). P. 487-495.
889. Coronado M. J., Vargas C., Hofemeister J., Ventosa A., Nieto J. J. Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana* // *FEMS microbiology letters*. 2000. № 183(1). P. 67-71.
890. Shafiei M., Ziaee A. A., Amoozegar M. A. Purification and characterization of a halophilic α -amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F // *Extremophiles*. 2012. № 16(4). P. 627-635.
891. Li X., Yu H. Y. Characterization of an organic solvent-tolerant α -amylase from a halophilic isolate, *Thalassobacillus* sp. LY18 // *Folia microbiologica*. 2012. № 57(5). P. 447-453.
892. Pandey S., Singh S. P. Organic solvent tolerance of an α -amylase from haloalkaliphilic bacteria as a function of pH, temperature, and salt concentrations // *Applied biochemistry and biotechnology*. 2012. № 166(7). P. 1747-1757.

893. Suriya J., Bharathiraja S., Krishnan M., Manivasagan P., Kim S. K. Marine Microbial Amylases: Properties and Applications // Advances in food and nutrition research. Academic Press. 2016. № 79. P. 161-177.
894. Li X., Yu H. Y. Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9 // Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2011. № 38(11). P. 1837-1843.
895. Li X., Yu H. Y. Purification and characterization of novel organic-solvent-tolerant β -amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20 // FEMS microbiology letters. 2012. № 329(2). P. 204-211.
896. Siroosi M., Amoozgar M. A., Khajeh K., Fazeli M., Rezaei M. H. Purification and characterization of a novel extracellular halophilic and organic solvent-tolerant amylopullulanase from the haloarchaeon, *Halorubrum* sp. strain Ha25 // Extremophiles. 2014. № 18(1). P. 25-33.
897. Mesbah N. M., Wiegel J. Biochemical characterization of halophilic, alkalithermophilic amylopullulanase PulD7 and truncated amylopullulanases PulD7 Δ N and PulD7 Δ C // International journal of biological macromolecules. 2018. № 111. P. 632-638.
898. Yu H. Y., Li X. Characterization of an organic solvent-tolerant thermostable glucoamylase from a halophilic isolate, *Halolactibacillus* sp. SK 71 and its application in raw starch hydrolysis for bioethanol production // Biotechnology progress. 2014. № 30(6). P. 1262-1268.
899. de Souza P. M., de Oliveira e Magalhães P. Application of microbial α -amylase in industry - A review // Brazilian journal of microbiology. 2010. № 41(4). P. 850-861.
900. Mobini-Dehkordi M., Javan F. A. Application of alpha-amylase in biotechnology // J. Biol. today's world. 2012. № 1. P. 39-50.
901. Sundarram A., Murthy T. P. K. α -amylase production and applications: a review // Journal of Applied & Environmental Microbiology. 2014. № 2(4). P. 166-175.

902. Bagai R., Madamwar D. Continuous production of halophilic α -amylase through whole cell immobilization of *Halobacterium salinarium* // Applied biochemistry and biotechnology. 1997. № 62(2-3). P. 213-218.
903. Cobucci-Ponzano B., Ionata E., La Cara F., Morana A., Ferrara M. C., Maurelli L., Strazzulli A., Giglio R., Moracci M. Extremophilic (hemi)cellulolytic microorganisms and enzymes // In: Faraco V. (ed). Lignocellulose Conversion. Springer, Berlin, Heidelberg. 2013. P. 111-130.
904. Zverlov V. V., Köck D. E., Schwarz W. H. The role of cellulose-hydrolyzing bacteria in the production of biogas from plant biomass // In: Kamm B. (ed). Microorganisms in biorefineries. Springer, Berlin, Heidelberg. 2015. P. 335-361.
905. Sadhu S., Maiti T. K. Cellulase production by bacteria: a review // Microbiology Research Journal International. 2013. № 3(3). P. 235-258.
906. Saha B. C. Hemicellulose bioconversion // Journal of industrial microbiology and biotechnology. 2003. № 30(5). P. 279-291.
907. Chauhan P. S., Puri N., Sharma P., Gupta N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications // Applied microbiology and biotechnology. 2012. № 93(5). P. 1817-1830.
908. Arja M. O. Cellulases in the textile industry // In: Polaina J. and MacCabe A. P. Industrial enzymes. Springer, Dordrecht. 2007. P. 51-63.
909. Javier P. F. I., Óscar G., Sanz-Aparicio J., Díaz P. Xylanases: molecular properties and applications // In: Polaina J. and MacCabe A. P. Industrial enzymes. Springer, Dordrecht. 2007. P. 65-82.
910. Sorokin D. Y. Toshchakov S. V., Kolganova T. V., Kublanov I. V. Halo(natrono)archaea isolated from hypersaline lakes utilize cellulose and chitin as growth substrates // Frontiers in microbiology. 2015. № 6. P. 1-14.
911. Ogan A., Danis O., Gozuacik A., Cakmar E., Birbir M. Production of cellulase by immobilized whole cells of *Haloarcula* // Applied biochemistry and microbiology. 2012. № 48(5). P. 440-443.

912. Wang C. Y., Hsieh Y. R., Ng C. C., Chan H., Lin H. T., Tzeng W. S., Shyu Y. T. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05 // Enzyme and Microbial Technology. 2009. № 44(6-7). P. 373-379.
913. Zhang G., Li S., Xue Y., Mao L., Ma Y. Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10 // Extremophiles. 2012. № 16(1). P. 35-43.
914. Shivanand P., Mugeraya G., Kumar A. Utilization of renewable agricultural residues for the production of extracellular halostable cellulase from newly isolated *Halomonas* sp. strain PS47 // Annals of microbiology. 2013. № 63(4). P. 1257-1263.
915. Li X., Yu H. Y. Halostable cellulase with organic solvent tolerance from *Haloarcula* sp. LLSG7 and its application in bioethanol fermentation using agricultural wastes // Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2013. № 40(12). P. 1357-1365.
916. Yu H. Y., Li X. Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production // Biomass and Bioenergy. 2015. № 81. P. 19-25.
917. Wainø M., Ingvorsen K. Production of β -xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis* // Extremophiles. 2003. № 7(2). P. 87-93.
918. Giridhar P. V., Chandra T. S. Production of novel halo-alkali-thermo-stable xylanase by a newly isolated moderately halophilic and alkali-tolerant *Gracilibacillus* sp. TSCPVG // Process Biochemistry. 2010. № 45(10). P. 1730-1737.
919. Wejse P. L., Ingvorsen K., Mortensen K. K. Purification and characterisation of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium // Extremophiles. 2003. № 7(5). P. 423-431.
920. Prakash S., Veeranagouda Y., Kyoung L., Sreeramulu K. Xylanase production using inexpensive agricultural wastes and its partial characterization from a halophilic *Chromohalobacter* sp. TPSV 101 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009. № 25(2). P. 197-204.

921. Wainø M., Ingvorsen K. Production of halostable β -mannanase and β -mannosidase by strain NN, a new extremely halotolerant bacterium // Applied microbiology and biotechnology. 1999. № 52(5). P. 675-680.
922. Wang J., Shao Z., Hong Y., Li C., Fu X., Liu Z. A novel β -mannanase from *Pantoea agglomerans* A021: gene cloning, expression, purification and characterization // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010. № 26(10). P. 1777-1784.
923. Arpigny J. L., Jaeger K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties // Biochemical journal. 1999. № 343(1). P. 177-183.
924. Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M. E., Miller R. Lipases at interfaces: a review // Advances in colloid and interface science. 2009. № 147. P. 237-250.
925. Treichel H., de Oliveira D., Mazutti M. A., Di Luccio M., Oliveira J. V. A review on microbial lipases production // Food and bioprocess technology. 2010. № 3(2). P. 182-196.
926. De Maria L., Vind J., Oxenbøll K. M., Svendsen A., Patkar S. Phospholipases and their industrial applications // Applied microbiology and biotechnology. 2007. № 74(2). P. 290-300.
927. Sood S., Sharma A., Sharma N., Kanwar S. S. Carboxylesterases: sources, characterization and broader applications // Insight Enzym Res. 2016. № 1. P. 1-11.
928. Bhatnagar T., Boutaiba S., Hacene H., Cayol J. L., Fardeau M. L., Ollivier B., Baratti J. C. Lipolytic activity from *Halobacteria*: screening and hydrolase production // FEMS Microbiology Letters. 2005. № 248(2). P. 133-140.
929. Kharroub K., Gomri M. A., Aguilera M., Monteoliva-Sanchez M. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaea isolated from Algerian sabkhas // African Journal of Microbiology Research. 2014. № 8(52). P. 3992-4001.
930. Sánchez-Porro C., Martín S., Mellado E., Ventosa A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes // Journal of applied microbiology. 2003. № 94(2). P. 295-300.
931. Amoozegar M. A., Schumann P., Hajjighasemi M., Fatemi A. Z., Karbalaei-Heidari H. R. *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov., a moderately halophilic and

proteolytic species from a hypersaline lake in Iran // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2008. № 58(5). P. 1159-1163.

932. Amoozegar M. A., Salehghamari E., Khajeh K., Kabiri M., Naddaf S. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2 // Journal of basic microbiology. 2008. № 48(3). P. 160-167.

933. Rohban R., Amoozegar M. A., Ventosa A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran // Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2009. № 36(3). P. 333-340.

934. Kumar S., Karan R., Kapoor S., Singh S. P., Khare S. K. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes // Brazilian Journal of Microbiology. 2012. № 43(4). P. 1595-1603.

935. Babavalian H., Amoozegar M. A., Zahraei S., Rohban R., Shakeri F., Moghaddam M. M. Comparison of bacterial biodiversity and enzyme production in three hypersaline lakes; Urmia, Howz-Soltan and Aran-Bidgol // Indian journal of microbiology. 2014. № 54(4). P. 444-449.

936. Ozcan B., Ozyilmaz G., Cokmus C., Caliskan M. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains // Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2009. № 36(1). P. 105-110.

937. Schreck S. D., Grunden A. M. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases // Applied microbiology and biotechnology. 2014. № 98(3). P. 1011-1021.

938. Boutaiba S., Bhatnagar T., Hacene H., Mitchell D. A., Baratti J. C. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2006. № 41(1-2). P. 21-26.

939. Li X., Yu H. Y. Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production // Folia microbiologica. 2014. № 59(6). P. 455-463.

940. Ozgen M., Attar A., Elalmis Y., Birbir M., Yucel S. Enzymatic activity of a novel halotolerant lipase from *Haloarcula hispanica* 2TK2 // Polish Journal of Chemical Technology. 2016. № 18(2). P. 20-25.

941. Müller-Santos M., de Souza E. M., Pedrosa F. D. O., Mitchell D. A., Longhi S., Carrière F., Canaan S., Krieger N. First evidence for the salt-dependent folding and activity of an esterase from the halophilic archaea *Haloarcula marismortui* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2009. № 1791(8). P. 719-729.

942. Camacho R. M., Mateos-Díaz J. C., Diaz-Montaña D. M., González-Reynoso O., Córdova J. Carboxyl ester hydrolases production and growth of a halophilic archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1 // Extremophiles. 2010. № 14(1). P. 99-106.

943. Li X., Qian P., Wu S. G., Yu H. Y. Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Idiomarina* sp. W33 and its application for biodiesel production using Jatropha oil // Extremophiles. 2014. № 18(1). P. 171-178.

944. Musa H., Hafiz Kasim F., Nagoor Gunny A. A., Gopinath S. C., Azmier Ahmad M. Enhanced halophilic lipase secretion by *Marinobacter litoralis* SW-45 and its potential fatty acid esters release // Journal of basic microbiology. 2019. № 59(1). P. 87-100.

945. Ai L., Huang Y., Wang C. Purification and characterization of halophilic lipase of *Chromohalobacter* sp. from ancient salt well // Journal of basic microbiology. 2018. № 58(8). P. 647-657.

946. Ameri A., Shakibaie M., Faramarzi M. A., Ameri A., Amirpour-Rostami S., Rahimi H. R., Forootanfar H.. Thermoalkalophilic lipase from an extremely halophilic bacterial strain *Bacillus atrophaeus* FSHM2: purification, biochemical characterization and application // Biocatalysis and Biotransformation. 2017. № 35(3). P. 151-160.

947. Wang G., Wang Q., Lin X., Ng T. B., Yan R., Lin J., Ye X. A novel cold-adapted and highly salt-tolerant esterase from *Alkalibacterium* sp. SL3 from the sediment of a soda lake // Scientific reports. 2016. № 6(1). P. 1-10.

948. de Lourdes Moreno M., Márquez M. C., García M. T., Mellado E. Halophilic bacteria and archaea as producers of lipolytic enzymes // In: Rampelotto P. H. (ed). *Biotechnology of Extremophiles. Grand Challenges in Biology and Biotechnology*/ Springer, Cham. 2016. P. 375-397.
949. Ma F., Hanna M. A. Biodiesel production: a review // *Bioresource technology*. 1999. № 70(1). P. 1-15.
950. Van Gerpen J. Biodiesel processing and production // *Fuel processing technology*. 2005. № 86(10). P. 1097-1107.
951. Huang G. H., Chen F., Wei D., Zhang X., Chen G. Biodiesel production by microalgal biotechnology // *Applied energy*. 2010. № 87(1). P. 38-46.
952. Mahlia T. M. I., Syazmi Z. A. H. S., Mofijur M., Abas A. P., Bilad M. R., Ong H. C., Silitonga A. S. Patent landscape review on biodiesel production: Technology updates // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020. № 118. P. 1-9.
953. Rezania S., Oryani B., Park J., Hashemi B., Yadav K. K., Kwon E. E., Hur J., Cho J. Review on transesterification of non-edible sources for biodiesel production with a focus on economic aspects, fuel properties and by-product applications // *Energy Conversion and Management*. 2019. № 201. P. 1-15.
954. Tacias-Pascacio V. G., Torrestiana-Sánchez B., Dal Magro L., Virgen-Ortíz J. J., Suárez-Ruíz F. J., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R. Comparison of acid, basic and enzymatic catalysis on the production of biodiesel after RSM optimization // *Renewable Energy*. 2019. № 135. P. 1-9.
955. Davison B. H., Barton J. W., Petersen G. R. Nomenclature and methodology for classification of nontraditional biocatalysis // *Biotechnology progress*. 1997. № 13(5). P. 512-518.
956. Sellek G. A., Chaudhuri J. B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles // *Enzyme and Microbial Technology*. 1999. № 25(6). P. 471-482.
957. Khmel'nitsky Y. L., Rich J. O. Biocatalysis in nonaqueous solvents // *Current opinion in chemical biology*. 1999. № 3(1). P. 47-53.

958. Marhuenda-Egea F. C., Bonete M. J. Extreme halophilic enzymes in organic solvents // *Current Opinion in Biotechnology*. 2002. № 13(4). P. 385-389.
959. Hudson E. P., Eppler R. K., Clark D. S. Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions // *Current Opinion in Biotechnology*. 2005. № 16(6). P. 637-643.
960. Cantone S., Hanefeld U., Basso A. Biocatalysis in non-conventional media—ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase // *Green Chemistry*. 2007. № 9(9). P. 954-971.
961. Lin H., Liu J. Y., Wang H. B., Ahmed A. A. Q., Wu Z. L. Biocatalysis as an alternative for the production of chiral epoxides: a comparative review // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011. № 72(3-4). P. 77-89.
962. Savoca M. P., Tonoli E., Atobatele A. G., Verderio E. A. Biocatalysis by transglutaminases: a review of biotechnological applications // *Micromachines*. 2018. № 9(11). P. 1-23.
963. Bilal M., Zhao Y., Noreen S., Shah S. Z. H., Bharagava R. N., Iqbal H. M. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: A review from immobilization strategies viewpoint // *Biocatalysis and Biotransformation*. 2019. № 37(3). P. 159-182.
964. Schrewe M., Julsing M. K., Buehler B., Schmid A. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C–O functional group introduction and modification // *Chemical Society Reviews*. 2013. № 42(15). P. 6346-6377.
965. Strong P. J., Kalyuzhnaya M., Silverman J., Clarke W. P. A methanotroph-based biorefinery: potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation // *Bioresource technology*. 2016. № 215. P. 314-323.
966. Li G., Wan S., An T. Efficient bio-deodorization of aniline vapor in a biotrickling filter: metabolic mineralization and bacterial community analysis // *Chemosphere*. 2012. № 87(3). P. 253-258.
967. Wachtmeister J., Rother D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale // *Current opinion in biotechnology*. 2016. № 42. P. 169-177.

968. Gomes J., Steiner W. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes // Food technology and Biotechnology. 2004. № 42(4). P. 223-225.
969. Haque R. U., Paradisi F., Allers T. *Haloferax volcanii* as immobilised whole cell biocatalyst: new applications for halophilic systems // Applied microbiology and biotechnology. 2019. № 103(9). P. 3807-3817.
970. Klibanov A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents // Nature. 2001. № 409(6817). P. 241-246.
971. Stepankova V., Bidmanova S., Koudelakova T., Prokop Z., Chaloupkova R., Damborsky J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents // Acs Catalysis. 2013. № 3(12). P. 2823-2836.
972. Lanyi J. K., Stevenson J. Effect of salts and organic solvents on the activity of *Halobacterium cutirubrum* catalase // Journal of bacteriology. 1969. № 98(2). P. 611-616.
973. Baxter R. M. An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium* // Canadian Journal of Microbiology. 1959. № 5(1). P. 47-57.
974. Kim J., Dordick J. S. Unusual salt and solvent dependence of a protease from an extreme halophile // Biotechnology and Bioengineering. 1997. № 55(3). P. 471-479.
975. Munawar N., Engel P. C. Overexpression in a non-native halophilic host and biotechnological potential of NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum* strain NRC-36014 // Extremophiles. 2012. № 16(3). P. 463-476.
976. Alsafadi D., Paradisi F. Effect of organic solvents on the activity and stability of halophilic alcohol dehydrogenase (ADH2) from *Haloferax volcanii* // Extremophiles. 2013. № 17(1). P. 115-122.
977. Shafiei M., Ziaee A. A., Amoozegar M. A. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α -amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F // Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2011. № 38(2). P. 275-281.

978. Karan R., Singh S. P., Kapoor S., Khare S. K. A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated *Geomicrobium* sp. EMB2 (MTCC 10310): production optimization by response surface methodology // *New biotechnology*. 2011. № 28(2). P. 136-145.
979. Alsafadi D., Alsalman S., Paradisi F. Extreme halophilic alcohol dehydrogenase mediated highly efficient syntheses of enantiopure aromatic alcohols // *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2017. № 15(43). P. 9169-9175.
980. Hampp N. Bacteriorhodopsin as a photochromic retinal protein for optical memories // *Chemical Reviews*. 2000. № 100(5). P. 1755-1776.
981. Ashwini R., Vijayanand S., Hemapriya J. Photonic potential of haloarchaeal pigment bacteriorhodopsin for future electronics: A review // *Current microbiology*. 2017. № 74(8). P. 996-1002.
982. Li Y. T., Tian Y., Tian H., Tu T., Gou G. Y., Wang Q., Qiao Y. C., Yang Y., Ren T. L. A review on bacteriorhodopsin-based bioelectronic devices // *Sensors*. 2018. № 18(5). P.1-21.
983. Ikonen M., Peltonen J., Vuorimaa E., Lemmetyinen H. Study of photocycle and spectral properties of bacteriorhodopsin in Langmuir-Blodgett films // *Thin Solid Films*. 1992. № 213(2). P. 277-284.
984. Maximychev A. V., Kholmansky A. S., Levin E. V., Rambidi N. G., Chamorovsky S. K., Kononenko A. A., Erokhin V. V., Checulaeva L. N. Oriented purple membrane multilayers of halobacteria fabricated by Langmuir–Blodgett and electrophoretic sedimentation techniques // *Advanced materials for optics and electronics*. 1992. № 1(3). P. 105-115.
985. Min J., Choi H. G., Choi J. W., Lee W. H., Kim U. R. Photocurrent of bacteriorhodopsin films deposited by electrophoretic method // *Thin Solid Films*. 1998. № 327. P. 698-702.
986. He J. A., Samuelson L., Li L., Kumar J., Tripathy S. K. Oriented bacteriorhodopsin/polycation multilayers by electrostatic layer-by-layer assembly // *Langmuir*. 1998. № 14(7). P. 1674-1679.

