

## КАЛЬЦИНИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ ЮЖНОГО ПРИАРАЛЯ

© 2023 г. К. В. Кондрашева<sup>а</sup>, А. А. Умрузоков<sup>а</sup>, С. В. Калёнов<sup>б</sup>, А. Ю. Меркель<sup>с</sup>, Н. А. Черных<sup>с</sup>,  
А. И. Слободкин<sup>с</sup>, С. Н. Гаврилов<sup>с, \*</sup>, К. Д. Давранов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт микробиологии АН Республики Узбекистан, Ташкент, 100128 Узбекистан

<sup>б</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Кафедра биотехнологии,  
Факультет биотехнологии и промышленной экологии, Москва, 125480 Россия

<sup>с</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

\*e-mail: [snlavrilov@gmail.com](mailto:snlavrilov@gmail.com)

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 23.01.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2023 г.

Процессы микробно-индуцированного осаждения карбонатов кальция широко распространены в природных условиях и являются важной частью биогеохимического цикла углерода. Эти процессы легли в основу новых технологий “биоцементирования”, разработка которых активно ведется в последнее десятилетие по всему миру. Данные технологии направлены на создание новых “саможивляющихся” строительных материалов, а также на поддержание прочности различных сооружений и строительных конструкций. Оптимальными условиями для образования кальцитов являются повышенная соленость и щелочность среды, что вызвало интерес к поиску кальцинирующих микроорганизмов в разнообразных экосистемах, включая экстремальные. В настоящее время выделено и протестировано в полупромышленных условиях уже немало штаммов галофильных и галотолерантных бактерий, индуцирующих кальцинирование. Большинство этих бактерий обладает уреазной активностью, которая вносит основной вклад в связывание ионов кальция в нерастворимый карбонат кальция. Широкое разнообразие природных экосистем с оптимальными условиями для развития кальцинирующих уробактерий, а также экономическая востребованность технологий биоцементирования побуждает интерес к поискам все новых штаммов этих микроорганизмов. Одним из перспективных ресурсов для поиска таких организмов является экосистема высыхающего Аральского моря и прилегающего к нему пустынного и полупустынного региона Приаралья. В нашей работе мы приводим результаты скрининга различных экстремальных экосистем Аральского региона на наличие кальцинирующих микроорганизмов. Из образцов растительных остатков и почв Приаралья нами получено 28 чистых культур гетеротрофных аэробных бактерий, 4 из которых обладают уреазной и кальцинирующей активностями, дана сравнительная оценка их активности со штаммами, уже использованными для создания биоцементирующих препаратов. Методами молекулярной экологии детектированы филогены потенциальных кальцинирующих микроорганизмов в микробных сообществах пустынной почвы, термальных вод и донных отложений соленого озера, дано описание филогенетического разнообразия этих сообществ. Полученные результаты выявили широкое распространение кальцинирующих микроорганизмов в экосистемах Южного Приаралья и показали целесообразность поиска в них новых биотехнологически значимых штаммов этих организмов.

**Ключевые слова:** микробно-индуцированное осаждение кальцита, экстремальные экосистемы, Аральское море, биоцементирование

**DOI:** 10.31857/S0026365622600869, **EDN:** FWYKTA

На территории Узбекистана находится один из экстремальных биогеоценозов планеты — дно высыхающего Аральского моря. Резкое сокращение его акватории привело к повышению минерализации воды и концентрации минеральных удобрений и пестицидов, которые вымывались с орошаемых полей водами рек Амударья и Сырдарья в 1960–1990-е годы (Micklin, 2007). За время высы-

хания минерализация воды Арала повысилась на порядок — с десятков до сотен г/кг (Завьялов и соавт., 2012). В настоящее время на большей части Арала сформировалась новая песчано-солончак-овая пустыня Аралкум. Общей чертой почв этой области является высокая засоленность и крайняя нестабильность уровня влажности, вплоть до полного высыхания (Завьялов и соавт., 2012;

Давлетмуратова, 2017). Микрофлора почв этого типа обычно представлена солеустойчивыми, термостабильными и ксерофильными организмами, однако детальные исследования микробного разнообразия Аральского региона только разворачиваются. С учетом наличия сразу нескольких экстремальных для жизни физико-химических факторов в экосистеме Аралкума, населяющие ее микроорганизмы могут быть востребованы в различных областях биотехнологии, в частности, в технологиях “биоцементирования” при помощи микробно-индуцированного осаждения кальцита (МИОК, МІСР). Процессы МИОК широко распространены в природных условиях, являются важной частью биогеохимического цикла углерода и способствуют фиксации атмосферного  $\text{CO}_2$  в составе карбонатных осадочных пород. Глобальная геохимическая роль этого процесса заключается в превращении рыхлых осадков в твердые горные породы, а также в уплотнении грунтов и песков (Frankel, Bazyliniski, 2003; DeJong, 2013; Osinubi et al., 2020; Pacheco et al., 2022). Наиболее активное осаждение кальцита индуцируют уробактерии, осуществляющие гидролиз мочевины и мочевой кислоты (Joshi et al., 2017; Omoregie et al., 2021). Мочевина является конечным продуктом метаболизма азотсодержащих соединений у многих животных, поэтому данное соединение и утилизирующие его микроорганизмы широко распространены во многих экосистемах, в основном, в богатых органикой животного происхождения (Atkinson, 1992). Интерес к кальцинирующим уробактериям растет, различными исследовательскими группами по всему миру проводится широкий скрининг таких микроорганизмов в разных экосистемах. Наиболее активные из уже отобранных штаммов относятся к разным видам рода *Bacillus* (Vahabi et al., 2015; Arias et al., 2019; Mutitu et al., 2019; Ekprasert et al., 2020; Leerprasert et al., 2022). МИОК при гидролизе мочевины является легко регулируемым процессом, при котором за короткое время образуется большое количество карбоната кальция (Калёнов и соавт., 2020). Дегградация мочевины катализируется уреазой, каталитическая активность которой считается достаточно высокой, а механизм катализа подробно изучен (Karplus et al., 1997). Выделяемый уреазой аммиак способствует повышению рН среды, благодаря чему свободные ионы кальция связываются с  $\text{CO}_2$ , образующимся в результате уреазной реакции, в нерастворимые карбонаты (Charaгgo-Acuña et al., 2020). Благодаря высокой кальцинирующей активности уробактерий, препараты на их основе начинают успешно применяться для восстановления поврежденных (“закливленых трещин”) в бетоне и камне, продления срока службы железобетонных конструкций, производства модифицированных строительных материалов с эффектом “самовосстановления” по-

