

УДК 57.083.12+579.222+577.15

РАЗНООБРАЗИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АЛКАЛОФИЛЬНЫХ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ИЗ СОДОВОГО ОЗЕРА НУХЭ-НУР (БАРГУЗИНСКАЯ КОТЛОВИНА, БУРЯТИЯ)

© 2025 г. Е. В. Лаврентьева^{a, b, *}, Е. П. Никитина^{b, c},
Т. Г. Банзаракцаева^a, В. Б. Дамбаев^a

^aИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 660047, Россия

^bБурятский государственный университет имени Доржи Банзарова, Улан-Удэ, 670000, Россия

^cБайкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, 660047, Россия

*e-mail: lena_l@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2024 г.

После доработки 03.09.2024 г.

Принята к публикации 04.09.2024 г.

Семь изученных штаммов протеолитических бактерий, отнесенных к филумам *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* и *Bacillota*, выделены из образцов воды и донных отложений содового озера Нуухэ-Нур Баргузинской котловины. Определение экофизиологических свойств культур показало, что штаммы являлись алкалофильными и алкалотолерантными и развивались при pH от 7.0 до 11.0 (оптимум pH 7.5–9.5). По отношению к солености, выделенные бактерии в основном являлись галотолерантными. Показано, что штаммы способны гидролизовать *n*-нитроанилидные субстраты и проявили максимальную активность по гидролизу GlpAALpNA, BzRpNA и LpNA. Установлено, что пептидазы наиболее активны в щелочных условиях при pH 8.0–10.0 и термостабильны до 50°C. Изучение активности внеклеточных пептидаз у разных видов алкалофильных бактерий позволило выявить природные изоляты с высокой ферментативной активностью и различными спектрами секреции секретируемых внеклеточных пептидаз, что, возможно, в природных местообитаниях позволяет им успешно использовать природные белковые субстраты.

Ключевые слова: алкалофильные бактерии, пептидазы, содовые озера, Баргузинская котловина

DOI: 10.31857/S0026365625010056

Содовые озера, гидротермальные источники и почвы, богатые карбонатами, являются разнообразными природными экосистемами с благоприятными условиями для развития алкалофильных бактерий (Gupta et al., 2014; Preiss et al., 2015). Бактерии, которые демонстрируют новые физиологические особенности и имеют потенциальное применение, были выделены из содовых озер, представляющих собой высокощелочную водную среду. Непостоянны по своей природе, они широко распространены по всему миру, в основном в засушливых или полузасушливых субтропических широтах в континентальных районах, включая территорию Африки (Восточноафриканская рифтовая система), Северной Америки (штаты Калифорния и Невада, Мексика), Южной Сибири (Кулундинская степь, территории Забайкальского края, Республики Бурятия и Тыва), Внутренней Монголии (северо-восточный Китай) и Восточной

Австралии (Foti et al., 2008; Sorokin et al., 2014). Алкалофильные бактерии содовых озер участвуют в биогеохимических окислительно-восстановительных циклах углерода, серы и азота (Sorokin et al., 2015) и проявляют свойства, которые не обнаруживаются у алкалофилов из других сред (Preiss et al., 2015). Они часто являются полиэкстремофилами: их свойства, помимо алкалофильности, охватывают широкие диапазоны толерантности к солености и температуре (Sorokin et al., 2014).

Основным преимуществом алкалофильных бактерий является наличие у них разнообразных ферментов, оптимум активности которых смешен в область высоких значений pH, среди которых можно указать целлюлазы, пептидазы, кератиназы, ксиланазы, пектиназы, цикломальтодекстринглюкантрансферазы (CGTases) (Gupta et al., 2014; Preiss et al., 2015). Алкалофильные бактерии являются важным источником полезных

стабильных ферментов и новых химических веществ, включая противомикробные препараты (Preiss et al., 2015). Кроме того, алкалофильные бактерии могут быть использованы для удаления токсичных соединений серы из сточных вод и газов, а также биодеградации углеводородов и других органических (например, нитроароматических) и неорганических (мышьяк и уран) загрязнителей (Sorokin et al., 2014; Preiss et al., 2015). У алкалофильных бактерий пептидазы считаются наиболее важным классом промышленных ферментов, которые составляют почти 60% от общего объема продаж ферментов в мире (Banerjee, Ray, 2017; Naveed et al., 2021). Это обусловлено их широким применением в пищевой, детергентной, кожевенной, фармацевтической, косметической отраслях, при дегуммировании шелка, извлечении серебра, в химической промышленности и процессах биоремедиации (Naveed et al., 2021). Помимо практического применения пептидазы привлекают исследователей как ключевые участники в процессах деструкции органического вещества, протекающих в естественных экосистемах содовых озер (Nguyen et al., 2019). Поэтому внимание исследователей направлено на выделение алкалофильных протеолитических прокариот из содовых озер. К настоящему времени бактерии-продуценты щелочных пептидаз известны среди родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Aeromonas* (Masi et al., 2021), *Salipaludibacillus* (Ibrahim et al., 2016), *Nocardiopsis* (Sharma, Singh, 2016), *Halomonas* (Эрдынеева и соавт., 2018), *Proteinivorax* (Лаврентьева и соавт., 2019), *Alkalicaulis*, *Aliidiomarina* (Лаврентьева и соавт., 2021).