987. Al-Arife K. M., Knopf G. K., Bassi A. S. Photoelectric monolayers based on self-assembled and oriented purple membrane patches // *Journal of microelectromechanical systems*. 2011. № 20(4). P. 800-810.
988. Koyama K., Yamaguchi N., Miyasaka T. Antibody-mediated bacteriorhodopsin orientation for molecular device architectures // *Science*. 1994. № 265(5173). P. 762-765.
989. Janfaza S., Rad A. M., Khayati M., Etemadzadeh A., Jamshidinia Z. Bacteriorhodopsin embedded in gelatin and polyvinyl alcohol films as recording materials for holographic memories // *Turkish Journal of Biochemistry. Turk Biyokimya Dergisi*. 2013. № 38(4). P. 468–474.
990. Dér A., Fábíán L., Valkai S., Wolff E., Ramsden J., Ormos P. Integrated optical devices using bacteriorhodopsin as active nonlinear optical material // In: Norwood R. A. (ed). *Linear and Nonlinear Optics of Organic Materials VI*. International Society for Optics and Photonics. 2006. № 6331. P. 1-8.
991. Tóth-Boconádi R., Dér A., Keszthelyi L. Optical and electric signals from dried oriented purple membrane of bacteriorhodopsins // *Bioelectrochemistry*. 2011. № 81(1). P. 17-21.
992. Rao D., Aranda F. J., Rao D. N., Chen Z., Akkara J. A., Kaplan D. L., Nakashima M. All-optical logic gates with bacteriorhodopsin films // *Optics communications*. 1996. № 127(4-6). P. 193-199.
993. Singh C. P., Roy S. All-optical logic gates with bacteriorhodopsin // *Current Applied Physics*. 2003. № 3(2-3). P. 163-169.
994. Mathesz A., Fábíán L., Valkai S., Alexandre D., Marques P. V., Ormos P., Wolff E. K., Dér A. High-speed integrated optical logic based on the protein bacteriorhodopsin // *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. № 46. P. 48-52.
995. Grätzel M. Dye-sensitized solar cells // *Journal of photochemistry and photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2003. № 4(2). P. 145-153.
996. Nazeeruddin M. K., Baranoff E., Grätzel M. Dye-sensitized solar cells: a brief overview // *Solar energy*. 2011. № 85(6). P. 1172-1178.

997. Hao S., Wu J., Huang Y., Lin J. Natural dyes as photosensitizers for dye-sensitized solar cell // *Solar energy*. 2006. № 80(2). P. 209-214.
998. Al-Arife K. M., Knopf G. K., Bassi A. S. Organic photovoltaic cells based on photoactive bacteriorhodopsin proteins // In: Becker H. and Gray B. L. *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XI*. International Society for Optics and Photonics. 2013. № 8615. P. 1-9.
999. Mohammadpour R., Janfaza S., Zeinoddini M. Potential of light-harvesting of bacteriorhodopsin co-sensitized with green fluorescence protein: A new insight into bioenergy application // *Biomass and Bioenergy*. 2016. № 87. P. 35-38.
1000. Das S., Citra Asmara T., Patra A., Song Z., Bista S. S., Somasundaran P., Rusydi A., Barbiellini B., Venkatesan R. Optical properties of bacteriorhodopsin–gold bionano interfaces // *The Journal of Physical Chemistry C*. 2019. № 123(43). P. 26516-26521.
1001. Ahmadi M., Yeow J. T. W. Fabrication and characterization of a radiation sensor based on bacteriorhodopsin // *Biosensors and Bioelectronics*. 2011. № 26(5). P. 2171-2176.
1002. Ahmadi M., Osei E. K., Yeow J. T. W. Bacteriorhodopsin for superficial X-ray sensing // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012. № 166. P. 177-183.
1003. Wang W. W., Knopf G. K., Bassi A. S. Protein-based photocell for high-speed motion detection // *Proceedings of 2005 IEEE Conference on Control Applications, 2005. CCA 2005. IEEE*. 2005. P. 731-736.
1004. Okada-Shudo Y., Tanabe T., Mukai T., Kasai K., Zhang Y., Watanabe M. Directionally selective motion detection with bacteriorhodopsin patterned sensor // *Synthetic Metals*. 2016. № 222. P. 249-254.
1005. Frydrych M., Silfsten P., Parkkinen S., Parkkinen J., & Jaaskelainen T. Color sensitive retina based on bacteriorhodopsin // *Biosystems*. 2000. № 54(3). P. 131-140.
1006. Sharkany J. P., Korposh S. O., Batori-Tarci Z. I., Trikur I. I., Ramsden J. J. Bacteriorhodopsin-based biochromic films for chemical sensors // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005. № 107(1). P. 77-81.

1007. Sharkany Y. P., Trikur I. I., Korposh S. A., Ramsden J. J. Sensitive elements based on bacteriorhodopsin for fiber-optics sensors of chemical components // In: Voet M., Willsch R., Ecke W., Jones J., Culshaw B. (eds). 17th International Conference on Optical Fibre Sensors. International Society for Optics and Photonics. 2005. № 5855. P. 411-414.

1008. Chen H. M., Jheng K. R., Yu A. D. Direct, label-free, selective, and sensitive microbial detection using a bacteriorhodopsin-based photoelectric immunosensor // *Biosensors and Bioelectronics*. 2017. № 91. P. 24-31.

1009. Anbu P., Kang C. H., Shin Y. J., So J. S. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications // *SpringerPlus*. 2016. № 5(1). P. 1-26.

1010. Seifan M., Samani A. K., Berenjian A. Bioconcrete: next generation of self-healing concrete // *Applied microbiology and biotechnology*. 2016. № 100(6). P. 2591-2602.

1011. Ivanov V., Stabnikov V. Biocementation and Biocements // In: Ivanov V., Stabnikov V. (eds). *Construction biotechnology: biogeochemistry, microbiology and biotechnology of construction materials and processes*. Springer. 2016. P. 109-138.

1012. Joshi S., Goyal S., Mukherjee A., Reddy M. S. Microbial healing of cracks in concrete: a review // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2017. № 44(11). P. 1511-1525.

1013. Noshi C. I., Schubert, J. J. Self-Healing Biocement and Its Potential Applications in Cementing and Sand-Consolidation Jobs: A Review Targeted at the Oil and Gas Industry // *SPE Liquids-Rich Basins Conference-North America*. Society of Petroleum Engineers. 2018. P. 1-19.

1014. van Paassen L. A., Ghose R., van der Linden T. J., van der Star W. R., van Loosdrecht M. C. Quantifying biomediated ground improvement by ureolysis: large-scale biogrout experiment // *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering*. 2010. № 136(12). P. 1721-1728.

1015. Harkes M. P., Van Paassen L. A., Booster J. L., Whiffin V. S., van Loosdrecht M. C. Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce

carbonate precipitation for ground reinforcement // *Ecological Engineering*. 2010. № 36(2). P. 112-117.

1016. Ivanov V., Chu J. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2008. № 7(2). P. 139-153.

1017. Chu J., Ivanov V., Stabnikov V., Li B. Microbial method for construction of an aquaculture pond in sand // *Bio-and Chemo-Mechanical Processes in Geotechnical Engineering: Géotechnique Symposium in Print 2013*. ICE Publishing. 2014. P. 215-219.

1018. Van der Ruyt M., van der Zon W. Biological in situ reinforcement of sand in near-shore areas // *Proceedings of the Institution of Civil Engineers-Geotechnical Engineering*. 2009. № 162(1). P. 81-83.

1019. Achal V., Mukherjee A., Reddy M. S. Microbial concrete: way to enhance the durability of building structures // *Journal of materials in civil engineering*. 2011. № 23(6). P. 730-734.

1020. De Muynck W., De Belie N., Verstraete W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review // *Ecological Engineering*. 2010. № 36(2). P. 118-136.

1021. Siddique R., Chahal N. K. Effect of ureolytic bacteria on concrete properties // *Construction and building materials*. 2011. № 25(10). P. 3791-3801.

1022. Wang J. Y., De Belie N., Verstraete W. Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2012. № 39(4). P. 567-577.

1023. Jimenez-Lopez C., Jroundi F., Pascolini C., Rodriguez-Navarro C., Pinar-Larrubia G., Rodriguez-Gallego M., González-Muñoz M. T. Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2008. № 62(4). P. 352-363.

1024. Dhami N. K., Reddy M. S., Mukherjee A. Improvement in strength properties of ash bricks by bacterial calcite // *Ecological Engineering*. 2012. № 39. P. 31-35.

1025. Raut S. H., Sarode D. D., Lele S. S. Biocalcification using *B. pasteurii* for strengthening brick masonry civil engineering structures // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014. № 30(1). P. 191-200.

1026. Pacheco-Torgal F., Labrincha J. A. Biotech cementitious materials: Some aspects of an innovative approach for concrete with enhanced durability // *Construction and Building Materials*. 2013. № 40. P. 1136-1141.

1027. Ghosh S., Biswas M., Chattopadhyay B. D., Mandal S. Microbial activity on the microstructure of bacteria modified mortar // *Cement and Concrete Composites*. 2009. № 31(2). P. 93-98.

1028. Vempada S. R., Reddy S. S. P., Rao M. S., Sasikala C. Strength enhancement of cement mortar using microorganisms-an experimental study // *Int J Earth Sci Eng*. 2011. № 4. P. 933-936.

1029. Webster A., May E. Bioremediation of weathered-building stone surfaces // *Trends in Biotechnology*. 2006. № 24(6). P. 255-260.

1030. Cuthbert M. O., McMillan L. A., Handley-Sidhu S., Riley M. S., Tobler D. J., Phoenix V. R. A field and modeling study of fractured rock permeability reduction using microbially induced calcite precipitation // *Environmental science & technology*. 2013. № 47(23). P. 13637-13643.

1031. DeJong J. T., Soga K., Kavazanjian E., Burns S., Van Paassen L. A., Al Qabany A., Aydilek A., Bang S. S., Burbank M., Caslake L. F., Chen C. Y., Cheng X., Chu J., Ciurli S., Esnault-Filet A., Fauriel S., Hamdan N., Hata T., Inagaki Y., Jefferis S., Kuo M., Laloui L., Larrahondo J., Manning D. A. C., Martinez B., Montoya B. M., Nelson D.C., Palomino A., Renforth P., Santamarina J. C., Seagren E. A., Tanyu B., Tsesarsky M., Weaver T. Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, opportunities and challenges // *Bio-and Chemo-Mechanical Processes in Geotechnical Engineering: Géotechnique Symposium in Print 2013*. Ice Publishing. 2014. P. 143-157.

1032. Achal V., Pan X., Zhang D. Remediation of copper-contaminated soil by *Kocuria flava* CR1, based on microbially induced calcite precipitation // *Ecological Engineering*. 2011. № 37(10). P. 1601-1605.

1033. Stabnikov V., Ivanov V. Biotechnological production of biopolymers and admixtures for eco-efficient construction materials // In: Pacheco-Torgal F., Ivanov V., Karak N., Jonkers H. (eds). *Biopolymers and Biotech Admixtures for Eco-Efficient Construction Materials*. Woodhead Publishing. 2016. P. 37-56.

1034. Lee Y. S., Park W. Current challenges and future directions for bacterial self-healing concrete // *Applied microbiology and biotechnology*. 2018. № 102(7). P. 3059-3070.

1035. Atkinson D. E. Functional roles of urea synthesis in vertebrates // *Physiological zoology*. 1992. № 65(2). P. 243-267.

1036. Wong L. S. Microbial cementation of ureolytic bacteria from the genus *Bacillus*: a review of the bacterial application on cement-based materials for cleaner production // *Journal of Cleaner Production*. 2015. № 93. P. 5-17.

1037. Garabito M. J., Márquez M. C., Ventosa A. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments // *Canadian journal of microbiology*. 1998. № 44(2). P. 95-102.

1038. Roongsawang N., Thaniyavarn J., Thaniyavarn S., Kameyama T., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin // *Extremophiles*. 2002. № 6(6). P. 499-506.

1039. Abusham R. A., Rahman R. N. Z. R., Salleh A. B., Basri M. Optimization of physical factors affecting the production of thermo-stable organic solvent-tolerant protease from a newly isolated halo tolerant *Bacillus subtilis* strain Rand // *Microbial Cell Factories*. 2009. № 8(20). P. 1-9.

1040. Mishra R. R., Prajapati S., Das J., Dangar T. K., Das N., Thatoi H. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product // *Chemosphere*. 2011. № 84(9). P. 1231-1237.

1041. Essghaier B., Abdeljabbar H. E. D. I., Hajlaoui M. R., Boudabous A., Sadfi-Zouaoui N. *In vivo* and *in vitro* evaluation of antifungal activities from a halotolerant *Bacillus subtilis* strain J9 // African Journal of Microbiology Research. 2012. № 6(19). P. 4073-4083.

1042. Stabnikov V., Jian C., Ivanov V., Li Y. Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013. № 29(8). P. 1453-1460.

1043. Stabnikov V., Naeimi M., Ivanov V., Chu J. Formation of water-impermeable crust on sand surface using biocement // Cement and Concrete Research. 2011. № 41(11). P. 1143-1149.

1044. Horiike T., Dotsuta Y., Nakano Y., Ochiai A., Utsunomiya S., Ohnuki T., Yamashita M. Removal of soluble strontium via incorporation into biogenic carbonate minerals by halophilic bacterium *Bacillus* sp. strain TK2d in a highly saline solution // Applied and environmental microbiology. 2017. № 83(20). P. 1-11.

1045. Rangamaran V. R., Shanmugam V. K. Biocalcification by Piezotolerant *Bacillus* sp. NIOTVJ5 Isolated from Deep Sea Sediment and its Influence on the Strength of Concrete Specimens // Marine Biotechnology. 2019. № 21(2). P. 161-170.

1046. Pal K. C., Mondal N. K., Chatterjee S., Ghosh T. S., Datta J. K. Characterization of fluoride-tolerant halophilic *Bacillus flexus* NM25 (HQ875778) isolated from fluoride-affected soil in Birbhum District, West Bengal, India // Environmental monitoring and assessment. 2014. № 186(2). P. 699-709.

1047. Skorupa D. J., Akyel A., Fields M. W., Gerlach R. Facultative and anaerobic consortia of haloalkaliphilic ureolytic micro-organisms capable of precipitating calcium carbonate // Journal of applied microbiology. 2019. № 127(5). P. 1479-1489.

1048. Arias D., Cisternas L. A., Rivas M. Biomineralization of calcium and magnesium crystals from seawater by halotolerant bacteria isolated from Atacama Salar (Chile) // Desalination. 2017. № 405. P. 1-9.

1049. Arias D., Valdes P., Cisternas L. A., Rivas M. Isolation and selection of halophilic ureolytic bacteria for biocementation of calcium and magnesium from seawater // *Advanced Materials Research*. Trans Tech Publications Ltd. 2015. № 1130. P. 489-492.

1050. Wei S., Cui H., Jiang Z., Liu H., He H., Fang N. Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015. № 46(2). P. 455-464.

1051. López-García P., Kazmierczak J., Benzerara K., Kempe S., Guyot F., Moreira D. Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey // *Extremophiles*. 2005. № 9(4). P. 263-274.

1052. Hosseini M., Babaha F., Al-Rubaye M. T. S., Fakhari J., Al-Musawi M. H. Urease-Producing Halophilic Bacteria Isolated from Bahr Al-Milh Salt Lake, Karbala, Iraq // *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2017. № 11(2). P. 711-716.

1053. Al Disi Z. A., Jaoua S., Bontognali T. R., Attia E. S., Al-Kuwari H. A., Zouari N. Evidence of a role for aerobic bacteria in high magnesium carbonate formation in the evaporitic environment of Dohat Faishakh Sabkha in Qatar // *Frontiers in Environmental Science*. 2017. № 5. P. 1-11.

1054. Quillaguamán J., Guzmán H., Van-Thuoc D., Hatti-Kaul R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. № 85(6). P. 1687-1696.

1055. Poli A., Anzelmo G., Nicolaus B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities // *Marine drugs*. 2010. № 8(6). P. 1779-1802.

1056. Satpute S. K., Banat I. M., Dhakephalkar P. K., Banpurkar A. G., Chopade B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms // *Biotechnology advances*. 2010. № 28(4). P. 436-450.

1057. Poli A., Di Donato P., Abbamondi G. R., Nicolaus B. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea // *Archaea*. 2011. № 2011. P. 1-13.

1058. Biswas J., Paul A. K. Diversity and production of extracellular polysaccharide by halophilic microorganisms // *Biodiversity Int. J.* 2017. № 1(2). P. 32-39.

1059. Pirog T. P., Voronenko A. A., Ivakhniuk M. O. Non-traditional producers of microbial exopolysaccharides // *Biotechnologia Acta.* 2018. № 11(4). P. 5-27.

1060. Sedlacek P., Slaninova E., Koller M., Nebesarova J., Marova I., Krzyzanek V., Obruca S. PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances // *New biotechnology.* 2019. № 49. P. 129-136.

1061. Wang J., Salem D. R., Sani R. K. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications // *Carbohydrate polymers.* 2019. № 205. P. 8-26.

1062. Chee J. Y., Yoga S. S., Lau N. S., Ling S. C., Abed R. M., Sudesh K. Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics // *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* 2010. № 2. P. 1395-1404.

1063. Chen G. Q., Jiang X. R., Guo Y. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA) // *Synthetic and Systems Biotechnology.* 2016. № 1(4). P. 236-242.

1064. Chen G. Q., Jiang X. R. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis // *Synthetic and systems biotechnology.* 2017. № 2(3). P. 192-197.

1065. Yu J. Microbial production of bioplastics from renewable resources // In: Yang S. T. (ed). *Bioprocessing for value-added products from renewable resources.* Elsevier. 2007. P. 585-610.

1066. Fukui T., Doi Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain // *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1998. № 49(3). P. 333-336.

1067. Eggink G., van der Wal H., Huijberts G. N., de Waard P. Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida* // *Industrial crops and products.* 1992. № 1(2-4). P. 157-163.

1068. Lageveen R. G., Huisman G. W., Preusting H., Ketelaar P., Eggink G., Witholt B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates // Applied and environmental microbiology. 1988. № 54(12). P. 2924-2932.

1069. Peter H. Y., Chua H., Huang A. L., Ho K. P. Conversion of industrial food wastes by *Alcaligenes latus* into polyhydroxyalkanoates // Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Humana Press, Totowa, NJ. 1999. P. 445-454.

1070. Bugnicourt E., Cinelli P., Lazzeri A., Alvarez V. A. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging // eXPRESS Polymer Letters. 2014. № 8(11). P. 791–808.

1071. Philip S., Keshavarz T., Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications // Journal of chemical technology & biotechnology: International research in process, Environmental & clean technology. 2007. № 82(3). P. 233-247.