сле механических повреждений. Недавние исследования показали большую экономическую эффективность технологий биогенного “самовосстановления” бетона по сравнению с абиотическими технологиями устранения трещин (Joshi et al., 2017, 2020; Almajed et al., 2021). Актуальность решения этой проблемы в материаловедении и строительстве определяется тем, что к природным факторам, пагубно влияющим на сохранность строительных материалов и конструкций, в последнее время все чаще прибавляется антропогенный фактор. Он выражается в загрязнении окружающей среды оксидами азота и серы, что приводит к кислотным дождям и туманам, способным растворять кальцитную матрицу известняка и вымывать из поверхностных слоев бетона растворимые компоненты (Alonso et al., 2018; Давидюк и соавт., 2021; Батыновский и соавт., 2022). Эти обстоятельства актуализируют поиск все новых кальцинирующих микроорганизмов.

Малоисследованной и перспективной экологической нишей для такого поиска являются соленые природные и техногенные водоемы, в которых обитают экстремально галофильные бактерии и археи, а также сопутствующая им микрофлора, которая, как показывают исследования, является либо галотолерантной, либо зависимой от продуктов жизнедеятельности и лизиса истинных галофилов, в частности, осмолитов. Предварительные исследования показали, что в микробных сообществах экстремально соленых и содовых озер присутствуют негалофильные микроорганизмы порядка *Bacillales*, обладающие высокой уреазной активностью (Galinski et al., 1994; Ventosa et al., 1998; Panosyan et al., 2018; Калёнов и соавт., 2020). Эти исследования вызвали интерес к поиску кальцинирующих микроорганизмов и в других экстремальных экосистемах, так как специфика применения МИОК подразумевает устойчивость таких микроорганизмов к высоким концентрациям солей и к щелочной среде цементных растворов, а также их способность закрепляться на целевой поверхности и выдерживать длительные периоды высыхания. Подобные физико-химические условия характерны, в частности, для почв Аральского региона.

В этой связи, целью нашей работы стала оценка потенциала микробных сообществ нескольких экстремальных экосистем Южного Приаралья в качестве источников новых уролитических кальцинирующих микроорганизмов для технологий биоцементирования и самовосстанавливающихся биобетонных, предназначенных к применению в условиях резко континентального аридного климата.

В ходе двух экспедиций, проведенных в ноябре–декабре 2021 г. и сентябре 2022 г., было отобрано, соответственно, 18 образцов растительных

остатков и почвы Южного Приаралья для выделения новых уролитических бактерий и 23 образца почвы, микробных обрастаний, воды и донных отложений Аральского моря, Аралкума и Южного Приаралья, а также образцы термальной воды из скважин, пробуренных в бывшем дне Аральского моря. Все эти образцы были зафиксированы на месте для последующего выделения тотальной ДНК и филогенетического профилирования микробных сообществ по гену 16S рРНК.

Образцы почвы из первой экспедиции были подвергнуты общему химическому анализу по ГОСТ 2642(3-8)-85 и 26490-85 для определения физико-химических характеристик этих экстремальных экосистем. Эти образцы почвы, а также образцы собранных с нее растительных остатков были рассеяны на твердую питательную среду (мясо-пептонный агар (МПА), pH  $6.8 \pm 0.2$ , концентрация NaCl 100–150 г/л, 2% агара) для накопления аэробных солеустойчивых гетеротрофных бактерий, к которым относится большинство известных уробактерий с кальцинирующей активностью (Joshi et al., 2017). Культивирование вели при температуре 35°C. Из полученных колоний методом 10-кратных разведений на жидкой питательной среде (мясо-пептонный бульон) было получено 28 чистых культур гетеротрофных микроорганизмов. Чистоту культур определяли микроскопированием, высевом на МПА и методом МАЛДИ-время-пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) с помощью комплекса MALDI Biotyper Microflex (“Bruker”, Германия), который также позволил провести первичную идентификацию полученных культур. Полученные культуры проверяли на наличие уреазной активности высевом штрихом на твердую питательную среду Кристенсена, pH  $6.8 \pm 0.2$ , содержащую 7.5 г/л CaCl<sub>2</sub> и 0.012 г/л фенолового красного красителя в качестве индикатора. О проявлении уреазной активности судили по розовому окрашиванию среды вокруг колоний. Образование кальцита наблюдали визуально и при помощи световой микроскопии (цифровой микроскоп BA210 Digital, “Motic”, Китай) по формированию минеральной корки поверх или по краям колоний. Интенсивность кальцинирования оценивали по скорости проявления уреазной активности и образования кристаллов кальцита в сравнении с референтными галотолерантными штаммами уробактерий (далее, группа штаммов SKG1-9), которые были недавно выделены из нескольких различных гиперсоленых экосистем мира и успешно использованы в препаратах для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона (Калёнов и соавт., 2020).