В настоящее время использование ферментов в промышленности будет только увеличиваться, и, таким образом, для удовлетворения спроса важен скрининг новых микробных штаммов-продуцентов (Banerjee, Ray, 2017; Naveed et al., 2021).

Данное исследование направлено на изучение алкалофильных бактерий, выделенных из щелочного озера Нухэ-Нур Баргузинской котловины. Содовое озеро Нухэ-Нур характеризуется относительно неустойчивым режимом воды, зависящим от сезонных и многолетних климатических изменений водного и теплового баланса. Кроме того, наличие морозного зимнего периода также вызывает частые и существенные нарушения солености воды (Зайцева и соавт., 2012). Таким образом, озеро Нухэ-Нур является крайне нестабильной экосистемой, поэтому бактерии должны иметь различные метаболические адаптации, чтобы справиться с колебаниями факторов окружающей среды и выдерживать конкуренцию.

Цель работы – выделение, изучение эколого-физиологических свойств алкалофильных бактерий и определение физико-химических свойств их внеклеточных пептидаз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования послужили вода и донные отложения слабоминерализованного щелочного озера Нухэ-Нур, располагающегося в надпойменном понижении на степном участке Баргузинской долины, по правому берегу реки Баргузин ($53^{\circ}38'781''$ с.ш., $109^{\circ}56'807''$ в.д., высота 479 м над уровнем моря). Площадь озера составляет около 4 км², глубина достигает 2–3 м (Солоноватые и соленые озера..., 2009).

Отбор проб и определение физико-химических параметров воды проводили в летний период. Температура воды в момент отбора проб составляла 21.6°C, pH – 9.6, минерализация – 9.8 г/дм³. Окислительно-восстановительный потенциал был в пределах –0.75 мВ, что объясняется образованием восстановленных соединений за счет продуктов анаэробного распада органического вещества и низкими значениями растворенного кислорода. По содержанию главных ионов вода озера Нухэ-Нур относится к гидрокарбонатно-натриевому типу. Доминирующим катионом являлся Na^+ (2941 мг/дм³), концентрации ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} в воде были незначительны и составляли 42.6 и 12.0 мг/дм³ соответственно. Щелочность воды озера обусловлена высокими концентрациями ионов HCO_3^{-} и CO_3^{2-} , содержание которых достигало 5186 и 780 мг/дм³ соответственно. Концентрация хлоридов и сульфатов составляли 613 и 157 мг/дм³ соответственно.

Отбор проб и условия культивирования. Пробы воды и донных осадков озера Нухэ-Нур для микробиологических исследований отбирали в стерильную посуду. До проведения анализов пробы хранили в холодильнике. Посев осуществляли методом предельных разведений (1: 10) на модифицированной среде Пфеннига следующего состава (г/л): NH_4Cl – 0.5; K_2PO_4 – 0.5; MgCl_2 – 0.5; CaCl_2 – 0.05; NaCl – 25; дрожжевой экстракт – 0.5. В качестве субстрата вносили пептон – 2%. Культивирование проводили при температуре 30°C в течение 3–7 сут. Полученные накопительные культуры с целью выделения изолятов высевали на агаризованную среду Пфеннига. Чистоту культур контролировали визуально по однородности колоний и микроскопированием.

Микроскопические исследования. Морфологию, размеры, подвижность клеток изучали с помощью светового микроскопа AxioStar Plus (“Carl Zeiss”, Германия) в фазовом контрасте и на окрашенных препаратах при рабочем увеличении в 1000 раз. Окрашивание проводили по Граму.