1072. Pramanik N., Mitra T., Khamrai M., Bhattacharyya A., Mukhopadhyay P., Gnanamani A., Basu R. K., Kundu P. P. Characterization and evaluation of curcumin loaded guar gum/polyhydroxyalkanoates blend films for wound healing applications // RSC advances. 2015. № 5(78). P. 63489-63501.

1073. Chiulan I., Frone A. N., Brandabur C., Panaitescu D. M. Recent advances in 3D printing of aliphatic polyesters // Bioengineering. 2018. № 5(1). P. 1-18.

1074. Lim J., You M., Li J., Li Z. Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds // Materials Science and Engineering: C. 2017. № 79. P. 917-929.

1075. Zhang J., Shishatskaya E. I., Volova T. G., da Silva L. F., Chen G. Q. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications // Materials Science and Engineering: C. 2018. № 86. P. 144-150.

1076. Zhang X., Luo R., Wang Z., Deng Y., Chen G. Q. Application of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels // Biomacromolecules. 2009. № 10(4). P. 707-711.

1077. Gao X., Chen J. C., Wu Q., Chen G. Q. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels // *Current opinion in biotechnology*. 2011. № 22(6). P. 768-774.

1078. Han J., Lu Q., Zhou L., Zhou J., Xiang H. Molecular characterization of the *phaECHm* genes, required for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. № 73(19). P. 6058-6065.

1079. Burns D. G., Janssen P. H., Itoh T., Kamekura M., Li Z., Jensen G., Rodriguez-Valera F., Bolhuis H., Dyall-Smith M. L. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007. № 57(2). P. 387-392.

1080. Salgaonkar B. B., Bragança J. M. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Halogeometricum borinquense* strain E3 // *International journal of biological macromolecules*. 2015. № 78. P. 339-346.

1081. Mahansaria R., Dhara A., Saha A., Haldar S., Mukherjee J. Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Natrinema ajinwuensis* (as synonym) \equiv *Natrinema altunense* strain RM-G10 // *International journal of biological macromolecules*. 2018. № 107. P. 1480-1490.

1082. Lillo J. G., Rodriguez-Valera F. Effects of culture conditions on poly (β -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei* // *Applied and Environmental Microbiology*. 1990. № 56(8). P. 2517-2521.

1083. Cui Y. W., Zhang H. Y., Ji S. Y., Wang Z. W. Kinetic analysis of the temperature effect on polyhydroxyalkanoate production by *Haloferax mediterranei* in synthetic molasses wastewater // *Journal of Polymers and the Environment*. 2017. № 25(2). P. 277-285.

1084. Don T. M., Chen C. W., Chan T. H. Preparation and characterization of poly (hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei* // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2006. № 17(12). P. 1425-1438.

1085. Bhattacharyya A., Pramanik A., Maji S. K., Haldar S., Mukhopadhyay U. K., Mukherjee J. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei* // AMB express. 2012. № 2(34). P. 1-10.

1086. Hermann-Krauss C., Koller M., Muhr A., Fasl H., Stelzer F., Braunegg G. Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co-and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products // Archaea. 2013. № 2013. P. 1-10.

1087. Ghosh S., Gnaim R., Greiserman S., Fadeev L., Gozin M., Golberg A. Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei* // Bioresource technology. 2019. № 271. P. 166-173.

1088. Quillaguaman J., Hashim S., Bento F., Mattiasson B., Hatti-Kaul R. Poly (β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate // Journal of applied microbiology. 2005. № 99(1). P. 151-157.

1089. Tan D., Xue Y. S., Aibaidula G., Chen G. Q. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01 // Bioresource technology. 2011. № 102(17). P. 8130-8136.

1090. Ye J., Huang W., Wang D., Chen F., Yin J., Li T., Zhang H., Chen G. Q. Pilot scale-up of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by *Halomonas bluephagenesis* via cell growth adapted optimization process // Biotechnology Journal. 2018. № 13(5). P. 1800074.

1091. Kulkarni S. O., Kanekar P. P., Jog J. P., Sarnaik S. S., Nilegaonkar S. S. Production of copolymer, poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Halomonas campisalis* MCM B-1027 using agro-wastes // International journal of biological macromolecules. 2015. № 72. P. 784-789.

1092. Kulkarni S. O., Kanekar P. P., Nilegaonkar S. S., Sarnaik S. S., Jog J. P. Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)(PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India // Bioresource technology. 2010. № 101(24). P. 9765-9771.

1093. Kucera D., Pernicová I., Kovalcik A., Koller M., Mullerova, L., Sedlacek P., Mravec F., Nebesarova J., Kalina M., Marova I., Krzyzanek V., Obruca S. Characterization of the promising poly (3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila* // Bioresource technology. 2018. № 256. P. 552-556.

1094. Pu W., Shen C., Wei B., Yang Y., Li Y. A comprehensive review of polysaccharide biopolymers for enhanced oil recovery (EOR) from flask to field // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2018. № 61. P. 1-11.

1095. Maudgalya S., Knapp R. M., McInerney M. Microbially enhanced oil recovery technologies: a review of the past, present and future // Production and Operations Symposium. Society of Petroleum Engineers. 2007. P. 1-11.

1096. Antón J., Meseguer I., Rodriguez-Valera F. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei* // Applied and Environmental Microbiology. 1988. № 54(10). P. 2381-2386.

1097. Parolis H., Parolis L. A., Boán I. F., Rodríguez-Valera F., Widmalm G., Manca M. C., Manta M. C., Jansson P. E., Sutherland I. W. The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500) // Carbohydrate research. 1996. № 295. P. 147-156.

1098. Parolis L. A., Parolis H., Paramonov N. A., Boán I. F., Antón J., Rodríguez-Valera F. Structural studies on the acidic exopolysaccharide from *Haloferax denitrificans* ATCC 35960 // Carbohydrate research. 1999. № 319(1-4). P. 133-140.

1099. Paramonov N. A., Parolis L. A., Parolis H., Boán I. F., Antón J., Rodríguez-Valera F. The structure of the exocellular polysaccharide produced by the Archaeon *Haloferax gibbonsii* (ATCC 33959) // Carbohydrate research. 1998. № 309(1). P. 89-94.

1100. Squillaci G., Finamore R., Diana P., Restaino O. F., Schiraldi C., Arbucci S., Ionata E., La Cara F., Morana A. Production and properties of an exopolysaccharide synthesized by the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica* // Applied microbiology and biotechnology. 2016. № 100(2). P. 613-623.

1101. Mata J. A., Béjar V., Bressollier P., Tallon R., Urdaci M. C., Quesada E., Llamas I. Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately

halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae* // Journal of Applied Microbiology. 2008. № 105(2). P. 521-528.

1102. Martínez-Checa F., Béjar V., Llamas I., Del Moral A., Quesada E. *Alteromonas hispanica* sp. nov., a polyunsaturated-fatty-acid-producing, halophilic bacterium isolated from Fuente de Piedra, southern Spain // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2005. № 55(6). P. 2385-2390.

1103. Martínez-Cánovas M. J., Bejar V., Martínez-Checa F., Paez R., Quesada E. *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2004. № 54(5). P. 1793-1797.

1104. Llamas I., Mata J. A., Tallon R., Bressollier P., Urdaci M. C., Quesada E., Béjar V. Characterization of the exopolysaccharide produced by *Salipiger mucosus* A3T, a halophilic species belonging to the *Alphaproteobacteria*, isolated on the Spanish mediterranean seaboard // Marine drugs. 2010. № 8(8). P. 2240-2251.

1105. Quesada E., Béjar V., Calvo C. Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina* // Experientia. 1993. № 49(12). P. 1037-1041.

1106. Calvo C., Martínez-Checa F., Toledo F., Porcel J., Quesada E. Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons // Applied microbiology and biotechnology. 2002. № 60(3). P. 347-351.

1107. Arias S., Del Moral A., Ferrer M. R., Tallon R., Quesada E., Bejar V. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology // Extremophiles. 2003. № 7(4). P. 319-326.

1108. Amjres H., Béjar V., Quesada E., Carranza D., Abrini J., Siquin C., Ratiskol J., Collic-Jouault S., Llamas I. Characterization of haloglycan, an exopolysaccharide produced by *Halomonas stenophila* HK30 // International journal of biological macromolecules. 2015. № 72. P. 117-124.

1109. Biswas J., Mandal S., Paul A. K. Production, partial purification and some bio-physicochemical properties of EPS produced by *Halomonas xianhensis* SUR308 isolated from a saltern environment // Journal of Biologically Active Products from Nature. 2015. № 5(2). P. 108-119.

1110. Poli A., Kazak H., Gürleyendağ B., Tommonaro G., Pieretti G., Öner E. T., Nicolaus B. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media // Carbohydrate Polymers. 2009. № 78(4). P. 651-657.

1111. Mohammadipanah F., Hamedi J., Dehghani M. Halophilic bacteria: potentials and applications in biotechnology // In: Maheshwari D. K. and Saraf M. (eds). Halophiles. Springer, Cham. 2015. P. 277-321.

1112. Dufossé L. Microbial production of food grade pigments // Food technology and Biotechnology. 2006. № 44(3). P. 313-323.

1113. Hania W. B., Ballet N., Vandekerckove P., Ollivier B., O'Toole P. W., Brugère J. F. Archaeobiotics: Archaea as Pharmabiotics for Treating Chronic Disease in Humans? // In: Sghaier H., Najjari A. and Ghedira K. (eds). Archaea - New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications. InTech. 2017. P. 41-62.

1114. Pasarin D., Rovinaru C. Sources of carotenoids and their uses as animal feed additives-a review // Scientific Papers: Series D, Animal Science-The International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science. 2018. № 61(2). P. 74-85.

1115. Rodriguez-Concepcion M., Avalos J., Bonet M. L., Boronat A., Gomez-Gomez L., Hornero-Mendez D., Carmen Limon M., Meléndez-Martínez A. J., Olmedilla-Alonso B., Palou A., Ribot J., Rodrigo M. J., Zacarias L., Zhu C. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health // Progress in lipid research. 2018. № 70. P. 62-93.

1116. Safarpour A., Ebrahimi M., Fazeli S. A. S., Amoozegar M. A. Supernatant metabolites from halophilic archaea to reduce tumorigenesis in prostate cancer *in-vitro* and *in-vivo* // Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. 2019. № 18(1). P. 241-253.

1117. Ebner G. Method for treating hyperkeratotic disease with a *Halobacterium halobium* lysate : пат. 6238663 США. 2001.
1118. Rodelet J. F. Fraction extracted from archaebacteria for cosmetic purposes : пат. 6849279 США. 2005.
1119. Kuchina N. Halobacteria extracts composition for tumor reduction : заяв. пат. 14666823 США. 2015.
1120. Kuchina N. Topical halobacteria extract composition for treating radiation skin tissue damage : заяв. пат. 15796897 США. 2018.
1121. Gochnauer M. B., Kushner D. J. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria // Canadian Journal of Microbiology. 1969. № 15(10). P. 1157-1165.
1122. Ames J. M., MacLeod G. Volatile components of a yeast extract composition // Journal of Food Science. 1985. № 50(1). P. 125-131.
1123. Kishimoto N., Inagaki K., Sugio T., Tano T. Growth inhibition of *Acidiphilium* species by organic acids contained in yeast extract // Journal of Fermentation and Bioengineering. 1990. № 70(1). P. 7-10.
1124. Kaya K., Sano T. Algicidal compounds in yeast extract as a component of microbial culture media // Phycologia. 1996. № 35(6). P. 117-119.
1125. Grzelak A., Rychlik B., Bartosz G. Reactive oxygen species are formed in cell culture media // Acta Biochimica Polonica. 2000. № 47(4). P. 1197-1198.
1126. Grzelak A., Rychlik B., Bartosz G. Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media // Free Radical Biology and Medicine. 2001. № 30(12). P. 1418-1425.
1127. De Spiegeleer P., Sermon J., Lietaert A., Aertsen A., Michiels C. W. Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli* // Journal of applied microbiology. 2004. № 97(1). P. 124-133.
1128. Giddings L. A., Newman D. J. Bioactive compounds from terrestrial extremophiles. Springer, Cham. 2015. P. 75.
1129. Schneegurt M. A. Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant bacteria and archaea // In: Vreeland R. H. (ed). Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms. Springer, Dordrecht. 2012. P. 35-58.

1130. Brown H. J., Gibbons N. E. The effect of magnesium, potassium, and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria // Canadian Journal of microbiology. 1955. № 1(7). P. 486-494.

1131. Sehgal S. N., Gibbons N. E. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum* // Canadian Journal of Microbiology. 1960. № 6(2). P. 165-169.

1132. Forsyth M. P., Kushner D. J. Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria // Canadian journal of microbiology. 1970. № 16(4). P. 253-261.

1133. Tomlinson G. A., Hochstein L. I. Isolation of carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacteria // Canadian Journal of Microbiology. 1972. № 18(5). P. 698-701.

1134. Mullakhanbhai M. F., Larsen H. *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement // Archives of microbiology. 1975. № 104(1). P. 207-214.

1135. Rodriguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Cormenzana A. Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources // Microbiology. 1980. № 119(2). P. 535-538.

1136. Vreeland R. H., Martin E. L. Growth characteristics, effects of temperature, and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongata* // Canadian Journal of Microbiology. 1980. № 26(7). P. 746-752.

1137. Kamekura M., Wallace R., Hipkiss A. R., Kushner D. J. Growth of *Vibrio costicola* and other moderate halophiles in a chemically defined minimal medium // Canadian journal of microbiology. 1985. № 31(9). P. 870-872.

1138. Vreeland R. H., Straight S., Krammes J., Dougherty K., Rosenzweig W. D., Kamekura M. *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate // Extremophiles. 2002. № 6(6). P. 445-452.

1139. Caton T. M., Witte L. R., Ngyuen H. D., Buchheim J. A., Buchheim M. A., Schneegurt M. A. Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma // *Microbial Ecology*. 2004. № 48(4). P. 449-462.

1140. Payne J. I., Sehgal S. N., Gibbons N. E. Immersion refractometry of some halophilic bacteria // *Canadian Journal of Microbiology*. 1960. № 6(1). P. 9-15.

1141. Tindall B. J., Mills A. A., Grant W. D. An alkalophilic red halophilic bacterium with a low magnesium requirement from a Kenyan soda lake // *Microbiology*. 1980. № 116(1). P. 257-260.

1142. Torreblanca M., Rodriguez-Valera F., Juez G., Ventosa A., Kamekura M., Kates M. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov // *Systematic and Applied Microbiology*. 1986. № 8(1-2). P. 89-99.

1143. Yachai M., Tanasupawat S., Itoh T., Benjakul S., Visessanguan W., Valyasevi R. *Halobacterium piscisalsi* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2008. № 58(9). P. 2136-2140.

1144. Stan-Lotter H., Pfaffenhuemer M., Legat A., Busse H. J., Radax C., Gruber C. *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2002. № 52(5). P. 1807-1814.

1145. Cui H. L., Lin Z. Y., Dong Y., Zhou P. J., Liu S. J. *Halorubrum litoreum* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a solar saltern // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2007. № 57(10). P. 2204-2206.

1146. Kaye J. Z., Marquez M. C., Ventosa A., Baross J. A. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004. № 54(2). P. 499-511.

1147. Bouchotroch S., Quesada E., del Moral A., Llamas I., Bejar V. *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium

// International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2001. № 51(5). P. 1625-1632.

1148. García M. T., Mellado E., Ostos J. C., Ventosa A. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. № 54(5). P. 1723-1728.

1149. Martínez-Cánovas M. J., Quesada E., Llamas I., Bejar V. *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. № 54(3). P. 733-737.

1150. Xu X. W., Wu Y. H., Zhou Z., Wang C. S., Zhou Y. G., Zhang H. B., Wang Y., Wu M. *Halomonas saccharevitans* sp. nov., *Halomonas arcis* sp. nov. and *Halomonas subterranea* sp. nov., halophilic bacteria isolated from hypersaline environments of China // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. № 57(7). P. 1619-1624.

1151. Ventosa A., Garcia M. T., Kamekura M., Onishi H., Ruiz-Berraquero F. *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species // Systematic and applied microbiology. 1989. № 12(2). P. 162-166.

1152. Garabito M. J., Arahall D. R., Mellado E., Márquez M. C., Ventosa A. *Bacillus salexigens* sp. nov., a new moderately halophilic *Bacillus* species // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1997. № 47(3). P. 735-741.

1153. Spring S., Ludwig W., Marquez M. C., Ventosa A., Schleifer K. H. *Halobacillus* gen. nov., with Descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1996. № 46(2). P. 492-496.

1154. Wainø M., Tindall B. J., Schumann P., Ingvorsen K. *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to

the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1999. № 49(2). P. 821-831.

1155. Madeley J. R., Korngold R. R., Kushner D. J., Gibbons N. E. The lysis of a psychrophilic marine bacterium as studied by microelectrophoresis // Canadian Journal of Microbiology. 1967. № 13(1). P. 45-55.

1156. Mathrani I. M., Boone D. R. Isolation and characterization of a moderately halophilic methanogen from a solar saltern // Applied and environmental microbiology. 1985. № 50(1). P. 140-143.

1157. Yu I. K., Kawamura F. *Halomethanococcus doii* gen. nov., sp. nov.: an obligately halophilic methanogenic bacterium from solar salt ponds // The Journal of General and Applied Microbiology. 1987. № 33(4). P. 303-310.

1158. Wais A. C. Recovery of halophilic archaeobacteria from natural environments // FEMS Microbiology Ecology. 1988. № 4(3-4). P. 211-216.

1159. Abram D., Gibbons N. E. The effect of chlorides of monovalent cations, urea, detergents, and heat on morphology and the turbidity of suspensions of red halophilic bacteria // Canadian journal of microbiology. 1961. № 7(5). P. 741-750.

1160. MacLeod R. A. The question of the existence of specific marine bacteria // Bacteriological Reviews. 1965. № 29(1). P. 9-23.

1161. Boring J., Kushner D. J., Gibbons N. E. Specificity of the salt requirement of *Halobacterium cutirubrum* // Canadian Journal of Microbiology. 1963. № 9(2). P. 143-154.

1162. Adams R., Bygraves J., Kogut M., Russell N. J. The role of osmotic effects in haloadaptation of *Vibrio costicola* // Microbiology. 1987. № 133(7). P. 1861-1870.

1163. Onishi H., Fuchi H., Konomi K., Hidaka O., Kamekura M. Isolation and distribution of a variety of halophilic bacteria and their classification by salt-response // Agricultural and Biological Chemistry. 1980. № 44(6). P. 1253-1258.

1164. Quesada E., Bejar V., Valderrama M. J., Ramos-Cormenzana A. Growth characteristics and salt requirement of *Deleya halophila* in a defined medium // Current Microbiology. 1987. № 16(1). P. 21-25.

1165. Kamekura M., Onishi H. Cell-associated cations of the moderate halophile *Micrococcus varians* ssp. *halophilus* grown in media of high concentrations of LiCl, NaCl, KCl, RbCl, or CsCl // Canadian Journal of Microbiology. 1982. № 28(2). P. 155-161.

1166. Flannery W. L., Kennedy D. M. The nutrition of *Vibrio costicolus*: I. A simplified synthetic medium // Canadian Journal of Microbiology. 1962. № 8(6). P. 923-928.

1167. Onishi H., McCance M. E., Gibbons N. E. A synthetic medium for extremely halophilic bacteria // Canadian journal of microbiology. 1965. № 11(2). P. 365-373.