Из отобранных в ходе второй экспедиции образцов почвы, воды и микробных обрастаний была выделена тотальная ДНК, затем были подготовлены и отсекуены библиотеки ампликонов V4-вариабельного участка гена 16S рРНК и проведен

биоинформатический анализ полученных данных по методике, описанной ранее (Гаврилов и соавт., 2022). Необработанные прочтения были задепонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроекта PRJNA925816. В полученных наборах данных был произведен поиск филогенов, которые могут принадлежать микроорганизмам с кальцинирующей активностью. Для этого при анализе литературных данных были отобраны 10 полных последовательностей генов 16S рРНК штаммов с доказанной уреазной и кальцинирующей активностью. Кроме того, были использованы полные последовательности генов 16S рРНК галотолерантных штаммов уробактерий группы SKG1-9. Эти последовательности были определены ранее (Калёнов и соавт., 2020) и задепонированы в базе данных GenBank в рамках нашей работы под номерами, указанными в табл. 1. Нами также была определена солеустойчивость этих штаммов для оценки адекватности их использования в качестве референтных организмов при анализе экстремофильных микробных сообществ Аральского региона. Итоговый список последовательностей для поиска филогенов потенциальных кальцинирующих микроорганизмов приведен в табл. 1. Поиск целевых филогенов проводили программой Local blastn, во внимание принимался уровень сходства последовательностей не менее 98.8% (уровень одного вида).

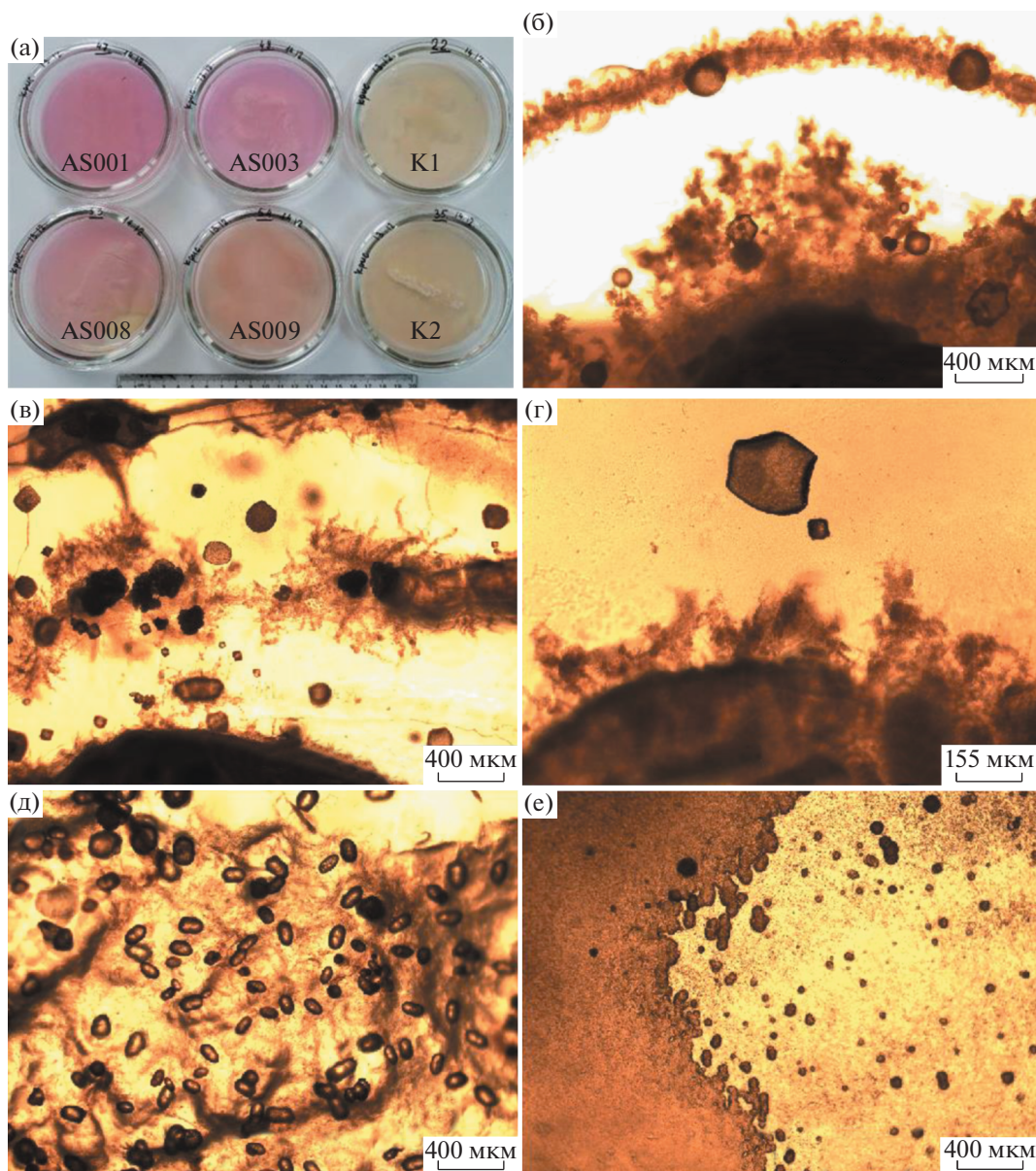
Общий химический анализ показал, что отобранные в ходе первой экспедиции почвы являются щелочными и достаточно засоленными с вариацией pH от 8.23 до 9.27. Соленость почв варьирует в широких пределах от 0.24 до 56.63 г/л, но в большинстве образцов превышает 10 г/л. Основной солевой состав является NaCl, содержание сульфатов варьирует в широких пределах при среднем значении 73.4 мг-экв./л. Все эти данные указывают на существенную засоленность почв в большинстве отобранных нами образцов.