Изучение эколого-физиологических свойств бактерий. Для выявления оптимальных параметров и границ роста изоляты культивировали при различных значениях pH среды (от 6.0 до 12.0, с интервалом в 0.5) и концентрации NaCl (0 до 30 г/дм³, с интервалом в 5 г/дм³). Диапазон pH устанавливали

добавлением 0.5 М NaOH и 25% раствора HCl. Температурные интервалы роста бактерий определяли с использованием градиентного термостата от 5 до 60°C. Способность к росту на среде с разными источниками белка проверяли на модифицированной среде Пфеннига, в которую вносили компоненты (пептон, триптон, казеин, желатин) до конечной концентрации 2% от объема среды. Рост бактерий определяли по изменению оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 560 нм.

Таксономический и филогенетический анализ.

Извлечение целевой ДНК проводили с помощью приготовления лизата из образца методом механической гомогенизации. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (“Illumina”, США) в ЦКП “Персистенция микроорганизмов” Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКБС УрО РАН).

Первичный анализ сходства полученных нуклеотидных последовательностей гена 16S рrНК выполняли с использованием инструментов веб-сервиса Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) с помощью алгоритма blastn. Соответствующие последовательности близкородственных видов были извлечены из базы данных GenBank. Множественное выравнивание сделано в программе CLUSTAL W. Филогенетические деревья построены методом присоединения соседей (“neighbor-joining”) в программе MEGA 7.0. Статистическую достоверность филогенетических реконструкций оценивали с помощью бутстреп-анализа путем построения 1000 альтернативных деревьев.

Определение протеолитической активности.

Культуры инкубировали при оптимальных условиях (температура культивирования 30°C, pH 8.0, минерализация 5 г/дм³, источник белка – триптон) на среде Пфеннига в течение 7 сут, затем клетки осаждали центрифугированием (12 000 об./мин; 15 мин). Внеклеточную протеолитическую активность полученного супернатанта определяли согласно методу Эрлангера.

В работе использованы следующие *n*-нитроанилидные субстраты, специфичные для эндопептидаз определенного типа или класса: GlpAALpNA (пироглутамил-аланил-аланил-лейцин-*n*-нитроанилид) – для субтилизин-подобных пептидаз; BzRpNA (N-бензоил-L-аргинил-*n*-нитроанилид) – для трипсин-подобных пептидаз; GlpFpNA (пироглутамил-фенилаланил-*n*-нитроанилид) – для химотрипсин-подобных пептидаз; GlpFApNA (пироглутамил-фенилаланил-аланил-*n*-нитроанилид) – для цистеиновых пептидаз. Субстраты для аминопептидаз: LpNA (L-лейцил-*n*-нитроанилид); FpNA (L-фенилаланил-*n*-нитроанилид).

Для измерения активности пептидаз в ячейку микропланшета вносили 160 мкл 0.1 М фосфатного буфера (pH 8.0), добавляли 10 мкл культуральной

жидкости, 10 мкл соответствующего субстрата и измеряли оптическое поглощение раствора в нулевой момент. Затем смесь инкубировали при 37°C, определяя изменение поглощения через различные промежутки времени. Количество образовавшегося продукта (*n*-нитроанилина) определяли спектрофотометрически при 405 нм на микропланшетном фотометре StatFax 2100 (“Awareness Technology Inc.”, США) в 96-луночных планшетах, используя дифференциальный фильтр 492 нм (Лаврентьева и соавт., 2021).

Изучение секреции внеклеточных пептидаз проводили в следующих условиях: в зависимости от источника белка (пептон, яичный альбумин), при различных значениях pH (9.0 и 10.0), минерализации (10 и 25 г/дм³), при различных температурах культивирования (5 и 30°C) и времени культивирования (3, 5 и 7 сут).

Определение оптимума pH активности и pH стабильности фермента. При определении оптимума pH действия секретируемой пептидазы по отношению к синтетическим субстратам был использован универсальный буфер в диапазоне pH 5.8–11.0 с шагом 1.0. В состав буфера входили 0.02 М H₃PO₄, 0.02 М CH₃COOH, 0.02 М H₃BO₃; необходимое значение pH получали, добавляя к смеси кислот 0.02 М NaOH. Для определения pH стабильности ферментный препарат инкубировали при 37°C в течение 4 ч в универсальном буферном растворе (pH 5.8–11.0). Затем образцы доводили до pH 8 с помощью 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.0) в щелочном диапазоне от pH 8.0, либо 0.1 М NaOH в кислом диапазоне до pH 8.0. Пептидазную активность ферментов определяли по методу, описанному выше.