1168. Grey V. L., Fitt P. S. An improved synthetic growth medium for *Halobacterium cutirubrum* // Canadian Journal of Microbiology. 1976. № 22(3). P. 440-442.

1169. Kauri T., Wallace R., Kushner D. J. Nutrition of the halophilic archaeobacterium, *Haloferax volcanii* // Systematic and applied microbiology. 1990. № 13(1). P. 14-18.

1170. Smirnov A. V., Kulakovskaya T. V., Kulaev I. S. Phosphate accumulation by an extremely halophilic archae *Halobacterium salinarium* // Process Biochemistry. 2002. № 37(6). P. 643-649.

1171. Caton T. M., Caton I. R., Witte L. R., Schneegurt M. A. Archaeal diversity at the Great Salt Plains of Oklahoma described by cultivation and molecular analyses // Microbial ecology. 2009. № 58(3). P. 519-528.

1172. Grant C. L., Pramer D. Minor element composition of yeast extract // Journal of bacteriology. 1962. № 84(4). P. 869-870.

1173. Kaspro R. P., Lange A. J., Kirwan D. J. Correlation of fermentation yield with yeast extract composition as characterized by near-infrared spectroscopy // Biotechnology progress. 1998. № 14(2). P. 318-325.

1174. Manikandan M., Pašić L., Kannan V. Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family *Halobacteriaceae*) by

response surface methodology // *Bioresource technology*. 2009. № 100(12). P. 3107-3112.

1175. Kester D. R., Duedall I. W., Connors D. N., Pytkowicz R. M. Preparation of artificial seawater // *Limnology and oceanography*. 1967. № 12(1). P. 176-179.

1176. Kushwaha S. C., Juez-Perez G., Rodriguez-Valera F., Kates M., Kushner D. J. Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain // *Canadian Journal of Microbiology*. 1982. № 28(12). P. 1365-1372.

1177. D'Souza S. E., Altekar W., D'Souza S. F. Adaptive response of *Haloferox mediterranei* to low concentrations of NaCl (< 20%) in the growth medium // *Archives of microbiology*. 1997. № 168(1). P. 68-71.

1178. Fang C. J., Ku K. L., Lee M. H., Su N. W. Influence of nutritive factors on C₅₀ carotenoids production by *Haloferox mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation // *Bioresource technology*. 2010. № 101(16). P. 6487-6493.

1179. Bidle K. A., Hanson T. E., Howell K., Nannen J. HMG-CoA reductase is regulated by salinity at the level of transcription in *Haloferox volcanii* // *Extremophiles*. 2007. № 11(1). P. 49-55.

1180. Sui L., Liu L., Deng Y. Characterization of halophilic C₅₀ carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China // *Chinese journal of oceanology and limnology*. 2014. № 32(6). P. 1280-1287.

1181. Asker D., Ohta Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria // *Journal of bioscience and bioengineering*. 1999. № 88(6). P. 617-621.

1182. Asker D., Ohta Y. Production of canthaxanthin by *Haloferox alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction // *Applied microbiology and biotechnology*. 2002. № 58(6). P. 743-750.

1183. Gochnauer M. B., Kushwaha S. C., Kates M., Kushner D. J. Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria // *Archiv für Mikrobiologie*. 1972. № 84(4). P. 339-349.

1184. Kushwaha S. C., Kates M. K. Effect of glycerol on carotenogenesis in the extreme halophile, *Halobacterium cutirubrum* // *Canadian Journal of Microbiology*. 1979. № 25(11). P. 1288-1291.

1185. Ghasemi M. F., Shodjai-Arani A., Moazami N. Optimization of bacteriorhodopsin production by *Halobacterium salinarum* PTCC 1685 // Process Biochemistry. 2008. № 43(10). P. 1077-1082.

1186. Young S. U., Joon T. P., Sang Y. L., Ho N. C. The effects of glycerol and growth conditions on the production of bacteriorhodopsin by *Halobacterium halobium* R1 // Korean J Biotechnol Bioeng. 1997. № 5. P. 309-313.

1187. Daniels R. S. Corn steep liquor as a biostimulant composition : пат. 8568758 CIIIA. – 2013.

1188. Shiu P. J. R., Ju Y. H., Chen H. M., Lee C. K. Effect of complex nutrients and repeated-batch cultivation of *Halobacterium salinarum* on enhancing bacteriorhodopsin production // J. Microb. Biochem. Technol. 2015. № 7. P. 289-293.

1189. Seyedkarimi M. S., Aramvash A., Ramezani R. High production of bacteriorhodopsin from wild type *Halobacterium salinarum* // Extremophiles. 2015. № 19(5). P. 1021-1028.

1190. Jeganathan C., Thamaraiselvi K., Girisun T. C. S. Improved production of bacteriorhodopsin from *Halobacterium salinarum* through direct amino acid supplement in the basal medium // Extremophiles. 2019. № 23(1). P. 133-139.

1191. Akolkar A., Bharambe N., Trivedi S., Desai A. Statistical optimization of medium components for extracellular protease production by an extreme haloarchaeon, *Halobacterium* sp. SP1 (1) // Letters in applied microbiology. 2009. № 48(1). P. 77-83.

1192. Chuprom J., Bovornreungroj P., Ahmad M., Kantachote D., Dueramae S. Approach toward enhancement of halophilic protease production by *Halobacterium* sp. strain LBU50301 using statistical design response surface methodology // Biotechnology Reports. 2016. № 10. P. 17-28.

1193. Vidyasagar M., Prakash S. B., Sreeramulu K. Optimization of culture conditions for the production of haloalkaliphilic thermostable protease from an extremely halophilic archaeon *Halogeometricum* sp. TSS101 // Letters in applied microbiology. 2006. № 43(4). P. 385-391.

1194. Kumar R. S., Ananthan G., Prabhu A. S. Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Marinobacter* sp. GA CAS9 using

response surface methodology – a statistical approach // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2014. № 3(2). P. 191-197.

1195. Haque R. U., Paradisi F., Allers T. *Haloferax volcanii* for biotechnology applications: challenges, current state and perspectives // Applied microbiology and biotechnology. 2020. № 104(4). P. 1371-1382.

1196. Liu C., Baffoe D.K., Zhan Y., Zhang M., Li Y., Zhang G. Halophile, an essential platform for bioproduction // Journal of microbiological methods. 2019. № 166. P. 1-8.

1197. Fröls S., Dyll-Smith M., Pfeifer F. Biofilm formation by haloarchaea // Environmental microbiology. 2012. №14(12). P. 3159-3174.

1198. Chimileski S., Franklin M. J., Papke R. T. Biofilms formed by the archaeon *Haloferax volcanii* exhibit cellular differentiation and social motility, and facilitate horizontal gene transfer // BMC biology. 2014. № 12(1). P. 1-16.

1199. Mahler N., Tschirren S., Pflügl S., Herwig C. Optimized bioreactor setup for scale-up studies of extreme halophilic cultures // Biochemical Engineering Journal. 2018. № 130. P. 39-46.

1200. Koller M. Recycling of waste streams of the biotechnological poly (hydroxyalkanoate) production by *Haloferax mediterranei* on whey // International Journal of Polymer Science. 2015. № 2015. P. 1-8.

1201. Chen X., Yin J., Ye J., Zhang H., Che X., Ma Y., Li M., Wu L. P., Chen G. Q. Engineering *Halomonas bluephagenesis* TD01 for non-sterile production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) // Bioresource technology. 2017. № 244. P. 534-541.

1202. Schuck P., Jeantet R., Tanguy G., Méjean S., Gac A., Lefebvre T., Labussiere E., Martineau C. Energy consumption in the processing of dairy and feed powders by evaporation and drying // Drying Technology. 2015, № 33. P.176-184.

1203. Zhang Y., Lin J., Zhong Q. Effects of media, heat adaptation, and outlet temperature on the survival of *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 after spray drying and subsequent storage // LWT. 2016. № 74. P. 441-447.

1204. Wang J., Huang S., Fu N., Jeantet R., Chen X. D Thermal aggregation of calcium-fortified skim milk enhances probiotic protection during convective droplet drying // Journal of agricultural and food chemistry. 2016. № 64(30). P. 6003-6010.
1205. Morgan C. A., Herman N., White P. A. Vesey G. Preservation of microorganisms by drying; a review // Journal of microbiological methods. 2006. № 66(2). P. 183-193.
1206. Van De Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D., Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria // Antonie Van Leeuwenhoek. 2002. № 82(1-4). P. 187-216.
1207. Corcoran B. M., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances // Journal of Applied Microbiology. 2004. № 96(5). P. 1024-1039.
1208. Riveros B., Ferrer J., Borquez R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus* // Drying Technology. 2009. № 27(1). P. 123-132.
1209. Ghandi A., Powell I. B., Howes T., Chen X. D., Adhikari B. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: a laboratory and pilot scale study // Journal of food engineering. 2012. № 113(2). P. 194-200.
1210. Mezhericher M., Levy A., Borde I. Three-dimensional spray-drying model based on comprehensive formulation of drying kinetics // Drying Technology. 2012. № 30(11-12). P. 1256-1273.
1211. Fu N., Woo M. W., Selomulya C., Chen X. D. Inactivation of *Lactococcus lactis* ssp. cremoris cells in a droplet during convective drying // Biochemical engineering journal. 2013. № 79. P. 46-56.
1212. Perdana J., Bereschenko L., Fox M. B., Kuperus J. H., Kleerebezem M., Boom R. M., Schutyser M. A. Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying // Food Research International. 2013. № 54(2). P. 1351-1359.

1213. Peighambardoust S. H., Tafti A. G., Hesari J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review // Trends in Food Science & Technology. 2011. № 22(5). P. 215-224.

1214. Vesterlund S., Salminen K., Salminen S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed // International Journal of Food Microbiology. 2012. № 157(2). P. 319-321.

1215. Ananta E., Volkert M., Knorr D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG // International Dairy Journal. 2005. № 15(4). P. 399-409.

1216. Lopez-Cortes A., Ochoa J. L. The biological significance of *Halobacteria* on nucleation and sodium chloride crystal growth // Studies in Surface Science and Catalysis. Elsevier. 1999. № 120. P. 903-923.

1217. Fendrihan S., Legat A., Pfaffenhuemer M., Gruber C., Weidler G., Gerbl F., Stan-Lotter H. Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival // In: Amils R., Ellis-Evans C., and Hinghofer-Szalkay H. (eds). Life in Extreme Environments. Springer, Dordrecht. 2006. P. 125-140.

1218. Stan-Lotter H., Radax C., Gruber C., Legat A., Pfaffenhuemer M., Wieland H., Komle N., Kargl G. Astrobiology with haloarchaea from Permo-Triassic rock salt // International Journal of Astrobiology. 2002. № 1(4). P. 271-284.

1219. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. № 173(2). P. 697-703.

1220. Pfeiffer F., Schuster S. C., Broicher A., Falb M., Palm P., Rodewald K., Ruepp A., Soppa J., Tittor J., Oesterhelt D. Evolution in the laboratory: the genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1 // Genomics. 2008. № 91(4). P. 335-346.

1221. DasSarma S., RajBhandary U. L., Khorana H. G. High-frequency spontaneous mutation in the bacterio-opsin gene in *Halobacterium halobium* is mediated by transposable elements // PNAS. 1983. № 80(8). P. 2201-2205.

1222. DasSarma S. Mechanisms of genetic variability in *Halobacterium halobium*: the purple membrane and gas vesicle mutations // Can. J. Microbiol. 1989. № 35(1). P. 65-72.

1223. Rekab K., Shaikh M. Statistical design of experiments with engineering applications. CRC Press, Boca Raton. 2005.

1224. Макаричев Ю. А., Иванников Ю. Н. Методы планирование эксперимента и обработки данных: учеб. пособие. Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2016. 131 с.

1225. Dick J., De Windt W., De Graef B., Saveyn H., Van der Meeren P., De Belie N., Verstraete W. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species // Biodegradation. 2006. № 17(4). P. 357-367.

1226. Удаление токсичных продуктов из организма методом гемосорбции в клинике и эксперименте. Труды 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова. М.: 1974, т. 31, вып. 1.

1227. Швайкова М.Д Токсикологическая химия. М.: Медицина, 1975.

1228. Oesterhelt D., Stoeckenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fraction into red and purple membrane // Methods Enzymology. 1974. V. 31. P. 667-678.

1229. Association of Official Analytical Chemists // Official methods of analysis of AOAC international, 20th edn. AOAC Press, Gaithersburg. 2016.

1230. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties // J. Gen. Physiol. 1946. Vol. 30. P. 291–310.

1231. Никишин Д.А., Терёшина,Н.С., Баратова Л.А., Ксенофонтов А.Л. Изучение аминокислот гомеопатических настоек баптизии красильной (*Baptisia tinctoria*) // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2017. № 3. С. 33-39.

1232. Баратова Л. А., Белякова Л. П. Определение аминокислотного состава белков. Методы биохимического эксперимента. М.: МГУ, 1974. 36 с.

1233. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J Cell Biol. 1963. № 17. 208–212.

1234. 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), С. 500-508.

1235. Lane D. J. 16S/23S sequencing // In: Stackebrandt E. a. Goodfellow M. (eds). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 1991. P. 115-175.

1236. Kolganova T. V., Kuznetsov B. B., Tourova T. P. Designing and testing oligonucleotide primers for amplification and sequencing of archaeal 16S rRNA genes // Microbiology. 2002. № 71(2). P. 243-246.

1237. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. BLAST+: architecture and applications // BMC Bioinformatics. 2009. № 15. P. 10:421.

1238. Адамс М. Бактериофаги. М. : Изд-во Иностр. лит. 1961. 272 с.

1239. Oren A., Gurevich P. Dynamics of a bloom of halophilic archaea in the Dead Sea // Hydrobiologia. 1995. № 315(2). P. 149-158.

1240. Мосин О. В., Швец В. И., Складнев Д. А., Игнатов И. Биосинтез фотопреобразующего трансмембранного белка [^2H] бактериородопсина, меченного дейтерием по остаткам ароматических аминокислот [$2,3,4,5,6\text{-}^2\text{H}_5$]Phe, [$3,5\text{-}^2\text{H}_2$]Tyr и [$2,4,5,6,7\text{-}^2\text{H}_5$]Trp // Научное приборостроение. 2013. № 23(2). С. 14-26.

1241. Martín-Tornero E., Sierra-Tadeo F. J., Durán-Merás I., Espinosa-Mansilla, A. (2019). Phenylalanine Photoinduced Fluorescence and Characterization of the Photoproducts by LC-MS // Journal of fluorescence. V. 29. № 6. P. 1445-1455.

1242. Silva E. Sensitized photo-oxidation of amino acids in proteins: Some important biological implications // Biological research. 1996. V. 29. P. 57-68.

1243. Gracanin M., Hawkins C. L., Pattison D. I., Davies M. J. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products // Free radical biology and medicine. 2009. V. 47. № 1. P. 92-102.

1244. Grosvenor A. J., Morton J. D., Dyer J. M. Profiling of residue-level photo-oxidative damage in peptides // *Amino acids*. 2010. V. 39. № 1. P. 285-296.
1245. Яшин А., Яшин Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография маркеров окислительного стресса // *Аналитика*. 2011. № 1. С. 34-43.
1246. Kushner D. J. Growth and nutrition of halophilic bacteria // In: Vreeland R. H., Hochstein L. I. (eds). *The biology of halophilic bacteria*. CRC Press, Boca Raton. 1993. P. 87-103.
1247. Atlas R.M. *Handbook of microbiological media*, fourth ed. CRC press, Boca Raton. 2010.
1248. Lewinska A., Wnuk M., Slota E., Bartosz G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007. № 34(8). P. 781-786.
1249. Варшавский Б. Я., Галактионова Л. П., Кореновский Ю. В. *Химия и биохимия свободно-радикального окисления: учеб. пособие для студентов 2-го курса лечебного, педиатрического и медико-профилактического факультетов*. Барнаул: Издательство Алтайский государственный медицинский университет, 2007. 57 с.
1250. Oesterhelt D., Krippahl G. // *Febs letters*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam. October 1973. V. 36. № 1. P. 72-76.
1251. Hartmann R., Oesterhelt D. // *Eur. Biochem*, 1977. V. 77. P. 325-335.
1252. Halliwell B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? // *Trends in biochemical sciences*. 1999. V. 24. №. 7. P. 255-259.
1253. Gibreel A., Sandercock J. R., Lan J., Goonewardene L. A., Zijlstra R. T., Curtis J. M., Bressler D. C. Fermentation of barley by using *Saccharomyces cerevisiae*: examination of barley as a feedstock for bioethanol production and value-added products // *Applied and environmental microbiology*, 2009. № 75(5). P. 1363-1372.
1254. Goldberg I. *Single cell protein (Vol. 1)*. Springer Science & Business Media. 2013.
1255. Kedia G., Wang R., Patel H., Pandiella S. S. Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties // *Process Biochemistry*. 2007. № 42(1). P. 65-70.

1256. de Valdez G. F., Gerez C. L., Torino M. I., Rollán G. New trends in cereal-based products using lactic acid bacteria // In: Mozzi F., Raya R. R. and Vignolo G. M. (eds). *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Oxford, UK: Blackwell Publishing. 2010. P. 273-287.

1257. Evers A. D., O'Brien L., Blakeney A. B. Cereal structure and composition // *Australian Journal of Agricultural Research*. 1999. № 50(5). P. 629-650.

1258. Kong X., Zhou H., Qian H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates // *Food Chemistry*. 2007. № 102(3). P. 759-763.

1259. Kagliwal L. D., Survase S. A., Singhal R. S., Granström T. Wheat flour based propionic acid fermentation: An economic approach // *Bioresource technology*. 2013. № 129. P. 694-699.

1260. Wang P., Johnston D. B., Rausch K. D., Schmidt S. J., Tumbleson M. E., Singh V. Effects of protease and urea on a granular starch hydrolyzing process for corn ethanol production // *Cereal Chem*. 2009. № 86(3). P. 319-322.

1261. Delest V., Edens L., Kortes J. G., Naeye T. J. B. Protein hydrolysates : пат. 6875456 CIIIA. 2005.

1262. Slabbekoorn J. C., De Meester J. W. G., Vercouteren J. S., Schot C. J. M., Van Cauteren A. F., Delrue R., Fox E. J., Shandera D. L. J., Anderson C. P., Bell E. Protein concentrate and an aqueous stream containing water-soluble carbohydrates : пат. 9226515 CIIIA. 2016.

1263. Cai M., Lin F., Liu Y., Zhang H., Gu R., Lu J., Wei Y. Corn active peptide additive for cell culture medium : пат. 9534026 CIIIA. 2017.

1264. De Castro R. E., Maupin-Furlow J. A., Giménez M. I., Herrera Seitz M. K., Sánchez J. J. Haloarchaeal proteases and proteolytic systems // *FEMS microbiology reviews*. 2006. № 30(1). P. 17-35.

1265. Kochish I. I., Naidenskiy M. S., Totoevva M. E. Efficacy of the immunostimulating Baxinum-vet preparation poultry (article in Russian) // *Poultry and chicken products*. 2008. № 5. P. 29–31.

1266. Staroselov M. A., Basova N. Y., Skhatum A. K., Fedorov Yu. E., Pachina V. V., Markov A. N. Effect of prebiotic Baxinum-vet on the intestinal microbiocenosis of newborn calves (article in Russian) // Russian Journal Problems on Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology. 2016. № 1. P. 72–75.