В результате скрининга 28 чистых культур аэробных гетеротрофов, выделенных из образцов растительных остатков и почв Приаралья, у четырех из них была выявлена уреазная и кальцинирующая активность. Уреазная активность начинала проявляться уже после 24 ч культивирования (рис. 1а), тогда как образование кристаллов кальцита можно было наблюдать визуально только на 5-е сут культивирования. В культурах, не проявивших уреазную активность, образования кристаллов кальцита не наблюдалось. Предварительная идентификация активных изолятов методом MALDI-TOF MS показала, что они относятся к видам *Bacillus licheniformis* (культуры AS001 и AS003), *Staphylococcus felis* (AS008) и *Azoarcus indigenus* (AS009). Время проявления кальцинирующей активности новыми изолятами было в 2.5 раза больше, чем у референтных штаммов SKG1-9 видов *Lysinibacillus macroides*, *B. licheniformis* и *B. subtilis*.

**Таблица 1.** Референтные полные последовательности гена 16S рРНК, использованные для поиска филогипов потенциальных кальцинирующих микроорганизмов в микробных сообществах экосистем Южного Приаралья

Наименование штамма	Упоминание в публикации по кальцинирующей активности	Идентификатор последовательности в базе данных	Ссылка на публикацию по кальцинирующей активности
<i>Mycosoccus xanthus</i> ATCC 25232	<i>Mycosoccus xanthus</i> СЕСТ 422	NR_043945.1	<a href="https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003">https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003</a>
<i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453	<i>Bacillus pasteurii</i> ATCC 6453	Ген 16S рРНК из генома ATCC 6453	<a href="https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00082-6">https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00082-6</a>
<i>Bacillus megaterium</i> de Bary ATCC 14581, VKM В-512	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	Ген 16S рРНК из генома ATCC 14581	<a href="https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.11.009">https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.11.009</a>
<i>Sporosarcina ureilytica</i>	<i>Bacillus sphaericus</i> LMG 22257	CP017560.1	<a href="https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2006.12.011">https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2006.12.011</a>
<i>Bacillus megaterium</i> SS3	<i>Bacillus megaterium</i> SS3	KC121060.1	<a href="https://doi.org/10.1007/s11274-013-1408-z">https://doi.org/10.1007/s11274-013-1408-z</a>
<i>Bacillus</i> sp. CT5	<i>Bacillus</i> sp. CT5	FJ973470.1	<a href="https://ascelibrary.org/doi/full/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0000159">https://ascelibrary.org/doi/full/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0000159</a>
<i>Alkalihalobacterium alkalinitriticum</i> FK3	<i>Bacillus alkalinitriticus</i>	ON834547.1	<a href="https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012">https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012</a>
<i>Sutcliffella cohnii</i> RSH	<i>Bacillus cohnii</i> CCM 4369	X76437.1	<a href="https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2014.06.003">https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2014.06.003</a>
<i>Alkalihalophilus pseudofirmus</i> DSM 8715	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	NR_026139.1	<a href="https://research.tudelft.nl/en/publications/crack-repair-by-concrete-immobilized-bacteria">https://research.tudelft.nl/en/publications/crack-repair-by-concrete-immobilized-bacteria</a>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> type strain	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X06684.1	<a href="https://doi.org/10.14359/10154">https://doi.org/10.14359/10154</a>
<i>Bacillus licheniformis</i> SKG1	<i>Bacillus licheniformis</i>	OQ299525 <sup>1</sup>	<a href="https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28">https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28</a>
<i>Bacillus subtilis</i> SKG2	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299526 <sup>1</sup>	<a href="https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28">https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28</a>
<i>Bacillus subtilis</i> SKG3	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299527 <sup>1</sup>	<a href="https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28">https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28</a>
<i>Bacillus licheniformis</i> SKG4	<i>Bacillus licheniformis</i>	OQ299528 <sup>1</sup>	<a href="https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28">https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28</a>
<i>Bacillus subtilis</i> SKG5	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299529 <sup>1</sup>	<a href="https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28">https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28</a>
<i>Bacillus subtilis</i> SKG6	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299530 <sup>1</sup>	<a href="https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28">https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28</a>
<i>Lysinibacillus macroides</i> SKG7	<i>Lysinibacillus macroides</i>	OQ299531 <sup>1</sup>	<a href="https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28">https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28</a>
<i>Bacillus badius</i> SKG8	Не упоминался ранее	OQ299532 <sup>1</sup>	<a href="https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28">https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28</a>
<i>Bacillus subtilis</i> SKG9	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299533 <sup>1</sup>	<a href="https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28">https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28</a>

<sup>1</sup> Последовательности были определены ранее Калёновым и соавт. (2020), но помещены в базу данных в ходе нашей работы.



**Рис. 1.** Проявление уреазной и кальцинирующей активности чистыми культурами аэробных гетеротрофов, выделенными из образцов почв Приаралья: (а) – чашки Петри с чистыми культурами, посеянными штрихом на твердую среду Кристенсена, через 1 сут после начала инкубирования, активные культуры AS001, AS003, AS008, AS009 и неактивные контрольные культуры K1 и K2; (б–д) – кристаллы кальцита, образованные культурами с уреазной активностью; (б) – мелкие кристаллы по краям и вокруг колонии культуры AS001; (в) – мелкие и крупные кристаллы на поверхности колонии культуры AS003; (г) – кальцинированные колонии культуры AS009; (д) – крупные кристаллы на поверхности колонии культуры AS008; (е) – край колонии контрольной неактивной культуры K2.