Определение температурного оптимума и температурной стабильности фермента. Температурный оптимум фермента определяли при температурах от 5 до 60°C. Для изучения температурной стабильности растворов фермента инкубировали при тех же температурах в течение 4 ч, затем доводили до комнатной температуры и определяли активность, как указано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические и экофизиологические характеристики чистых культур протеолитических алкалофильных бактерий. Из проб воды и донных осадков озера Нуух-Нур было изолировано семь чистых культур. Выделенные штаммы на модифицированной среде Пфеннига образовывали различные колонии бежевого, желтого и оранжевого цветов с преимущественно гладким краем и выпуклым профилем. Штамм Н–Н6 формировал слипистые колонии желтого цвета с неровными краями. При микроскопировании клетки бактерий

Таблица. Основные характеристики выделенных чистых культур

Штамм	Источник выделения	Морфология клеток	Экофизиологические характеристики		
			pH, ед. пределы/опт.	NaCl, г/дм ³ пределы/опт.	T, °C пределы/опт.
H-H2	Вода	Гр ⁻ , неподвижные палочки (1.5 × 2.0 мкм)	8.0–11.0/ 9.0–9.5	5–30/ 10–15	10–50/ 30–35
H-H3	Вода	Гр ⁻ , подвижные, палочки (0.5 × 0.9 мкм)	7.5–11.0/ 9.0–9.5	0–30/ 5–10	10–50/ 30–35
H-H1	Вода	Гр ⁻ , подвижные палочки (1.5 × 0.6 мкм)	8.0–11.0/ 9.0–9.5	0–30/ 5–10	10–50/ 35–40
H-H4	Вода	Гр ⁺ , неподвижные кокки (0.8–1.0 мкм)	7.5–11.0/ 8.5–9.0	5–30/ 10–15	5–50/ 30–35
H-H6	Донные осадки	Гр ⁺ , неподвижные палочки (1.1 × 1.5 мкм)	7.5–10.5/ 8.0–9.0	0–25/ 10	5–40/ 20–30
H-H7	Донные осадки	Гр ⁺ , неподвижные кокки (0.5–0.8 мкм)	7.0–10.0/ 7.5–8.5	0–20/ 0–5	10–45/ 25–30
H-H5	Донные осадки	Гр ⁺ , неподвижные кокки (0.8–2.0 мкм)	7.0–10.0/ 7.5–8.0	0–20/ 0–5	5–45/ 25–30

были представлены грамположительными и грамотрицательными подвижными и неподвижными палочками и грамположительными неподвижными кокками (таблица).

Для выделенных чистых культур бактерий были определены диапазоны и оптимумы роста при различных значениях pH среды, концентрации NaCl и температуры (таблица). Выделенные бактерии росли в диапазоне pH от 7.0 до 11.0, с оптимумом pH 9.0–9.5, проявляя свойства облигатных алкалофилов. Исключение составляли культуры H-H6 и H-H7, рост которых наблюдался при pH 7.0–10.5 с оптимумом около 8.0. По отношению к концентрации NaCl выделенные бактерии в основном являлись галотolerантными, с диапазоном роста 0–30 г/дм³ и оптимумом около 10 г/дм³. Оптимальные для роста значения температуры варьировали в пределах 30–35°C, что позволило отнести выделенные культуры к группе мезофилов. В целом рост наблюдался в диапазоне от 5 до 50°C.

Изученные алкалофильные бактерии в аэробных условиях были способны к росту на различных белках и белковоподобных соединениях. Характерной особенностью являлся активный рост всех штаммов на легкогидролизуемых пептидных субстратах, таких как триптон и пептон. Полипептидные субстраты казеин и желатин активно утилизировали штаммы, выделенные из воды озера Нуух-Нур. Тогда как штаммы бактерий H-H5, H-H6 и H-H7, изолированные из донных отложений, обнаружили слабый рост на желатине и казеине.

Таксономическое положение выделенных культур алкалофильных бактерий. Для анализа филогенетического родства выделенных изолятов и их ближайших родственных видов было построено филогенетическое дерево с использованием метода присоединения соседей (рис. 1).

В результате анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК выявлены представители филумов *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*