1267. Vasil'ev I. K. Baxinum (book in Russian). Nikopharm, Moscow. 2007.

1268. Sakane T., Fukuda I., Itoh T., Yokota A. Long-term preservation of halophilic archaeobacteria and thermoacidophilic archaeobacteria by liquid drying // J Microbiol Methods. 1992. № 16. P. 281-287.

1269. Tindall B. J. (1991) Cultivation and preservation of members of the family *Halobacteriaceae* // World J Microbiol Biotechnol. 1991. № 7. P. 95–98.

1270. Goh F., Jeon Y. J., Barrow K., Neilan B. A., Burns B. P. Osmoadaptive strategies of the archaeon *Halococcus hamelinensis* isolated from a hypersaline stromatolite environment // Astrobiol. 2011. № 11. P. 529–536.

1271. Kottemann M., Kish A., Iloanusi C., Bjork S., DiRuggiero J. Physiological responses of the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC1 to desiccation and gamma irradiation // Extremophiles 2005. № 9. P. 219–227.

1272. Salin M. L., Brown-Peterson N. J. Dealing with active oxygen intermediates: a halophilic perspective // Cell Mol Life Sci. 1993. № 49. P. 523–529.

1273. Fendrihan S., Bérces A., Lammer H., Musso M., Rontó G., Polacsek T. K., Holzinger A., Kolb C., Stan-Lotter H. Investigating the effects of simulated Martian ultraviolet radiation on *Halococcus dombrowskii* and other extremely halophilic archaeobacteria // Astrobiol. 2009. № 9. P.104–112.

1274. Gruber C., Legat A., Pfaffenhuemer M., Radax C., Weidler G., Busse H. J., Stan-Lotter H. *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum* // Extremophiles. 2004. № 8. P. 431–439.

1275. Jaakkola S. T., Zerulla K., Guo Q., Liu Y., Ma H., Yang C., Bamford D. H., Chen X., Soppa J., Oksanen H. M. Halophilic archaea cultivated from surface sterilized middle-late Eocene rock salt are polyploid // PLoS One. 2014. № 9. P. 1-9.

1276. Schuck P., Dolivet A., Méjean S., Hervé C., Jeantet R. (2013) Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders // *Int Dairy J.* 2013. № 31. P. 12–17.

1277. Behboudi-Jobbehdar S., Soukoulis C., Yonekura L., Fisk I. Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748 // *Drying Technol.* 2013. № 31. P.1274–1283.

1278. Golowczyc M. A., Silva J., Abraham A. G., De Antoni G. L., Teixeira P. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying // *Lett Appl Microbiol.* 2010. № 50. № 7–12.

1279. Leach G., Oliveira G., Morais R. Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a β -carotene rich powder // *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1998. № 20. P. 82–85.

1280. Raposo M. F. J., Morais A. M. M. B., Morais R. M. S. C. Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass // *World J Microbiol Biotechnol.* 2012. № 28. P. 1253–1257.

1281. Samborska K., Witrowa-Rajchert D., Gonçalves A. Spray-drying of α -amylase—The effect of process variables on the enzyme inactivation // *Drying Technol.* 2005. № 23. P. 941–953.

1282. Lavari L., Ianniello R., Páez R., Zotta T., Cuatrin A., Reinheimer J., Parente E., Vinderola G. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying // *LWT Food Sci Technol.* 2015. № 63. P. 322–330.

1283. Teixeira P., Castro H., Kirby R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus* // *J Appl Bacteriol.* 1995. № 78. P. 456–462.

1284. Desmond C., Stanton C., Fitzgerald G. F., Collins K., Ross R. P. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying // *Int Dairy J.* 2001. № 11. P. 801–808.

1285. Kosanke J. W., Osburn R. M., Shuppe G. I., Smith R. S. Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial populations // *Can J Microbiol.* 1992. № 38. P.520–525.

1286. Fu W. Y., Etzel M. R. (1995) Spray drying of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 and cellular injury // *J Food Sci.* 1995. № 60. P.195–200.

1287. Gong P., Zhang L., Han X., Shigwedha N., Song W., Yi H., Du M., Cao C. Injury mechanisms of lactic acid bacteria starter cultures during spray drying: A review // *Drying Technol.* 2014. № 32. P. 793–800.

1288. Teixeira P., Castro H., Kirby R. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage // *Lett Appl Microbiol.* 1996. № 22. P. 34–38.

1289. Chen G.Q., Jiang X.R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria // *Current opinion in biotechnology.* Netherlands. 2018. V. 50. P. 94-100.

1290. Thorwall S., Schwartz C., Chartron J.W., Wheeldon I. Stress-tolerant non-conventional microbes enable next-generation chemical biosynthesis // *Nature chemical biology.* United Kingdom. 2020. № 16(2). P. 113-121.

1291. Ventosa A., Márquez M.C., Garabito M.J., Arahál D.R. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments // *Extremophiles.* Germany. 1998. № 2(3). P. 297-304.

1292. Panosyan H., Hakobyan A., Birkeland N.K., Trchounian A. Bacilli community of saline–alkaline soils from the Ararat Plain (Armenia) assessed by molecular and culture-based methods // *Systematic and applied microbiology.* Netherlands. 2018. №41(3). P. 232-240.

1293. Д.Г.Звягинцев, Г.М.Зенова. Актиномицеты засоленных и щелочных почв. М.: «Книжный дом Университет», 2007. 107 с.

1294. Lowenstam H.A. Minerals formed by organisms // *Science.* 1981. № 211(4487). P. 1126-1131.

1295. Hamilton W.A. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis // *Biofouling*. 2003. № 19(1). P. 65-76.

1296. Sharaky A.M., Mohamed N.S., Elmashad M.E., Shredah N.M. Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of sandy soil // *Constr. Build. Mater.* 2018. № 190. P. 861-869.

1297. Wiktor V., Jonkers H.M. Bacteria-based concrete: from concept to market // *Smart. Mater. Struct.* 2016. № 25(8). P. 1-8.

1298. Zhao X., Wang M., Wang H., Tang D., Huang J., Sun Y. Study on the remediation of Cd pollution by the biomineralization of urease-producing bacteria // *Int. J. Environ. Res.* 2019. № 16(2). P. 1-14.

1299. De Belie N., Wang J., Bundur Z.B., Paine K. Bacteria-based concrete // In: Pacheco-Torgal F., Melchers R., de Belie N., Shi X., Van Tittelboom K., Saez Perez A. (eds) *Eco-efficient Repair and Rehabilitation of Concrete Infrastructures*. Woodhead Publishing, Duxford, UK. 2018. P. 531–567.

1300. Castro M.J., Lopez C.E., Narayanasamy R., Luevanos-Escareno M. P., Fajardo G. J., Balagurusamy N. Potential of enzymes (urease & carbonic anhydrase) // *Chim. Oggi. Chem.* 2016. № 34(4). P. 56-59.

1301. Wang Z., Zhang N., Cai G., Jin Y., Ding N., Shen D. Review of ground improvement using microbial induced carbonate precipitation (MICP) // *Mar. Georesour. Geotechnol.* 2017. № 35(8). P. 1135-1146.

1302. Mazzei L., Cianci M., Benini S., Bertini L., Musiani F., Ciurli S. Kinetic and structural studies reveal a unique binding mode of sulfite to the nickel center in urease // *J. Inorg. Biochem.* 2016. № 154. P. 42-49.

1303. Mondal S., Ghosh A. D. Review on microbial induced calcite precipitation mechanisms leading to bacterial selection for microbial concrete // *Constr. Build. Mater.* 2019. № 225. P. 67-75.

1304. De Muynck W., Cox K., De Belie N., Verstraete W. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete // *Constr. Build. Mater.* 2008. № 22(5). P.

1305. Basheer P. A. M., Basheer L., Cleland D. J., Long A. E. Surface treatments for concrete: assessment methods and reported performance // *Constr. Build. Mater.* 1997. № 11(7-8). P. 413-429.

1306. Basheer L., Cleland D.J. Freeze–thaw resistance of concretes treated with pore liners // *Constr. Build. Mater.* 2006. № 20(10). P. 990-998.

1307. Krishnapriya S., Babu D. V. Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete // *Microbiol. Res.* 2015. № 174. P. 48-55.

1308. Kushwaha B., Jadhav I., Verma H.N., Geethadevi A., Parashar D., Jadhav K. Betaine accumulation suppresses the *de-novo* synthesis of ectoine at a low osmotic concentration in *Halomonas* sp SBS 10, a bacterium with broad salinity tolerance // *Mol. Biol. Rep.* 2019. № 46(5). P. 4779-4786.

1309. Obeidat M. Isolation and characterization of extremely halotolerant *Bacillus* species from Dead Sea black mud and determination of their antimicrobial and hydrolytic activities // *Afr. J. Microbiol. Res.* 2017. № 11(32). P. 1303-1314.

Приложение 1

Таблица П1. Аминокислотные профили питательных сред на основе очищенных ферментолизатов (№№ 1, 2, 3 – пшеничная крупа, Протосубтилин ГЗх; №№ 4, 5, 6 – кукурузная крупа, Protex 40E) до (№№ 1, 4) и после (№№ 2, 3 5, 6) культивирования *Hbt. salinarum* 353П без добавления (№№ 2, 5) и с добавлением (№№ 3, 6) в среду солей металлов.

АК	АК в образце, г/л					
	№1	№2	№3	№4	№5	№6
Asp	0,32	0,22	0,17	0,39	0,16	0,12
Thr	0,20	0,11	0,08	0,16	0,07	0,04
Ser	0,38	0,18	0,13	0,22	0,07	0,05
Glu	3,37	2,12	1,77	1,00	0,65	0,43
Pro	1,27	0,87	0,68	0,41	0,13	0,03
Gly	0,35	0,27	0,19	0,16	0,08	0,06
Ala	0,26	0,10	0,08	0,42	0,10	0,06
CySS	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
Val	0,32	0,12	0,08	0,21	0,09	0,06
Met	0,06	0,02	0,01	0,06	0,00	0,01
Ile	0,24	0,07	0,04	0,16	0,05	0,03
Leu	0,53	0,18	0,10	0,59	0,16	0,09
Tyr	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01
Phe	0,34	0,16	0,14	0,19	0,08	0,06
ОН-К	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Orn	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
Lys	0,17	0,11	0,05	0,12	0,04	0,03
His	0,17	0,12	0,09	0,11	0,08	0,06
Arg	0,26	0,12	0,07	0,14	0,06	0,04
Trp	0,06	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01
Сумма	8,34	4,83	3,72	4,38	1,87	1,21

* Цистеина (Cys) < чем 1 мг/л, указано содержание цистина (CySS)

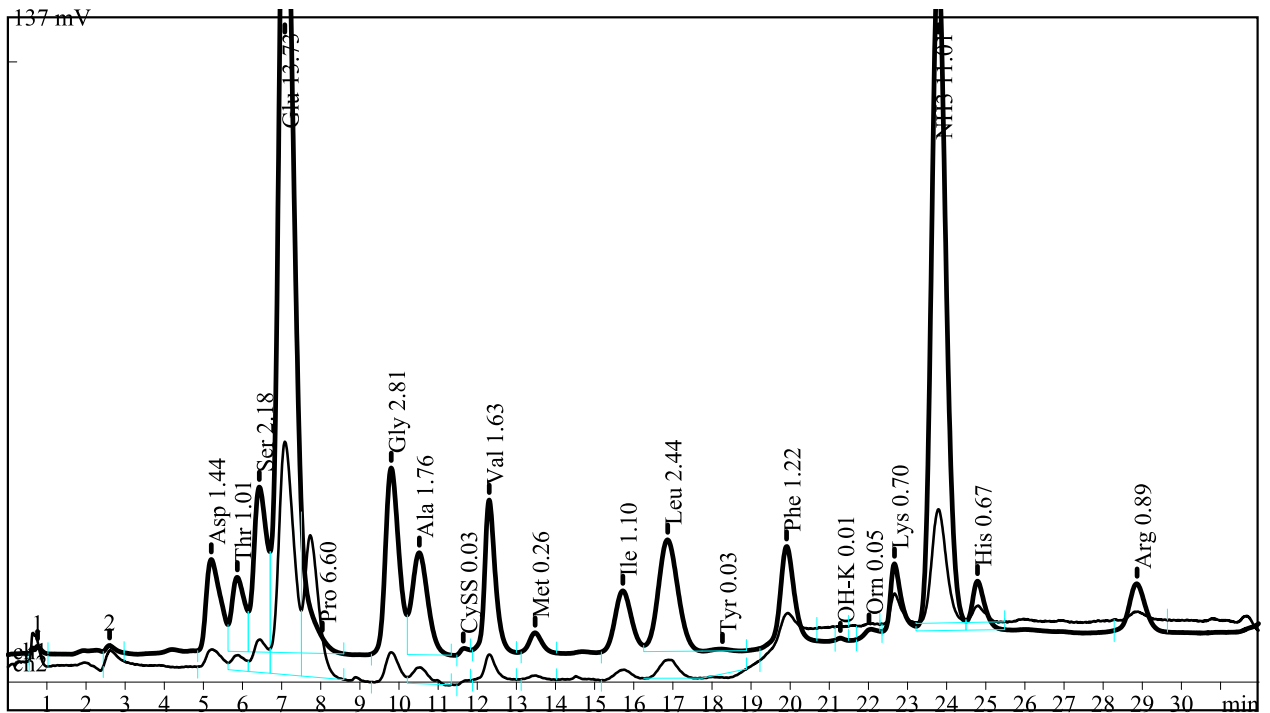


Рисунок П1.1. Хроматограмма аминокислотного анализа образца № 1 (Таблица П1).

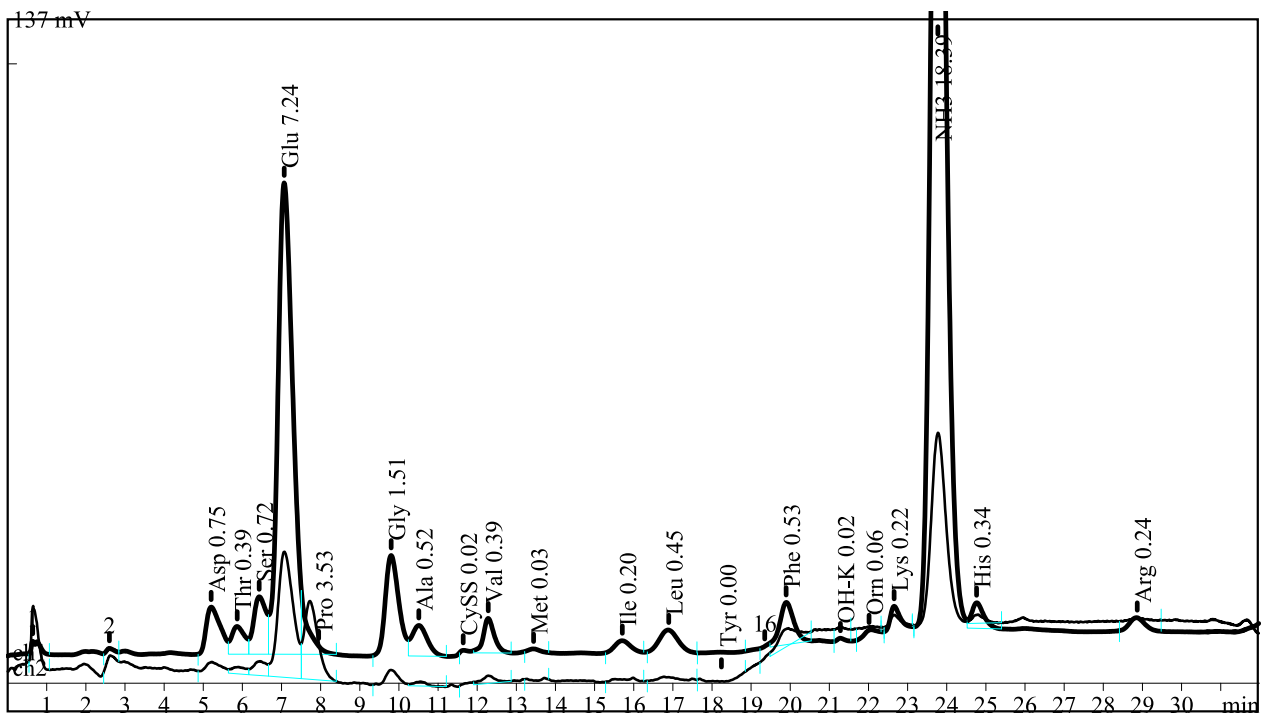


Рисунок П1.2. Хроматограмма аминокислотного анализа образца № 3 (Таблица П1).

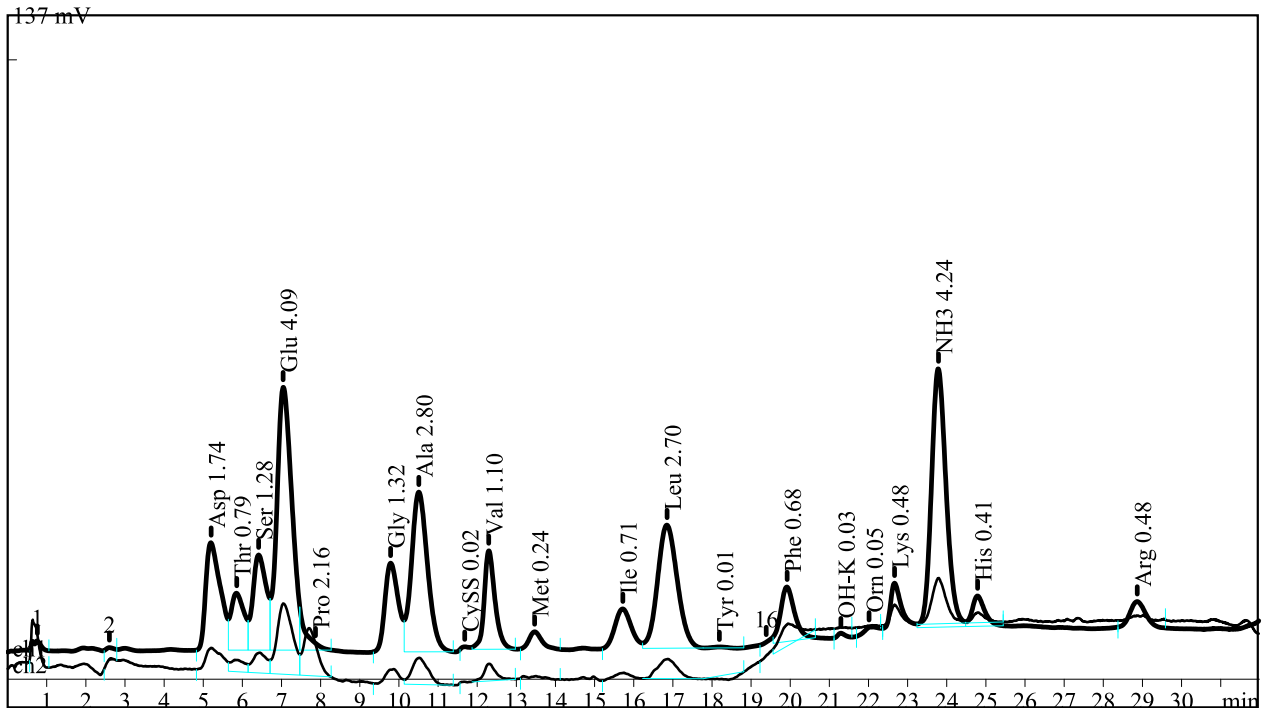


Рисунок П1.3. Хроматограмма аминокислотного анализа образца № 4 (Таблица П1).