Кальцинирующая активность этих штаммов проявлялась уже на 2-е сут культивирования (Калёнов и соавт., 2020). Оценка солеустойчивости штаммов группы SKG1-9 в рамках нашей работы выявила их рост при концентрациях NaCl до 150 г/л. Однако максимальная плотность культур этих штаммов наблюдается при концентрации NaCl до 50 г/л и значительно снижается при увеличении содержания соли. Урожай клеток *L. macroides* SKG7 сохраняется достаточно высоким до 100 г/л NaCl.

Эти данные позволяют корректно сравнивать кальцинирующую активность референтных штаммов группы SKG1-9 и чистых культур, выделенных нами из растительных остатков Аральского региона, почвы которого имеют соленость не выше 56 г/л.

Поиск микроорганизмов, близкородственных референтным штаммам кальцинирующих микроорганизмов (см. табл. 1), в образцах, отобранных из различных экосистем Приаралья в ходе нашей

второй экспедиции, выявил 9 филоотипов (ASV) с высокой гомологией V4-участков гена 16S рРНК со штаммами *Bacillus megaterium* de Bary, *B. licheniformis* SKG1 и SKG4, *B. subtilis* SKG9, *Alkalihalophilus pseudofirmus* DSM 8715, а также *L. macroides* SKG7. Большая часть выявленных филоотипов потенциальных кальцинирующих бактерий родственна штамму *L. macroides* SKG7 (табл. 2) с достаточно высокой солеустойчивостью. Эти филоотипы были обнаружены в микробных сообществах сухой почвы плато Устюрт (образец K08), анаэробного слоя донных отложений озера Судочье (K21), а также в пресной термальной воде из скважины, пробуренной в бывшем дне Аральского моря на глубину до 400 м (K01), и в микробных сообществах, ассоциированных с изливом этой воды на засоленную почву (микробные маты и донные отложения термального ручья (K02 и K04)). Интересно, что в микробном сообществе донного осадка ручья с термальной пресной водой наблюдалась максимальная представленность филоотипов потенциальных кальцинирующих бактерий, родственных галоалкалофильному штамму *A. pseudofirmus* DSM 8715 и солеустойчивому *L. macroides* SKG7. Описание всех упомянутых образцов и относительная представленность в них искомым филоотипов кальцинирующих бактерий даны в табл. 2. Ни один из этих филоотипов не был доминирующим в указанных сообществах, доля какого-либо одного из них не превышала 0.87% филогенетического разнообразия сообщества. Это неудивительно, учитывая гетеротрофный тип питания кальцинирующих бактерий и их зависимость от конечного продукта биодegradации азотсодержащих соединений (мочевина), а значит, от активности других многочисленных деструкторов органического вещества в сообществе. Проанализированные нами микробные сообщества, содержащие филоотипы потенциальных кальцинирующих микроорганизмов, оказались довольно разнообразными (рис. 2). Сообщество термальной воды представлено, главным образом,  $\gamma$ -протеобактериями рода *Thiobacillus*, а также некультивируемыми группами уровня новых родов внутри семейств *Hydrogenophilaceae* и *Rhodocyclaceae*, составляющими, в общей сложности, 71% всех прочтений гена 16S рРНК. Также, существенную часть (7%) составляют разнообразные представители филума *Bacillota* (ранее *Firmicutes*) (рис. 2). Сообщества зеленого мата, отобранного на изливе скважины, и донных осадков термального ручья, идущего от нее, гораздо разнообразнее. В сообществе мата было представлено 88 различных филоотипов  $\alpha$ - и  $\gamma$ -протеобактерий (всего 40% сообщества), 21 филоотип цианобактерий (16% сообщества), 40 филоотип планктомицетов (7% сообщества), а 20% разнообразия этого сообщества составляли нитрифицирующие бактерии единственного филоотипа, относящегося к роду *Nitrospira*. Сообщество дон-

ного осадка термального ручья представлено 65-ю филоотипами  $\alpha$ - и  $\gamma$ -протеобактерий, которые составляли всего 35% его разнообразия. Кроме того, существенные доли разнообразия этого микробного сообщества составляли микроводоросли, детектируемые по хлоропластам (16% прочтений гена 16S рРНК), а также различные бактерии филумов *Desulfobacterota* (9%), *Chloroflexota* (15%, 37 филоотипов) и *Bacillota* (бывший *Firmicutes*, 8%). Последний филум представлен в этом сообществе 16-ю филоотипами, два из которых близкородственны кальцинирующим штаммам *L. macroides* SKG7 и *A. pseudofirmus* DSM 8715. Микробное сообщество почвы плато Устюрт в точке нашего пробоотбора представлено, главным образом, актинобактериями (филум *Actinomycetota*, 51% всех прочтений гена 16S рРНК, 55 филоотипов),  $\alpha$ - и  $\gamma$ -протеобактериями (всего 22%), *Chloroflexota* (7%, 28 филоотипов), *Bacteroidota* (6%, 27 филоотипов). В донных отложениях озера Судочье, напротив, доминировали  $\alpha$ - и  $\gamma$ -протеобактерии (26% сообщества) и *Desulfobacterota* (19%); ниже была представленность в этой эконише бактерий филума *Bacteroidota* (8%) и цианобактерий (7%), хотя эти филумы представляли 44 и 17 филоотипов соответственно (рис. 2). Представители различных таксонов филума *Bacillota* составляли порядка 4% микробного сообщества донных осадков озера Судочье, один из этих филоотипов имел высокую гомологию гена 16S рРНК с кальцинирующими штаммами *B. subtilis* SKG2,3,5,6,9 (табл. 2).