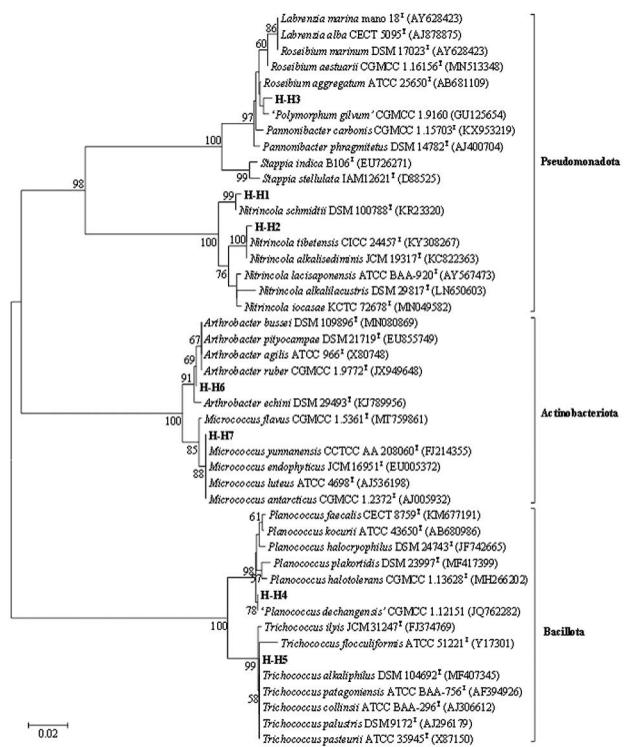


Рис. 1. Филогенетическое положение выделенных штаммов на дереве, построенном с использованием метода присоединения соседей. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (>50 %), определенная с помощью “bootstrap”-анализа.

и *Bacillota*. Полученные культуры демонстрировали 98.49–100% сходства с ранее описанными типовыми штаммами. Согласно полученным данным, штаммы Н–Н1 и Н–Н2, выделенные из проб воды озера Нуухэ-Нур, принадлежали к роду *Nitrincola*, семейству *Oceanospirillaceae*, порядку *Oceanospirillales* класса *Gammaproteobacteria*. Большинство представителей рода *Nitrincola* являются алкалофильными галотолерантными бактериями, типовые штаммы которых выделены преимущественно из содовых, соленых или щелочных озер в аридных и semi-аридных районах по всему миру (Phurbu et al., 2019). Штамм Н–Н1 демонстрировал достаточно высокий уровень сходства с *Nitrincola schmidtii* DSM 100788^T (99.14%), с которым объединялся на филогенетическом дереве с высокой достоверностью (99%), что позволяет предполагать их филогенетическую близость. Штамм Н–Н2 был близок к виду *Nitrincola alkalisediminis* JCM 19317^T (98.49%), однако на филогенетическом дереве формировал отдельную ветвь, близкую к *Nitrincola alkalisediminis* JCM 19317^T и *Nitrincola tibetensis* CICC 24457^T.

Штамм Н–Н3, согласно анализу последовательности гена 16S рРНК, принадлежал к невалидированному роду “*Polymorphum*” недавно выделенного семейства *Paracoccaceae* (Goker, 2022), порядка *Rhodobacterales* (*Alphaproteobacteria*). Изолят демонстрировал наибольшее сходство с единственным видом данного рода “*Polymorphum gilvum*” CGMCC 1.9160 (99.55%), который был выделен из засоленной почвы на нефтяном месторождении Шэнли в Китае (Cai et al., 2011), однако кластеризовался с ним с низкой вероятностью. На филогенетическом дереве штамм занимал положение внутри клады *Pannonibacter–Labrenzia–Roseibium–Stappia*, представители которой на данный момент отнесены к семейству *Stappiaceae* порядка *Hypomicrobiales* (Hordt et al., 2020). Основная часть типовых штаммов данной клады связаны с морскими экосистемами и выделены из воды, прибрежных и донных отложений, гидробионтов (красные водоросли, губки, прибрежные галофиты).

Последовательность гена 16S рРНК штамма Н–Н4 обнаруживала высокий уровень сходства с невалидированным видом “*Planococcus dechangensis*” CGMCC 1.12151 (99.78%) семейства *Caryophanaceae*, порядка *Caryophanales*, класса *Bacilli* (*Bacillota*). Достоверность объединения данных нуклеотидных последовательностей в один кластер составляла 77%, что свидетельствовало о возможной принадлежности штамма к этому виду. Род *Planococcus* на момент написания статьи содержал 36 видов (<https://lpsn.dsmz.de/genus/planococcus>), выделенных из различных мест обитания, в первую очередь, из морских экосистем (вода, донные и прибрежные отложения, гидробионты и морепродукты). Достаточно большое количество штаммов обнаружено в экстремальных условиях, включая холодные местообитания

(лед и цианобактериальные маты на территории Арктики и Антарктиды), засоленные и/или щелочные, а также загрязненные почвы (Yang et al., 2020; Uniacke-Lowe et al., 2024). Ранее было отмечено, что ферменты бактерий рода *Planococcus* проявляют устойчивость к низким температурам и высокому содержанию солей. Они также широко изучались на предмет их потенциального применения в биоремедиации, так как представители рода продемонстрировали способность разлагать и обезвреживать различные загрязняющие вещества, такие как фенол и тяжелые металлы (Yang et al., 2020).