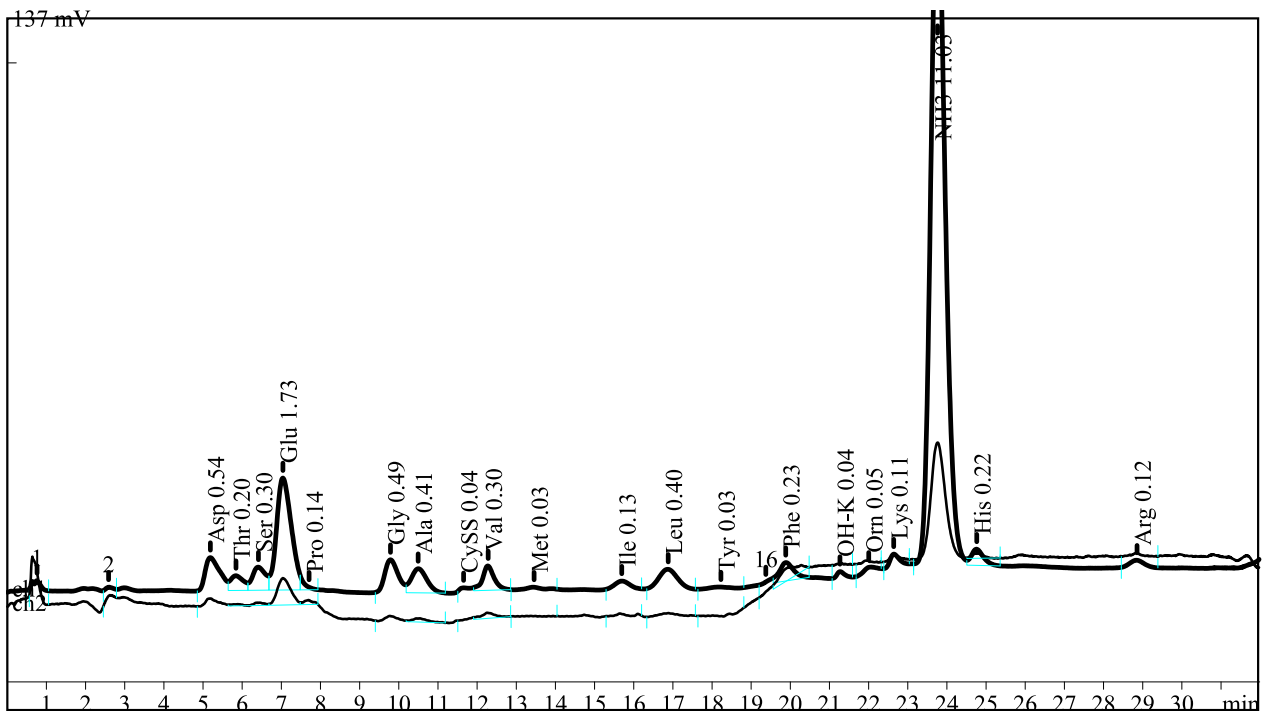


Рисунок П1.4. Хроматограмма аминокислотного анализа образца № 6 (Таблица П1).

Таблица П2.1. Расчет концентрации каротиноидов в биомассе с использованием ИНС, вариант культивирования А.

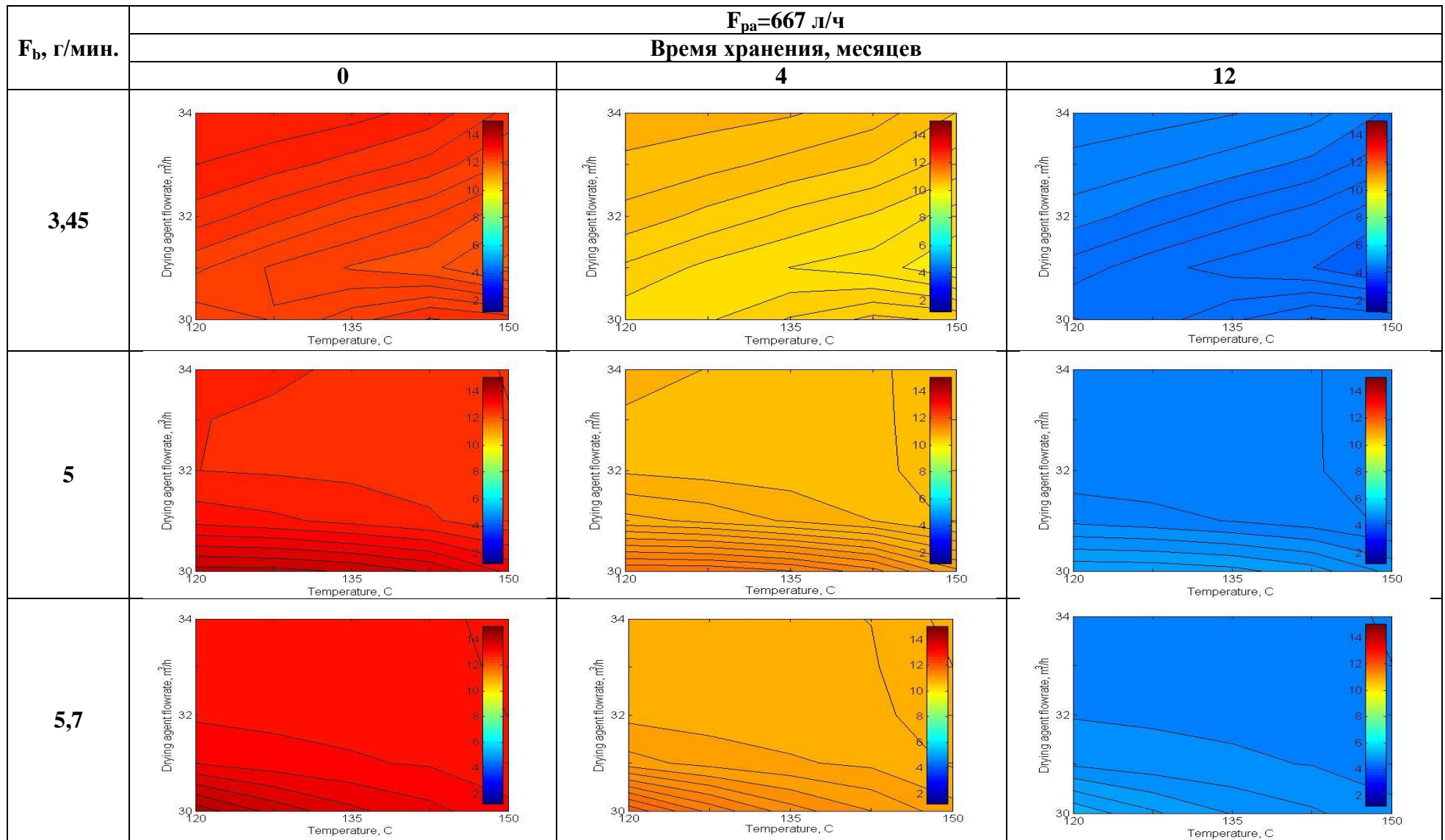


Таблица П2.1. (продолжение). Расчет концентрации каротиноидов в биомассе с использованием ИНС, вариант культивирования А.

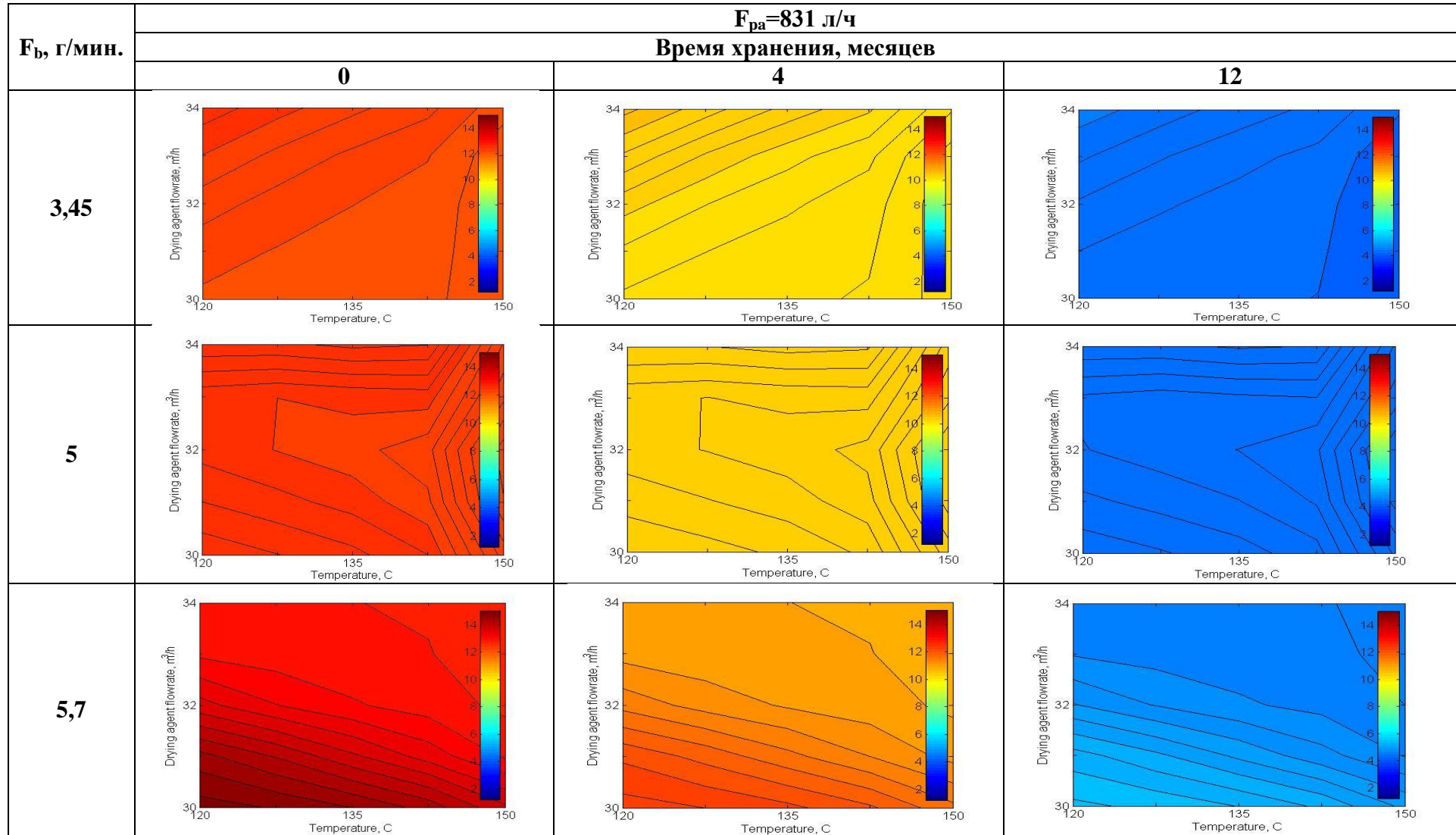


Таблица П2.1. (продолжение). Расчет концентрации каротиноидов в биомассе с использованием ИНС, вариант культивирования А.

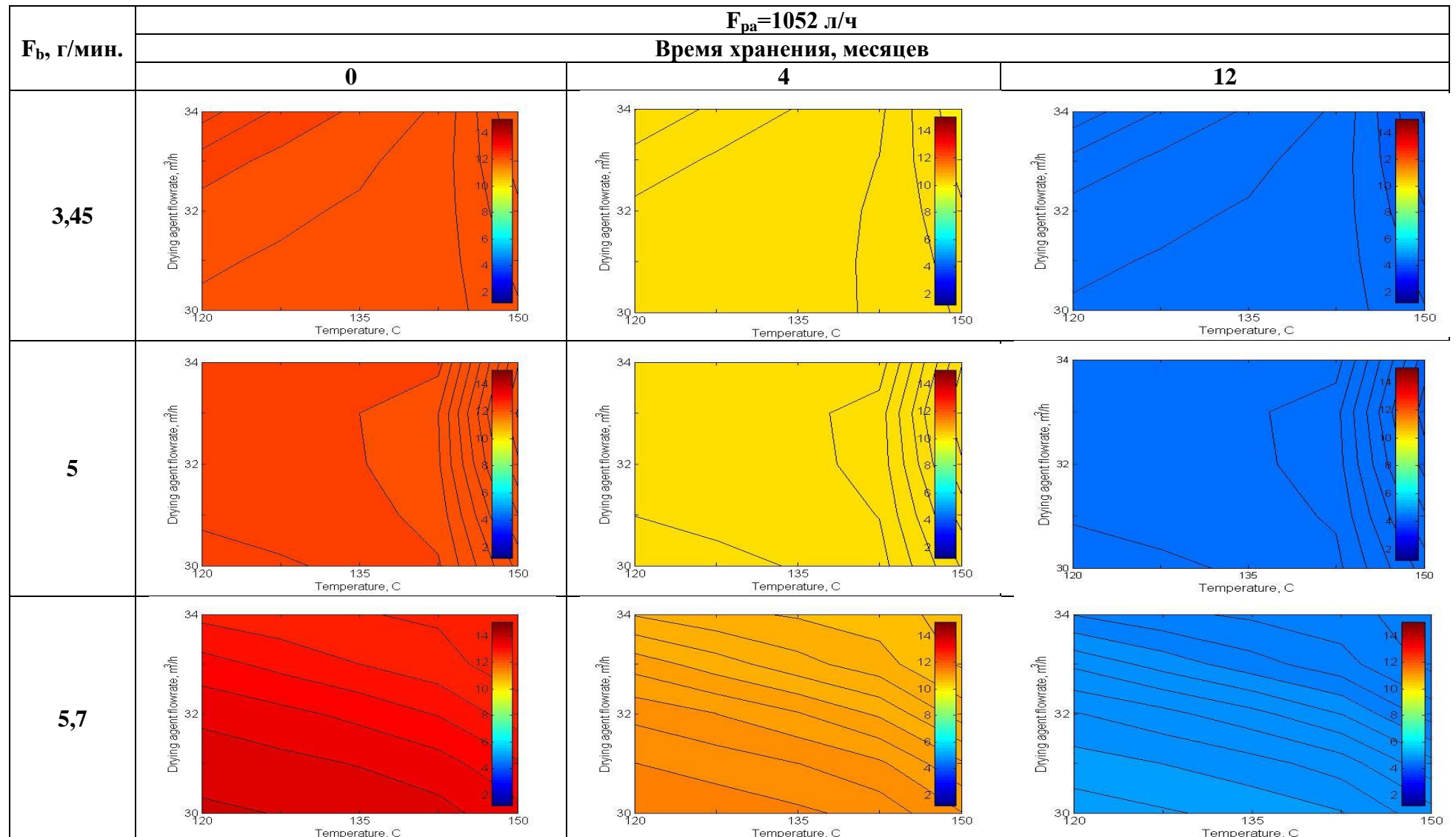


Таблица П2.2. Расчет концентрации каротиноидов в биомассе с использованием ИНС, вариант культивирования В.

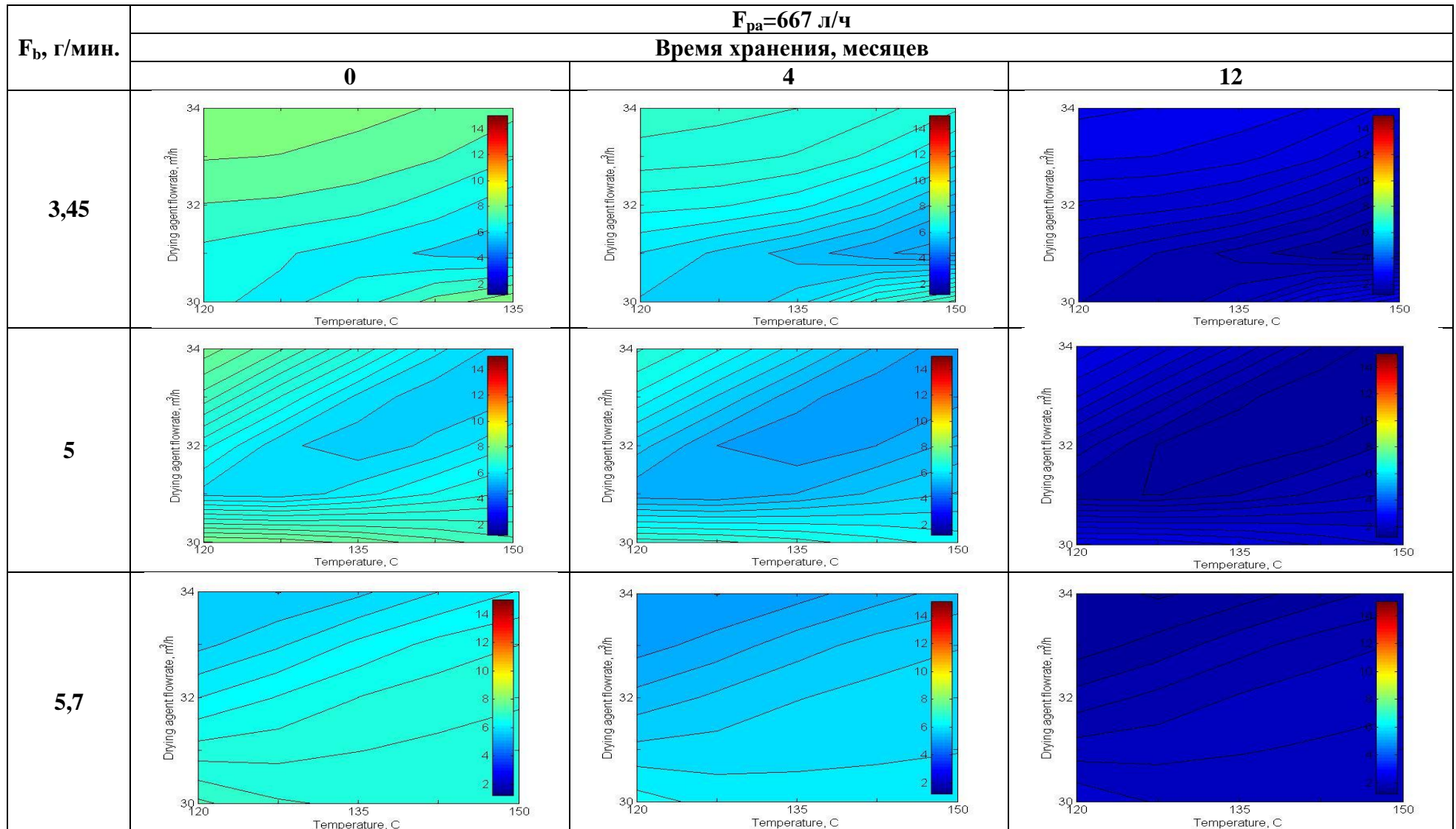


Таблица П2.2. (продолжение). Расчет концентрации каротиноидов в биомассе с использованием ИНС, вариант культивирования В.