Полученные нами данные показали широкую распространенность микроорганизмов, обладающих уреазной активностью и способных индуцировать образование кальцита, в самых разнообразных экосистемах Южного Приаралья — в засоленных почвах, донных отложениях соленого озера, пресных термальных водах. Обнаружение кальцинирующих микроорганизмов в филогенетически разнообразных микробных сообществах подтверждает отмечавшуюся ранее тенденцию приуроченности этих прокариот к богатым органикой экосистемам, в которых комплексная активность многих деструкторов органического вещества, в том числе, экстремофильных, обеспечивает кальцинирующие штаммы источниками углерода, энергетическими субстратами и защитой от неблагоприятных факторов среды, в частности, за счет секреции осмолитов (Galinski et al., 1994; Jebbar, 1997; Panosyan et al., 2018; Kalenov et al., 2020).

Выделение в чистую культуру четырех новых штаммов кальцинирующих уробактерий из 18 образцов почвы и детекция филоотипов таких бактерий в 5 из 28 проанализированных микробных сообществ говорит о высоком потенциале использования экстремальных экосистем Приаралья как источника новых биотехнологически ценных прокариот для разработки технологий биоцементи-

**Таблица 2.** Природные образцы, в которых молекулярно-экологическими методами были детектированы филогенетические типы, родственные известным кальцинирующим микроорганизмам

Образец	Описание	Референтный штамм	Сходство последовательностей 16S рРНК, %	Номера филогенетических типов (ASV), родственных референтным штаммам	Таксономическое положение ASV ( <i>Bacilli</i> ; <i>Bacillales</i> ...)	Относительная представленность ASV в сообществе, %
K01	Пресная термальная вода из скважины в дне Аральского моря (41°C, pH 7.0)	<i>L. macroides</i> SKG7	98.8	ASV1050	<i>Planococcaceae</i> ;	0.19
			98.8	ASV1314	<i>Planomicrobium/Planococcus</i>	0.21
K02	Зеленый мат с трубы на изливе скважины	<i>B. megaterium</i> de Bary ATCC 14581	100.0	ASV919	<i>Bacillaceae</i> ; <i>Bacillus</i>	0.23
K04	Черный осадок из ручья термальной воды, в 50 м от скважины	<i>L. macroides</i> SKG7 <i>A. pseudofirmus</i> DSM 8715	99.8	ASV1667	<i>Planococcaceae</i> ;	0.16
			99.2	ASV408	<i>Psychrobacillus/Planococcus</i>	0.87
			98.8	ASV988	<i>Bacillaceae</i> uncultured	0.64
K08	Сухая почва со склона плато Устюрт	<i>B. licheniformis</i> SKG1, SKG4 <i>A. pseudofirmus</i> DSM 8715	100.0	ASV1142	<i>Bacillaceae</i> ; <i>Bacillus</i>	0.42
			98.8	ASV2576	<i>Bacillaceae</i> uncultured	0.10
K21	Черный рыхлый донный осадок оз. Судочье (глубина под поверхностью осадка 15 см)	<i>B. subtilis</i> SKG2, SKG3, SKG5, SKG6, SKG9	99.6	ASV1742	<i>Bacillaceae</i> ; <i>Bacillus</i>	0.15

рования. Сравнительно низкая скорость кальцинирования в культурах выделенных нами штаммов указывает как на необходимость подбора оптимальных для них условий роста, так и на важность продолжения поиска наиболее активных кальцинирующих микроорганизмов в ранее неисследованных экстремофильных микробных сообществах экосистем Аралкума и Приаралья. Дальнейшие работы должны быть направлены на выделение таких организмов в чистые культуры и оценку биотехнологической значимости новых изолятов. Следует отметить, что применение биоцементирующих микробных препаратов является особенно перспективным для районов с повышенной сейсмичностью, где частота землетрясений, особенно мелких, высока, что приводит к повышенному и ускоренному износу железобетонных конструкций. В этой связи, кальцинирующие микроорганизмы Аральского региона с потенциально высокой устойчивостью не только к солености

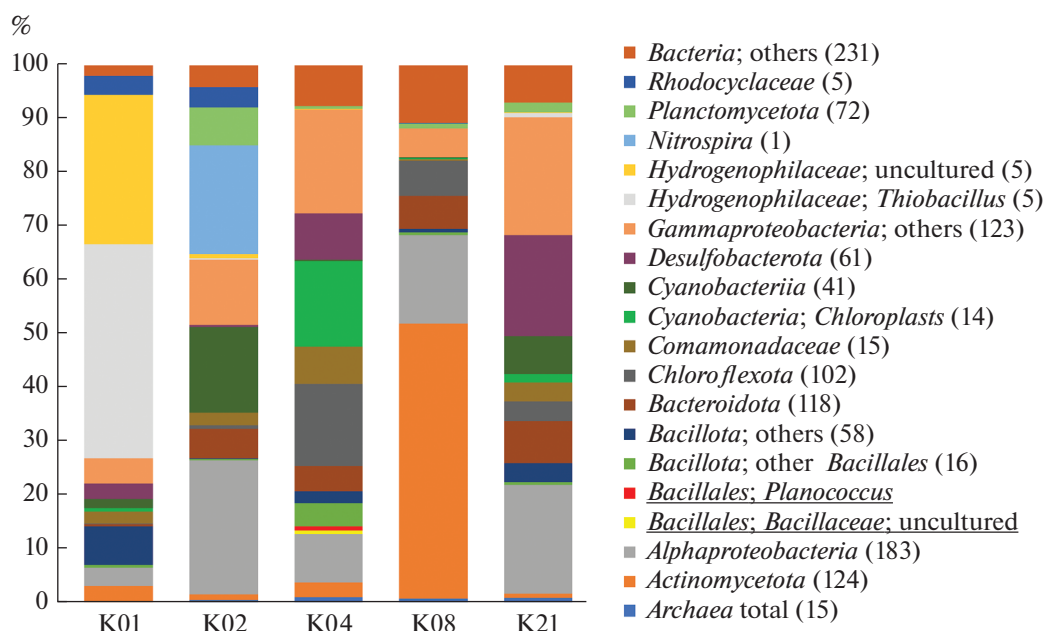
среды, но и к высушиванию, высоким температурам и резким температурным контрастам, а также к относительно высоким дозам солнечного излучения, могут стать основными кандидатами для разработки биоцементирующих препаратов для Узбекистана и других регионов мира с резко континентальным аридным климатом, учитывая сходство физико-химических условий, формирующихся на засоленных засушливых почвах Аралкума и на поверхности бетонных строений в этих регионах.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в отборе проб А.И. Кулонову и Ж.Э. Алимову.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Основные работы выполнены при поддержке проекта А-ФА-2021-428 "Микробные сообщества совре-