Таксономическое положение штамма Н–Н5, выделенного из образцов донных отложений озера Нуухэ-Нур, было неоднозначно. Последовательность гена 16S рРНК имела 100% сходство с пятью видами, относящимися к роду *Trichococcus*, семейству *Carnobacteriaceae*, порядку *Lactobacillales*, классу *Bacilli* филума *Bacillota*, с которыми штамм Н–Н5 образовывал единый кластер на филогенетическом дереве. Ранее было выявлено, что виды *Trichococcus* обладают высокой идентичностью последовательностей гена 16S рРНК, и для таксономической идентификации более эффективно использовать значение ДНК–ДНК-гибридизации *in silico* (dDDH) и величину средней идентичности нуклеотидов (ANI), рассчитанные по полным геномным последовательностям (Dai et al., 2018; Parshina et al., 2019). Поэтому для уточнения видовой принадлежности данного штамма необходимо провести в будущем более детальное исследование. Особенностью представителей рода *Trichococcus* является способность расти в широком диапазоне температур (от 0 до 45°C), что может найти потенциальное применение для очистки сточных вод в условиях низких температур (Dai et al., 2018; Parshina et al., 2019). Кроме того, отмечена высокая метаболическая гибкость *Trichococcus*, например, их устойчивость к кислороду и металлам, а также способность адаптироваться к среде с высокой соленостью.

Из образцов донных отложений также было выделено два штамма, являющихся представителями филума *Actinomycetota* класса *Actinomycetia* порядка *Micrococcales* семейства *Micrococcaceae*. Штамм Н–Н6 имел высокий уровень сходства с *Arthrobacter ruber* CGMCC 1.9772^T (99.56%), однако на филогенетическом дереве образовывал отдельную ветвь в пределах рода *Arthrobacter*. Род *Arthrobacter*, который за последние несколько лет подвергся нескольким таксономическим пересмотрам, в настоящее время фигурирует как парафилетический таксон, что также было подтверждено недавними филогеномными исследованиями (Nouiou et al., 2018). Представители этого рода распространены повсеместно и часто составляют численно значимую часть микробиоты различных почв, что объясняется их чрезвычайной устойчивостью к высыханию

и нехватке питательных веществ (Jones, Keddie, 2006). Представители рода *Arthrobacter* также были выделены из осадков сточных вод, морских отложений и цианобактериальных матов на территории Антарктиды, карстовых и базальтовых водоносных горизонтов, образцов животных и растений. Сообщалось, что психрофильные штаммы этого рода являются наиболее распространенными и активными бактериями в илах подземных пещер (Jones, Keddie, 2006; Busse, Wieser, 2014; Flegler et al., 2020). Представители рода *Arthrobacter* используют широкий спектр органических соединений, ксенобиотиков и других токсичных веществ, и, следовательно, играют важную роль в их биодеградации в природной среде. Некоторые штаммы артробактерий способны переносить высокие концентрации тяжелых металлов, таких как кадмий и медь, или даже проводить детоксикацию, накапливая их в клетках (Busse, Wieser, 2014).

Штамм Н–Н7 демонстрировал 100% сходство последовательности гена 16S рРНК с *Micrococcus yunnanensis* CCTCC AA 208060^T. Но на филогенетическом дереве объединялся в один кластер с ближайшими гомологами, что не позволяет сделать однозначный вывод о видовой принадлежности данной культуры. Большинство представителей рода *Micrococcus*, в том числе и выделенный штамм Н–Н7, образуют желтые колонии и способны расти при высоких значениях pH (до 10). Они широко распространены в природе и были выделены из различных местообитаний, включая образцы почвы, воздуха, активного ила, органов и тканей животных и растений, молочных отходов, некоторые штаммы были описаны как условно-патогенные микроорганизмы человека (Prakash et al., 2014; Lee et al., 2022).

Определение протеолитической активности. Изученные алкалофильные бактерии в аэробных условиях были способны к росту на различных белках и белковоподобных соединениях. Характерной особенностью являлся активный рост всех штаммов на легкогидролизуемых пептидных субстратах, таких как триптон и пептон. Штаммы, выделенные из воды озера Нуухэ-Нур, активно утилизировали полипептидные субстраты казеин и желатин, тогда как штаммы бактерий Н–Н5, Н–Н6 и Н–Н7, изолированные из донных отложений, обнаружили слабый рост на желатине и казеине.