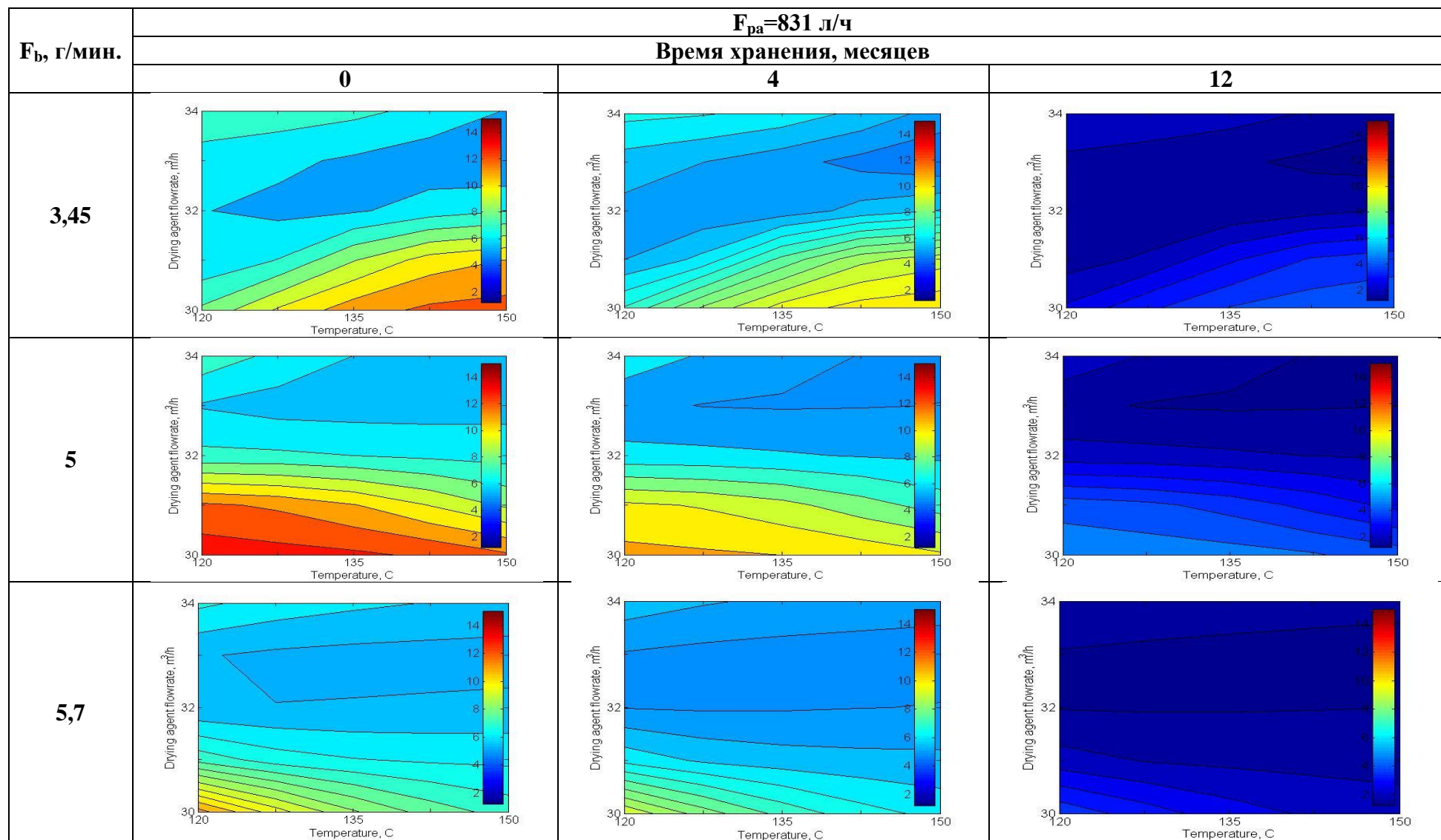
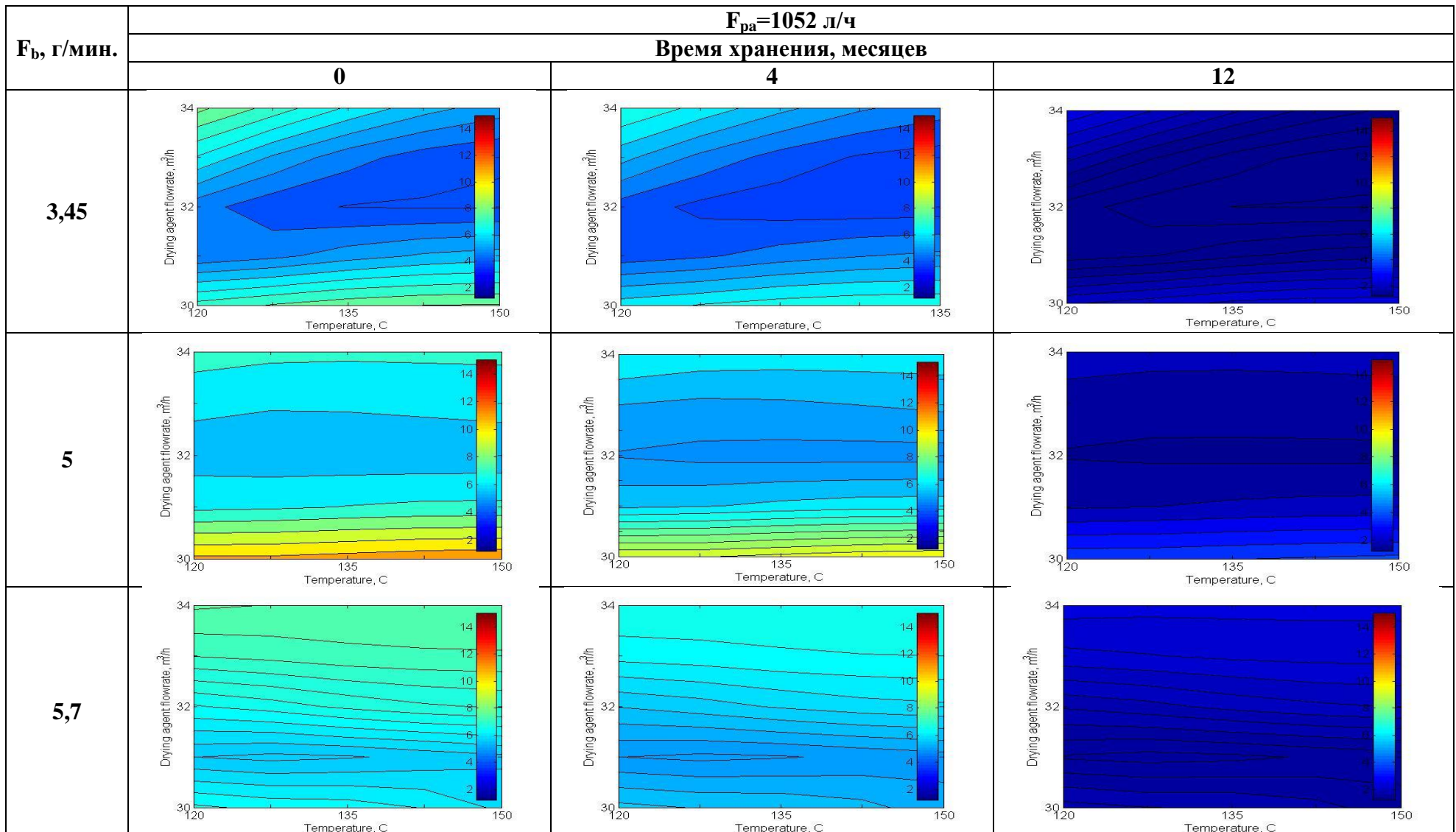
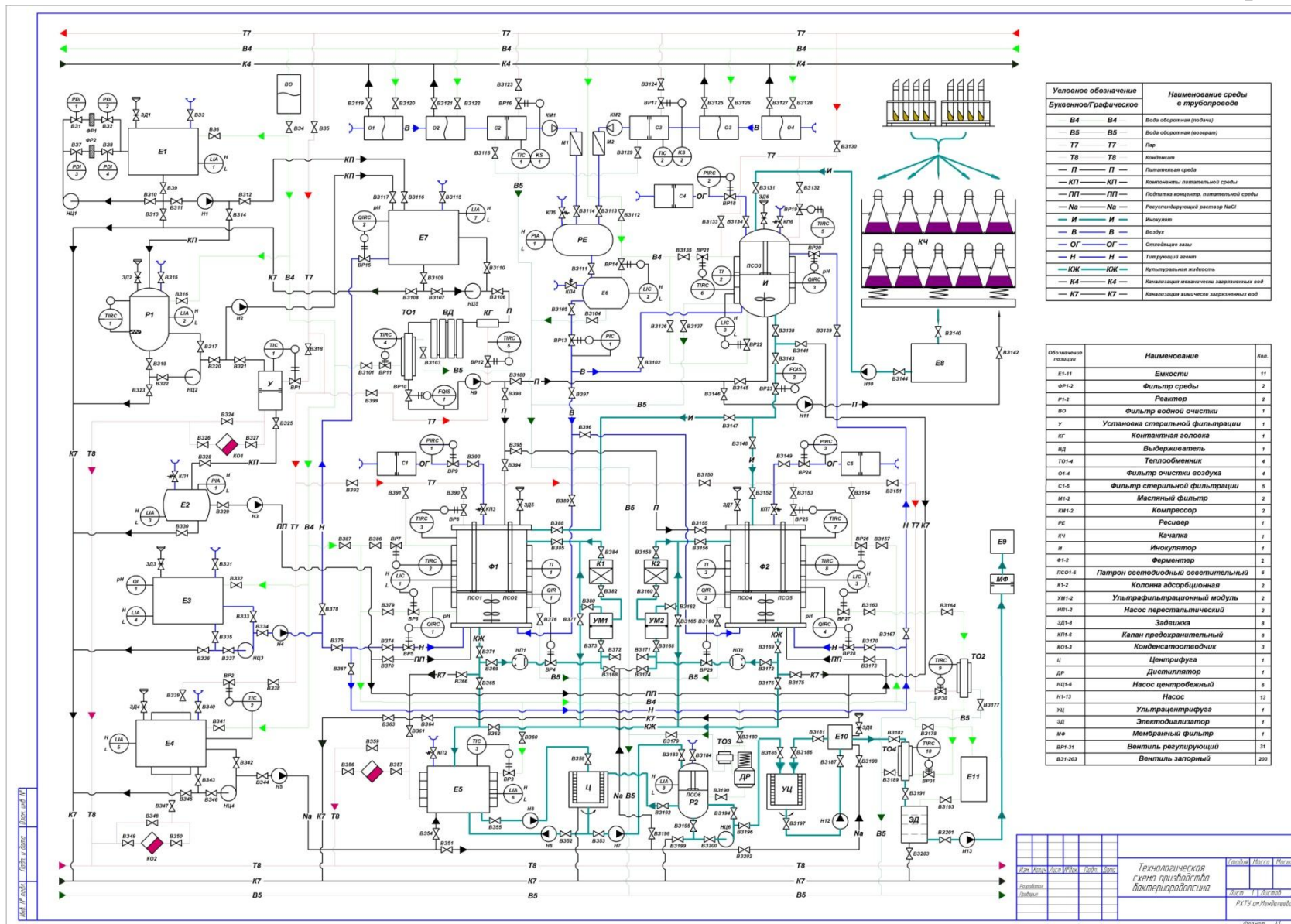


Таблица П2.2. (продолжение). Расчет концентрации каротиноидов в биомассе с использованием ИНС, вариант культивирования В.





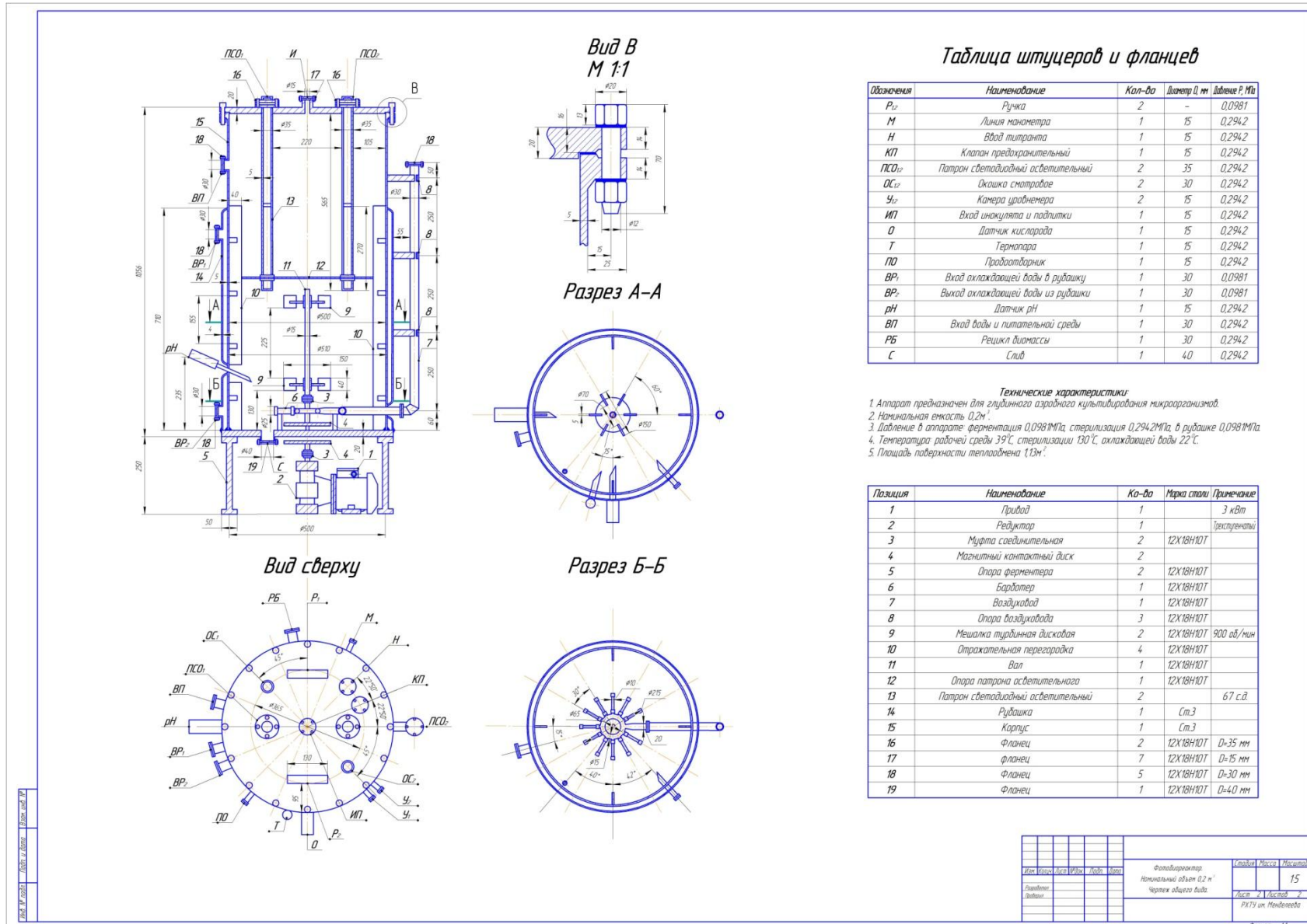


Рисунок ПЗ.2. Фотобиореактор для производства бактериородопсина. Чертеж общего вида.

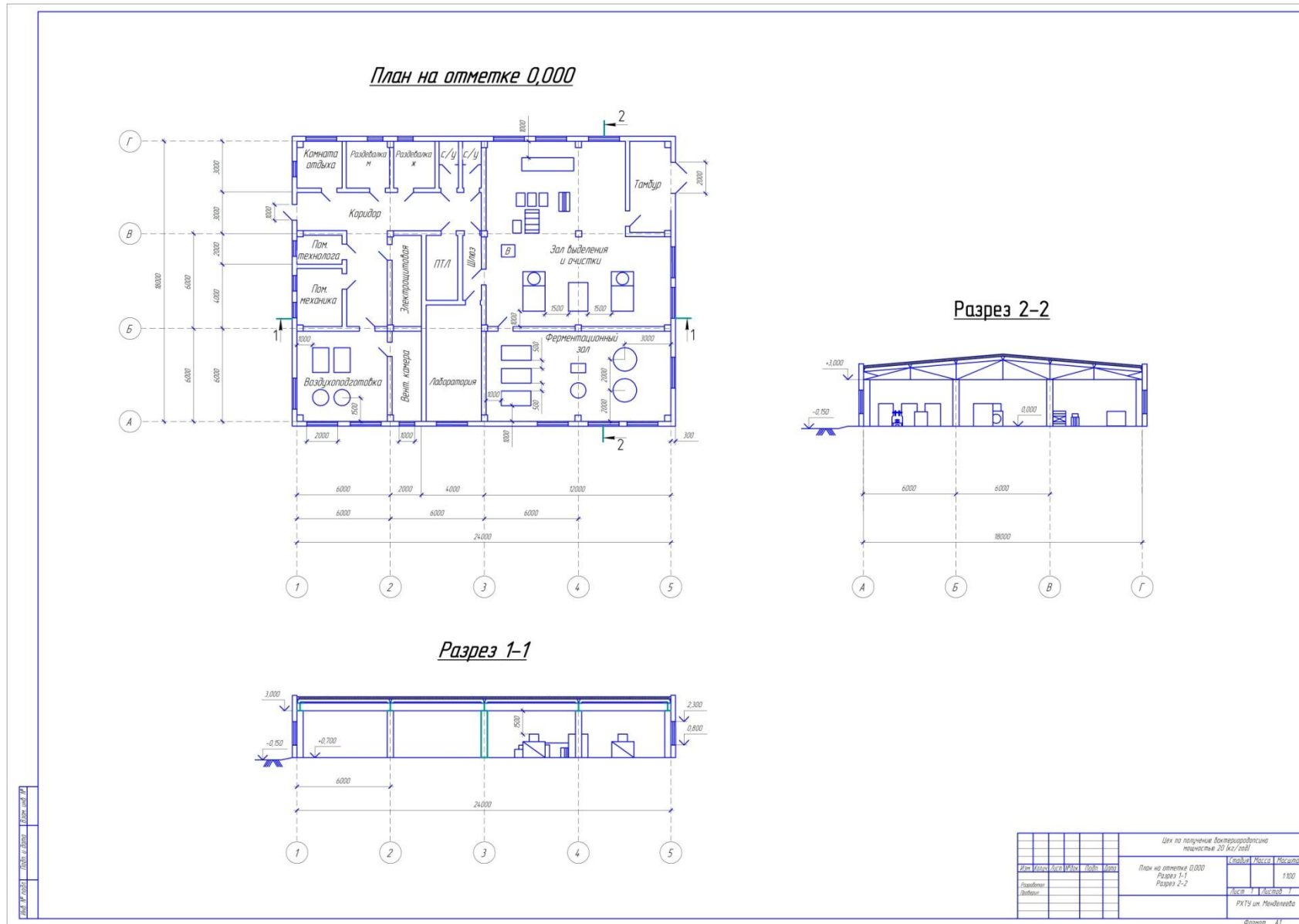


Рисунок ПЗ.3. Цех по производству бактериородопсина.

Таблица П4.1. Спецификация комплекса культивирования.