**Рис. 2.** Филогенетический состав по результатам профилирования по гену 16S рРНК микробных сообществ, в которых были детектированы филоциты, родственные известным кальцинирующим микроорганизмам. На оси X приведена нумерация образцов по табл. 2; K01 — термальная вода из скважины; K02 — зеленый мат на изливе скважины; K04 — донный осадок термального ручья, вытекающего из скважины; K08 — почва плато Устюрт; K21 — анаэробная зона донного осадка оз. Судочье. Подчеркнуты филоциты, близкородственные известным кальцинирующим штаммам бацилл и имеющие относительную представленность около 1%, которая подается визуализации на диаграмме. В скобках рядом с названиями таксонов указано суммарное количество их филоцитов (ASV), детектированное во всех проанализированных образцах.

менного Арала и зон Приаралья: разнообразие, свойства и биотехнологический потенциал». Работы по анализу результатов секвенирования были выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Батяновский Э.И., Гуриченко Н.С., Корсун А.М. Структура, непроницаемость и долговечность цементного бетона // Наука и техника. 2022. Т. 21. № 1. С. 19–27.

Гаврилов С.Н., Потанов Е.Г., Прокофьева М.И., Ключкина А.А., Меркель А.Ю., Маслов А.А., Заварзина Д.Г. Разнообразие новых некультивируемых прокариот в микробных сообществах минеральных подземных вод Ессентукского месторождения // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 32–49.

Gavrilov S.N., Prokofeva M.I., Klyukina A.A., Merkel A.Y., Zavarzina D.G., Potapov E.G., Maslov A.A. Diversity of nov-

el uncultured prokaryotes in microbial communities of the Yessentukskoye underground mineral water deposit // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 28–44.

Давидюк А.А., Рыбнов Д.С., Гоглев И.Н., Соколов К.Ю., Кустикова Ю.О. Математическое моделирование динамики процесса массопереноса при коррозии цементных бетонов // Промышленное и гражданское строительство. 2021. № 2. С. 34–41.

Давлетмуратова В.Б. Развитие процессов опустынивания и галофитизация естественной растительности в дельте и низовьях Амударьи // Экономика и социум. 2017. Т. 37. № 6-1. С. 519–522.

Большое Аральское море в начале XXI в.: физика, биология, химия / Под ред. Завьялова П.О. и др. М.: Наука, 2012. 232 с.

Калёнов С.В., Градова Н.Б., Сивков С.П., Агалакова Е.В., Белов А.А., Суясов Н.А., Хохлачёв Н.С., Панфилов В.И. Препарат на основе бактерий, выделенных из гиперсоленых сред, для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 4. С. 21–28.

Almajed A., Lateef M.A., Moghal A.A.B., Lemboye K. State-of-the-art review of the applicability and challenges of microbial-induced calcite precipitation (MICP) and enzyme-induced calcite precipitation (EICP) techniques for geotechnical and geoenvironmental applications // Crystals. 2021. V. 11. Art. 370.

Alonso M.J.C., Ortiz C.E.L., Perez S.O.G. et al. Improved strength and durability of concrete through metabolic activ-