Для четырех штаммов (Н–Н1, Н–Н2, Н–Н3 и Н–Н4), выделенных из образцов воды озера Нуухэ-Нур, было проведено определение протеолитической активности.

Скорость выработки микробных ферментов в значительной степени зависит от различных параметров культивирования, в первую очередь от температуры, pH, источников углерода и азота, продолжительности культивирования. Оптимизация этих факторов важна для улучшения качества

продукта и экономической эффективности. Поэтому далее сравнительное изучение секреции внеклеточных пептидаз проводили в зависимости от источника белка (пептон, яичный альбумин), при различных значениях pH – 9.0 и 10.0, минерализации – 10 и 25 г/дм³, температуры – 5 и 30°C и времени культивирования (3, 5 и 7 сут). На рис. 2 представлены графики, отражающие субстраты, на которых наблюдалась наибольшая активность исследуемых штаммов в зависимости от условий культивирования.

Изучение спектра пептидаз, секретируемых различными штаммами, выявило, что штаммы бактерий Н–Н1 и Н–Н4 активно продуцировали пептидазы, гидролизующие синтетические субстраты, специфичные для субтилизинподобных пептидаз GlpAALpNa и аминопептидаз – LpNa (рис. 2а, 2г). Следует отметить, что штамм Н–Н1 показал наиболее высокую активность на 7 сут культивирования. Наибольшая активность в отношении субстрата, специфичного для субтилизинподобных пептидаз и аминопептидаз (LpNa) у штамма Н–Н1 обнаружена при минерализации 10 г/дм³ и достигала 0.49 и 0.55 ед./мл соответственно. Штамм Н–Н4 был наиболее активен на 3 и 7 сут культивирования при повышенных значениях pH. Максимальные активности для аминопептидаз обнаружены на 3 сут (LpNa) при pH 10.0 (0.41 ед./мл), для субтилизинподобных пептидаз на 7 сут при pH 10.0 (0.53 ед./мл).

Для штамма Н–Н2 были характерны высокие активности по отношению к аминопептидазам (LpNa и FpNa). Максимальные активности зафиксированы на 3 сут культивирования при pH 10.0 и составили 0.66 ед./мл по FpNa и 0.87 ед./мл по LpNa (рис. 2б).

Штамм Н–Н3 активно продуцировал пептидазы, специфичные для трипсинподобных пептидаз, высокая активность которых обнаружена на 5 и 7 сут при pH среды 9.0 (1.54 и 1.62 ед./мл соответственно). Кроме того, штамм Н–Н3 продуцировал пептидазы, гидролизующие синтетические субстраты, специфичные для аминопептидаз (LpNA), наибольшая активность которых обнаружена на 7 сут культивирования при минерализации среды 10 и 25 г/дм³ и составила 1.12 и 1.28 ед./мл соответственно (рис. 2в).

Одним из важных факторов, определяющих активность внеклеточных ферментов, является наличие в питательной среде оптимального субстрата. Показано, что наибольшая активность пептидаз обнаружена на среде с триптоном, присутствие в среде пептона или яичного альбумина не приводило к индукции ферментов. Исследованные нами культуры не гидролизовали субстраты, специфичные для химотрипсиноподобных пептидаз (GlpFpNA) независимо от времени культивирования, источников белка, температуры, pH и минерализации в среде.