Поз.	Наименование	Технические характеристики	Ед. изм.	Количество
1	Ферментер “Фермус”	V=10 л, с двухъярусной лопастной мешалкой, внутренними теплообменниками, магнитным приводом	шт.	1
2	Термостат LT-TWC/7	Циркуляционный Labtech, с блоком микропроцессорного управления, 4 л/мин., точность $\pm 0,1$ °С, диапазон температур от комнатной до 100 °С, V=3,6 л, мощность 2000 Вт	шт.	1
3	Воздушный компрессор SERA air plus550	Регулируемый четырёхканальный, производительность до 550 литров/час, мощность 8 Вт, подключение 220В	шт.	1
4	Привод мешалки с двигателем PIK 12-3/10-1	Двигатель постоянного тока с возбуждением от постоянных высокоэффективных ферритных магнитов, которые обеспечивают большую перегрузку по току и вращающему моменту, питание, вращающий момент, обороты: 30V-1.5Nm, 1100 об/мин, большой пусковой момент (3Nm), максимальный импульсный ток 60А.	шт.	1
5	Трансформатор TDGC2	Автотрансформатор однофазный для регулирования напряжения от 0 до 260 В, предельный ток нагрузки 8А	шт.	1
6	Тиристорный привод	Вых. мощность 1,5кВт, 0-36В, с ручным и внешним регулированием 0-5 В.	шт.	1
8	Насос подачи питательной среды BT100-2J	Расход: 0.0002 – 380 мл/мин, лабораторный перистальтический насос, скорость: 0,1-100 об/мин (прямое и обратное вращение), шаг регулировки: 0,1 об/мин, цифровой канал управления: RS-485, управление по внешнему сигналу: старт/стоп, прямой/обратный ход, 0-5 В, 0-10 В, 4-10 мА, потребляемая мощность: 30 Вт	шт.	1
9	Насос отбора к/ж BT100-2J	Расход: 0.0002 – 380 мл/мин, лабораторный перистальтический насос, скорость: 0,1-100 об/мин (прямое и обратное вращение), шаг регулировки: 0,1 об/мин, цифровой канал управления: RS485, управление по внешнему сигналу: старт/стоп, прямой/обратный ход, 0-5 В, 0-10 В, 4-10 мА, потребляемая мощность: 30 Вт	шт.	1

10	Модуль ультраfiltrации NFY-4040C	Рабочее давление - 1...6 бар, производительность - до 1000 л/ч, степень фильтрации - 0,01 мкм, площадь фильтрации 5,0 м ² , габариты: Ф116×1085, подсоединение: вход 3/4"вр, выход 1/2"вр, дренаж 3/4"вр, комплектация: корпус из нержавеющей стали, ультраfiltrационная мембрана, два держателя, набор трубок, фитингов, манометр	шт.	1
11	Насос рецикла культуральной жидкости WT600-2J через модуль ультраfiltrации	Расход до 6 л/мин в зависимости от сечения шланга, перистальтический насос, скорость: 60-600 об/мин (прямое и обратное вращение), шаг регулировки: 1 об/мин, управление по внешнему сигналу: старт/стоп, прямой/обратный ход, скорость вращения (0-5 В, 0-10 В, 4-10 мА и 0-10 КГц опционально), цифровой канал управления: RS-485, потребляемая мощность: 48 Вт	шт.	1
14	Датчик растворенного кислорода рО ₂	Гальванического типа, диапазон измерения концентрации растворенного кислорода 0-100% от насыщения	шт.	1
15	Датчик pH Inlab InPro2000	Диапазон измерения 0-14 ед., комбинированный, стерилизуемый 0-140° С, давление до 3 бар	шт.	1
17	Насос подтитровки В3-V PER 12 TRAT.ACQUE	Перистальтические насос с регулируемой производительностью 0-100% (до 12 л/ч) серия В V, постоянный ON/OFF режим дозирования, кнопка вкл/выкл электропитания, индикатор работы, четыре ролика, защитная крышка из поликарбоната, в комплекте фильтр забора, инжектор, шланги	шт.	1
19	Измерительный модуль ввода МВА-8	Восьмиканальный универсальный измерительный модуль ввода для распределенных систем управления в сети RS-485.	шт.	1
20	Модуль управления МВУ-8	Восьмиканальный модуль управления исполнительными механизмами для распределенных систем в сети RS-485 (протоколы ОВЕН, Modbus, DCON), с релейными, 4-20 мА выходами.	шт.	1
21	Нормализатор pH – MB-110.224-pH	Измерение значения pH контролируемой среды (показателя активности ионов водорода), либо значения окислительно-восстановительного потенциала (Eh)	шт.	1
22	Блок питания БП60Б-Д4-24	Блок питания серии БП60 предназначен для питания стабилизированным напряжением постоянного тока различных широкого спектра радиоэлектронных устройств (60Вт, 24 В, 2 выхода)	шт.	1
23	Преобразователь интерфейса АС-4	Организация сети обмена данными с компьютером по интерфейсу RS-485, позволяет подключать к промышленной информационной сети RS-485	шт.	1

		персональный компьютер, имеющий USB-порт, служит для организации взаимодействия МВУ8, МВА8, МВ-110.224-рН с компьютером		
24	Персональный компьютер	С USB 2.0, с операционной системой Windows для управления процессом культивирования	шт.	1
26	Датчик уровня	Изготовлен из нержавеющей стали, устойчивой к солевым растворам, стержень диаметром 1-1,5 мм, покрытый фторопластом	шт.	1
Стерилизуемая термостойкая посуда				
7	Колба посевная	С нижним отводом и гладкой верхней горловиной V=500-700 мл посевная	шт.	1
12,13	Емкость стерилизуемая Duran GL45	Для подачи и отбора, рабочий V=10 л, термостойкая, оснащена 3-мя штуцерами для подключения силиконовых шлангов	шт.	2
16	Емкость стерилизуемая	Для подачи титрующего агента, рабочий V=0,5 л, термостойкая, оснащена штуцерами для подключения силиконовых шлангов	шт.	1
18	Колба-гидрозатвор	Со шлифом и насадкой с двумя выходами, один из которых опускается в жидкость, другой – выход воздуха, V=300-500 мл	шт.	1
Расходные материалы				
25	Фильтрующая насадка Миллекс	d=50 мм, d _{пор} =0,2 мкм, для фильтрации воздуха, выдерживающая стерилизацию паром при 130° С	упак.	1
Б/п	Силиконовая трубка	Размеры 17#, 36# (внутренние диаметры 6,4 мм, 9,6 мм; толщина стенки 1,6 мм, 2,5 мм соответственно)	м	2
Б/п	Трубка PHARMED	Размеры ВРТ 17#, ВРТ 25#, ВРТ 36# (внутренние диаметры 6,4 мм, 4,8 мм, 9,6 мм; толщина стенки 1,6 мм, 1,6 мм, 2,5 мм соответственно), длительный срок эксплуатации	м	2
Б/п	Зажим	Зажимы для силиконовых трубок нерегулируемые, металл, стерилизуемые	шт.	10

Последовательности 16S рРНК

>KY781162.1 *Halomonas utahensis* strain SK7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCAGCTCCTTCGG
 GAGGCTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCATGGGAACCTACCCAGTAGTGGGGGATAGCC
 CGGGGAAACCCGGATTAATACCGCATAACGCCCTGAGGGGGAAAGCGGGCTCCGGCTCGCGCTATT
 GGATGGGCCCATGTCGGATTAGTTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGC
 TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCT
 TAGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCAGGGAGGAAAAGCTGATCGTTAATACCGGTCAGTGTTGACGT
 TACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
 TTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTTGGTAAGCGAGTTGTGAAAGCCCCG
 GGCTCAACCTGGGAATGGCAATTCGAACTGCCAAGCTAGAATGCAGCAGAGGGCAGTGGAATTCC
 AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGCGACTGCCTGGGCT
 GACATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
 TGTAACGCTGAGAACTAGTCGTTGGGGCTATTAGAGCCTTAGTGACGCAGCTAACCGGATAAGT
 TCTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAAC
 TTGGTAGAGATACCTTGGTGCCTTCGGGAGCGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCC

>*Lysinibacillus macroides*

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTT
 GCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATA
 ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTACTTCATGGTGAAGGACTGAAAGACG
 GTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
 AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAA
 CTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGT
 CTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAA
 GAGGAAAGTGGAATTCGAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCG
 AAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAGACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCT
 GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG

> *Bacillus badius*

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACTTGACGGAAGCTTG
CTTCCGTTCAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT
AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATATTCTTTTTCTTCGCATGAAGAAGAATGGAAAGGC
GGCTTTTAGCTGTCRCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC
CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACGGAAGT
AACTGTCCGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGGCTTGAGTGCA
GAAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGTCTTGACATCCCGCTGACCGGTCTGGAGACAGGCCTTTCCCTTCGGGGACAGCGGTGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
TGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGT
ACAAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAG
GCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGG
GGTAACCTTACGGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGGCAGATGATTG

>*Bacillus licheniformis*

AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCT
TAGGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTA
GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCG
ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGG
CGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGA
GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTLAGTGCTGC
AGCAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT

CTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGC
ATGTTTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATC
TTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAA
AGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTG
CAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTA
ACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAA-GGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC

>*Bacillus subtilis* 1

GTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAT
GGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGA
CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACAT
AAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAC
CGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGG
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGT
GACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGG
ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGT
CGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTA

>*Chromohalobacter* sp.

TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGTCCAGCTT
GCTGGACGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCCAGTCGTGGGGGATA
ACCTGGGGAAACCCAGGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCGGGGGCTCTTCGGACCT
CGCGCGATTGGATGAGCCTATGTCCGATTAGCTGGTTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACG
ATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG

GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGA
AGAAGGCTTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTGGGGAAGAAGGCTTGCCGGCCAATACCCGGCAA
GAGCGACATCACCCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
GGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGGCGGCTTGTCACGCCGGGTGT
GAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACGGCATCCGGAACGGGCAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAA
GGTAGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCG
GCCTTCTGGACTGACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGTCCCTTGAGGACTTAGTGGCGCAGTTA
ACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACCCTTGAC
ATCCTGCGAACCCGGAAGAGATTCCGGGGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTATTT
GCCAGCGATTCCGTCGGGAACCTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACG
ACGTCA

>*Haloterrigena* sp.

TTCCGGTTGATCCTGCCGGAGGTCATTGCTATTGGAGTCCGATTTAGCCATGCTAGTTGCACGAGT
TTAGACTCGTAGCAGATAGCTCAGTAACACGTGGCCAAACTACCCTATGGATCCGAATAACCTCG
GGAAACTGAGGCTAATTCGGAATACGGCTCACACCTGGAGTGGTGTGAGCCCGAAACGCTCCGG
CGCCATAGGATGTGGCTGCGGCCGATTAGGTAGACGGTGGGGTAACGGCCCACCGTGCCATAAT
CGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGACGGTATCTGAGACAAGATACCGGGCCCTACGG
GGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACTGTCACGAAAGTGCATAAGGGGACTCCAAGTGCAGG
GCATATAGTCCTCGCTTTTTGCGACCGTAAGGTGGTTCGCGGAATAAGTGCTGGGCAAGACCGGTGC
CAGCCGCCGCGTAATACCGGCAGCACGAGTGATGACCGCTATTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTA
GCTGGCCGTGCAAGTCCATCGGGAAATCCGCGCGCTTAACGCGCGGGCGTCCGGTGGAAACTGCA
TGGCTTGGGACCGGAAGACCAGAGGGGTACGTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCCGTAATCCTGGAC
GGACCACCGGTGGCGAAAGCGCCTCTGGAAGACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTCGGGT
CACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCGAGCTGTAAACGATGTCTGCTAGGTGTGGCACAGG
CTACGAGCCTGTGTTGTGCCGCAGGGAAGCCGTGAAGCAGACCGCCTGGGAAGTACGTCCGCAAG
GATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACTACAACCGGAGGAGCCTGCGGTTTAATTGGACT
CAACGCCGGACATCTCACAGCATCGACAATGTGCAGTGAAAGTCAGGTTGATGACCTTACTGGA
GCCATTGAGAGGAGGTGCATGGCCGCCGTCAGCTCGTACCGTGAGGCGTCCCTGTTAAGTCAGGCA
ACGAGCGAGACCCGCACTCCTAATTGCCAGCAACACCTAGCGGTGGTTGGGTACATTAGGAGGAC
TGCCAGTGCCAAACTGGAGGAAGGAACGGGCAACGGTAGGTGAGTATGCCCCGAATGTGCTGGGC
GACACGCGGGCTACAATGGCCGAGACAGTGGGATGCAACCCCGAAAGGGGGCGCTAATCTCCGA
AACTCGGTGCTAGTTCGGATTGAGGGCTGAAACTCGCCCTCATGAAGCTGGATTCCGGTAGTAATCG
CGCCTCAGAAGGGCGCGGTGAATACGTCCCTGCTCCTTGACACACCCGCCCGTCAAAGCACCCGA
GTGGGGTCCGGATGAGGCCGACGCAACGTCCGGTCAATCTGGGCTCCGCAAGGGGGCTTAAGTCG
TAACA

Практическое использование результатов диссертационной работы



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

02.07.2020 № 85-01-11/533
На № _____ от _____

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
о депонировании**

Кому Общество с ограниченной ответственностью «Технологии галобактерий», Россия, 129226, г. Москва, улица Сельскохозяйственная, дом 12А, строение 4, эт. 3, пом. I, ком. 3.
наименование организации-депозитора, юридический адрес

Штамм *Halobacterium salinarum* SK-11 депонирован в ЦКП «Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения UNIQEM» (далее «Коллекция UNIQEM») на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) в связи с подачей заявки на оформление национального патента.

Регистрационный номер, присвоенный штамму U SK-11.

Штамм U SK-11 хранится в криобанке Коллекции UNIQEM (4 единицы хранения), а также поддерживается путем периодических пересевов.

К свидетельству о депонировании прилагается паспорт с научным описанием штамма и таксономическим определением.

Дата депонирования: 18.02.2020.

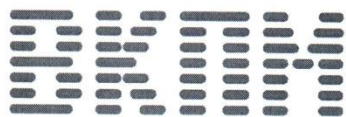
Заместитель директора
Биотехнологии РАН
по научной работе, д.б.н.



Пименов Н.В.

Руководитель
ЦКП «Коллекция UNIQEM»,
д.б.н., в.н.с.

Мулюкин А.В.



НАЦИОНАЛЬНЫЙ БИОРЕСУРСНЫЙ ЦЕНТР
Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов
ФГБУ «ГосНИИгенетика» Минобрнауки России

117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, ФГБУ «ГосНИИгенетика» тел: (495) 315-12-10 e-mail: vkpm@genetika.ru

12794

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ)
ФГБУ ГосНИИгенетика приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Halobacterium salinarum 353П-1

Дата депонирования: 30 января 2017 г.

Депозитор: ООО «Никофарм»

Продукты, продуцируемый штаммом (область применения штамма): С₅₀-каротиноиды группы бактериоруберина, бактериородопсин, ненасыщенные жирные кислоты.

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-12794

Директор ВКПМ



Синеокий С.П.

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «Технологии Галобактерий»**

Конфиденциальность гарантируется
получателем информации.

Экземпляр №_3_

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Технологии Галобактерий»

Скопцов Д.В. _____

"19" февраля 2020 г.



ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ
получения бактериородопсина и высушенной субстанции галоархей
Halobacterium salinarum

ОПР 20038045 - 01 - 20

Срок действия регламента до 18 февраля 2022 г

СОГЛАСОВАНО

Директор по производству
ООО «Технологии Галобактерий»

Королев С.А. _____

«19» февраля 2020 г.

Москва, 2020

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Технологии Галобактерий»

 Скопцов Д.В.

“25” февраля 2020 г.



АКТ

о внедрении результатов докторской диссертационной работы
Калёнова Сергея Владимировича

Комиссия в составе:

председатель: Скопцов Д.В. – генеральный директор ООО «Технологии Галобактерий»;

члены комиссии: Королев С.А. – директор по производству ООО «Технологии Галобактерий»,

составили настоящий акт о том, что результаты докторской диссертационной работы Калёнова С.В. “Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсоленых сред” использованы в опытно-промышленном регламенте получения бактериородопсина и высушенной субстанции галоархей *Halobacterium salinarum*.

Подходы, изложенные в докторской диссертации, позволили увеличить продуктивность культивирования экстремально галофильных архей, сократить затраты на выделение целевого продукта, увеличить срок хранения высушенной субстанции.

Председатель комиссии:

Генеральный Директор



Скопцов Д.В.

Члены комиссии:

Директор по производству



Королев С.А.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО "НПК "Креахим"

Нефедов П.А.

27/08 2019 г.



АКТ

о внедрении результатов докторской диссертационной работы
Калёнова Сергея Владимировича

Комиссия в составе:

председатель: Нефедов П.А. – генеральный директор ООО "НПК "Креахим";

члены комиссии:

Нефедова А.В. – заместитель генерального директора по производству;

Боровских С.И. – заведующий отделом автоматизации биотехнологических аппаратов;

Соколов В.А. – главный технолог сборочного цеха биотехнологического оборудования.

составили настоящий акт о том, что компонент докторской диссертационной работы Калёнова С.В. "Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсоленых сред" – программный комплекс "BioDrome 3.0" использован при автоматизации стенда УФ-004, а также УФС -50 для культивирования микроорганизмов в мембранном биореакторе как основное программное обеспечение, а также для разработки опытно-промышленного регламента эксплуатации автоматизированного комплекса с мембранным биореактором для культивирования микроорганизмов.

Возможности комплекса позволяют дистанционно в режиме реального времени контролировать процесс культивирования микроорганизмов, настраивать режимы непрерывного культивирования с применением мембранного мо-

дуля, анализировать полученные данные и обеспечивать корректировку процесса культивирования с помощью дружественного интерфейса

Председатель комиссии:

Генеральный директор

Нефедов П.А.

Члены комиссии:

Заместитель генерального
директора по производству

Нефедова А.В.

Заведующий отделом автоматизации
биотехнологических аппаратов

Боровских С.И.

Главный технолог сборочного цеха
биотехнологического оборудования

Соколов В.А.



Публичное акционерное общество «Газпром»
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРИРОДНЫХ ГАЗОВ И ГАЗОВЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ – ГАЗПРОМ ВНИИГАЗ»

(ООО «Газпром ВНИИГАЗ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель

Генерального директора по науке

ООО «Газпром ВНИИГАЗ»,

канд. тех. наук



А.З. Шайхутдинов

« 19 » _____ 2019 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ
НА ПОЛУЧЕНИЕ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
УРОБАКТЕРИЙ *Lysinibacillus macroides*

Начальник Корпоративного
научно-технического центра
экологической безопасности
и энергоэффективности,
канд. экон. наук

Н.Б. Пыстина

Начальник лаборатории
биотехнологических
исследований, канд. техн. наук

Н.С. Хохлачев

пос. Развилка,
Ленинский р-н, Московская обл., 2019

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Генерального директора
по науке ООО «Газпром ВНИИГАЗ»



канд. тех. наук

А.З. Шайхутдинов

2019 г.

АКТ

о внедрении результатов докторской диссертационной работы Калёнова Сергея Владимировича

Комиссия в составе:

председатель: Пыстина Н.Б. – Начальник Корпоративного научно-технического центра экологической безопасности и энергоэффективности;

члены комиссии: Хохлачев Н.С. – Начальник лаборатории биотехнологических исследований,

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы Калёнова С.В. “Биотехнология и применение микроорганизмов, выделенных из гиперсоленых сред”, представленной на соискание ученой степени доктора технических наук использованы в научно исследовательской деятельности лаборатории биотехнологических исследований Корпоративного научно-технического центра экологической безопасности и энергоэффективности ООО «Газпром ВНИИГАЗ».

Внедрение результатов докторской диссертационной работы позволило сократить затраты на проведение скрининга микробных сообществ, целенаправленно провести поиск микроорганизмов, обладающих высокой уреазной активностью и способностью к осаждению карбоната кальция для разработки биопрепарата, повышающего функциональные характеристики строительных материалов. Материалы диссертационной работы легли в основу лабораторного регламента получения биопрепарата

на основе уробактерий *Lysinibacillus macroides* для улучшения свойств строительных материалов на основе цемента.

Председатель комиссии:

Начальник Корпоративного научно-технического центра экологической безопасности и энергоэффективности

Н.Б. Пыстина

Члены комиссии:

Начальник лаборатории биотехнологических исследований

Н.С. Хохлачев