- ity of ureolytic bacteria // Environ. Sci. Pollut. Res. 2018. V. 25. P. 21451–21458.
- Arias D., Cisternas L.A., Miranda C., Rivas M. Bioprospecting of ureolytic bacteria from Laguna Salada for biomineralization applications // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. V. 18. Art. 209.
- Atkinson D.E. Functional roles of urea synthesis in vertebrates // Physiol. Zool. 1992. V. 65. P. 243–267.
- Chaparro-Acuña S.P., Becerra-Jiménez M.L., Martínez-Zambrano J.J., Rojas-Sarmiento H.A. Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: Mechanism and applications of the process // Acta Agronomica. 2020. V. 67. P. 277–288.
- DeJong J.T. Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, opportunities and challenges // Geotechnique. 2013. V. 63. P. 287–301.
- Ekprasert J., Fongkaew I., Chainakun P. et al. Investigating mechanical properties and biocement application of CaCO<sub>3</sub> precipitated by a newly-isolated *Lysinibacillus* sp. WH using artificial neural networks // Sci. Rep. 2020. V. 10. Art. 16137.
- Frankel R.B., Bazylinski D.A. Biologically induced mineralization by bacteria // Rev. Mineral. Geochem. 2003. V. 54. P. 95–114.
- Galinski E.A., Trüper H.G. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems // FEMS Microbiol. Rev. 1994. V. 15. P. 95–108.
- Garabito M.J., Márquez M.C., Ventosa A. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments // Can. J. Microbiol. 1998. V. 44. P. 95–102.
- Jebbar M. Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 154. P. 325–330.
- Joshi S., Goyal S., Mukherjee A., Reddy M.S. Microbial healing of cracks in concrete: a review // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 44. P. 1511–1525.
- Joshi S., Goyal S., Reddy M.S. Influence of biogenic treatment in improving the durability properties of waste amended concrete: a review // Constr. Build. Mater. 2020. V. 263. Art. 120170.
- Kalenov S.V., Belov A.A., Lyapkin E.I., Sachavskii A.A., Panfilov V.I. Problems of non-sterile cultivation of extremely halophilic microorganisms // Int. Multidisc. Sci. Geo-Conference: SGEM. 2020. V. 20. P. 105–112.
- Karplus P.A., Pearson M.A., Hausinger R.P. 70 years of crystalline urease: what have we learned? // Acc. Chem. Res. 1997. V. 30. P. 330–337.
- Leeprasert L., Chonudomkul D., Boonmak C. Biocalcifying potential of ureolytic bacteria isolated from soil for biocementation and material crack repair // Microorganisms. 2022. V. 10. Art. 963.
- Micklin P. The Aral Sea disaster // Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 2007. V. 35. P. 47–72.
- Mutitu K.D., Munyao M.O., Wachira M.J., Mwirichia R., Thiong'o K.J., Marangu M.J. Effects of biocementation on some properties of cement-based materials incorporating *Bacillus* species bacteria – a review // J. Sustain. Cem. 2019. V. 8. P. 309–325.
- Omoriegie A.I., Palombo E.A., Nissom P.M. Bioprecipitation of calcium carbonate mediated by ureolysis: a review // Environ. Engineer. Res. 2021. V. 26. Art. 200379.
- Osinubi K.J., Eberemu A.O., Ijimdiya T.S., Yakubu S.E., Gadzama E.W., Sani J.E., Yohanna P. Review of the use of microorganisms in geotechnical engineering applications // SN Applied Sciences. 2020. V. 2. № 2. P. 1–19.
- Pacheco V.L., Bragagnolo L., Reginatto C. et al. Microbially induced calcite precipitation (MICP): review from an engineering perspective // Geotech. Geol. Eng. 2022. V. 40. P. 2379–2396.
- 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 // Syst. Appl. Microbiol. 2018. V. 41. P. 232–240.
- Vahabi A., Ramezani-pour A., Sharafi H., Zahiri H., Vali H., Noghabi K. Calcium carbonate precipitation by strain *Bacillus licheniformis* AK01, newly isolated from loamy soil: a promising alternative for sealing cement-based materials // J. Basic Microbiol. 2015. V. 55. P. 105–111.
- Ventosa A., Márquez M.C., Garabito M.J., Arahal D.R. Moderately halophilic Gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments // Extremophiles. 1998. V. 2. P. 297–304.

## Calcinating Bacteria in Extreme Ecosystems of the Southern Aral Region

K. V. Kondrasheva<sup>1</sup>, A. A. Umruzokov<sup>1</sup>, S. V. Kalenov<sup>2</sup>, A. Yu. Merkel<sup>3</sup>, N. A. Chernykh<sup>3</sup>,  
A. I. Slobodkin<sup>3</sup>, S. N. Gavrillov<sup>3</sup>, \*, and K. D. Davranov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent, 100128 Uzbekistan

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125480 Russia

<sup>3</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

\*e-mail: sngavrillov@gmail.com

Received December 23, 2022; revised January 23, 2023; accepted January 23, 2023

**Abstract**—The processes of microbially induced precipitation of calcium carbonates are widespread in natural environments and are an important part of the biogeochemical carbon cycle. These processes comprised the basis of new “biocementation” technologies, which are extensively developing worldwide during the last decade. These technologies are aimed at the construction of novel “self-healing” construction materials, as well as at maintaining the strength of various buildings and structures. Since the optimal conditions for calcite formation are high salinity and alkalinity of the environment, the search for calcifying microorganisms in a va-

riety of ecosystems, including extreme ones, is of interest. At present, many strains of halophilic and halotolerant bacteria, that induce calcination, have already been isolated and tested in pilot industrial processes. Most of these bacteria possess urease activity, which is the main contributor to the binding of calcium ions to insoluble calcium carbonate. A wide variety of natural ecosystems with optimal conditions for the development of calcifying urobacteria, as well as the economic demand for biocementation technologies, stimulate interest in the search for more and more novel strains of these microorganisms. One of the promising resources to be screened for such organisms is the ecosystem of the drying Aral Sea and the adjacent desert and semi-desert Aral region. Here we present the results of screening various extreme ecosystems of the Aral region for the presence of calcifying microorganisms. We obtained 28 pure cultures of heterotrophic aerobic bacteria from samples of plant residues and soils of the Aral Sea region, 4 of which had urease and calcifying activities. Their activities were compared with those of the strains presently used to produce biocementing mixtures. We have identified the phlotypes of putative calcifying microorganisms in microbial communities of desert soil, thermal waters, and bottom sediments of a salt lake, and described the phylogenetic diversity of these communities. Our results indicated the wide distribution of calcifying microorganisms in the ecosystems of the South Aral region and highlighted the expediency of screening them for the new biotechnologically relevant strains of these organisms.

**Keywords:** microbially induced calcite precipitation, extreme ecosystems, Aral Sea, biocementation