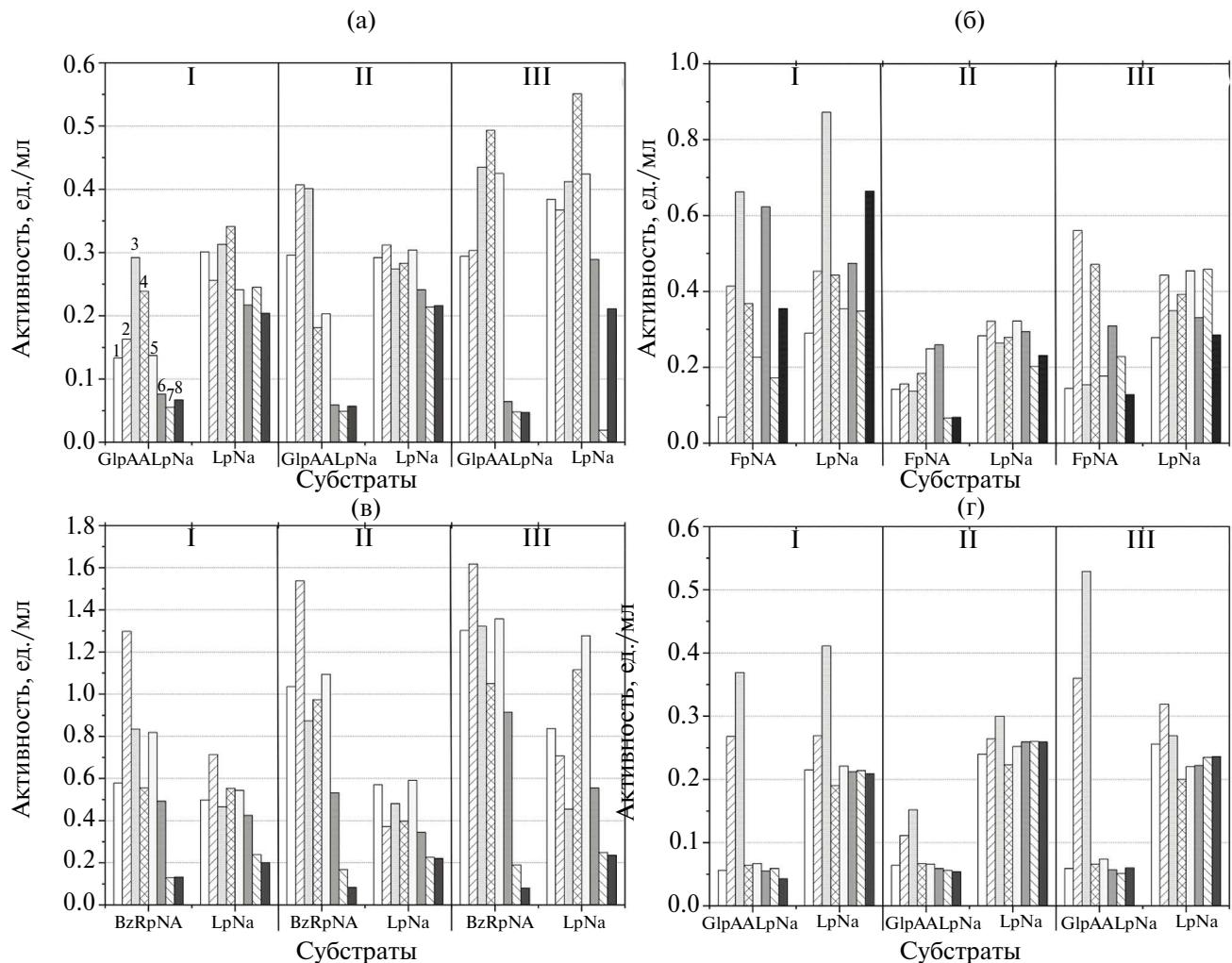


Рис. 2. Субстратная специфичность выделенных штаммов H-1 (а), H-2 (б), H-3 (в), H-4 (г) на синтетических субстратах при оптимальных условиях (I) и различных значениях pH 9 (2) и 10 (3), минерализации 10 (4) и 24 (5) г/дм³, источниках белка – пептон (6), яичный альбумин (7) и температуре культивирования 5°C (8) в зависимости от времени культивирования (3, 5 и 7 сут).

Необходимо отметить, что увеличение значений pH среды, а также минерализации в большинстве случаев приводило к увеличению активности ферментов исследуемых штаммов, что, вероятно, отражает адаптационные механизмы культур, выделенных из воды содового озера Нуух-Нур. Полученные данные свидетельствуют о том, что изученные алкалофильные бактерии имеют широкий спектр секреции пептидаз, что, возможно, в природных местообитаниях позволяет им успешно использовать природные белковые субстраты.

Определение оптимума и стабильности ферментов при разных значениях температуры и pH. Среди изученных параметров температура и pH считаются наиболее важными для работы ферментов. Было изучено влияние температуры и pH на активность

и стабильность у наиболее представленных внеклеточных пептидаз, гидролизующих GlpAALpNa у штаммов H-1 и H-4, LpNa у штамма H-2 и BzRpNA у штамма H-3.

Температурный оптимум ферментов штаммов H-1, H-2 и H-4 составлял 30°C, у штамма H-3 ферменты проявляли максимум активности при 40°C. Пептидазы сохраняли более 50 % активности при температуре до 50°C (рис. 3).

Исследование влияния pH на пептидазы, секреции штаммами H-1, H-2 и H-4, показало, что пептидазы были стабильны при pH от 7.0 до 10.0 и имели оптимум активности при pH 9.0. Пептидазы штамма H-3 были стабильны при pH 5.8–10.0 с оптимумом активности при pH 8.0 (рис. 4). Учитывая, что пептидазы были активны в диапазоне значений pH от 8.0 до 10.0 и показали высокую

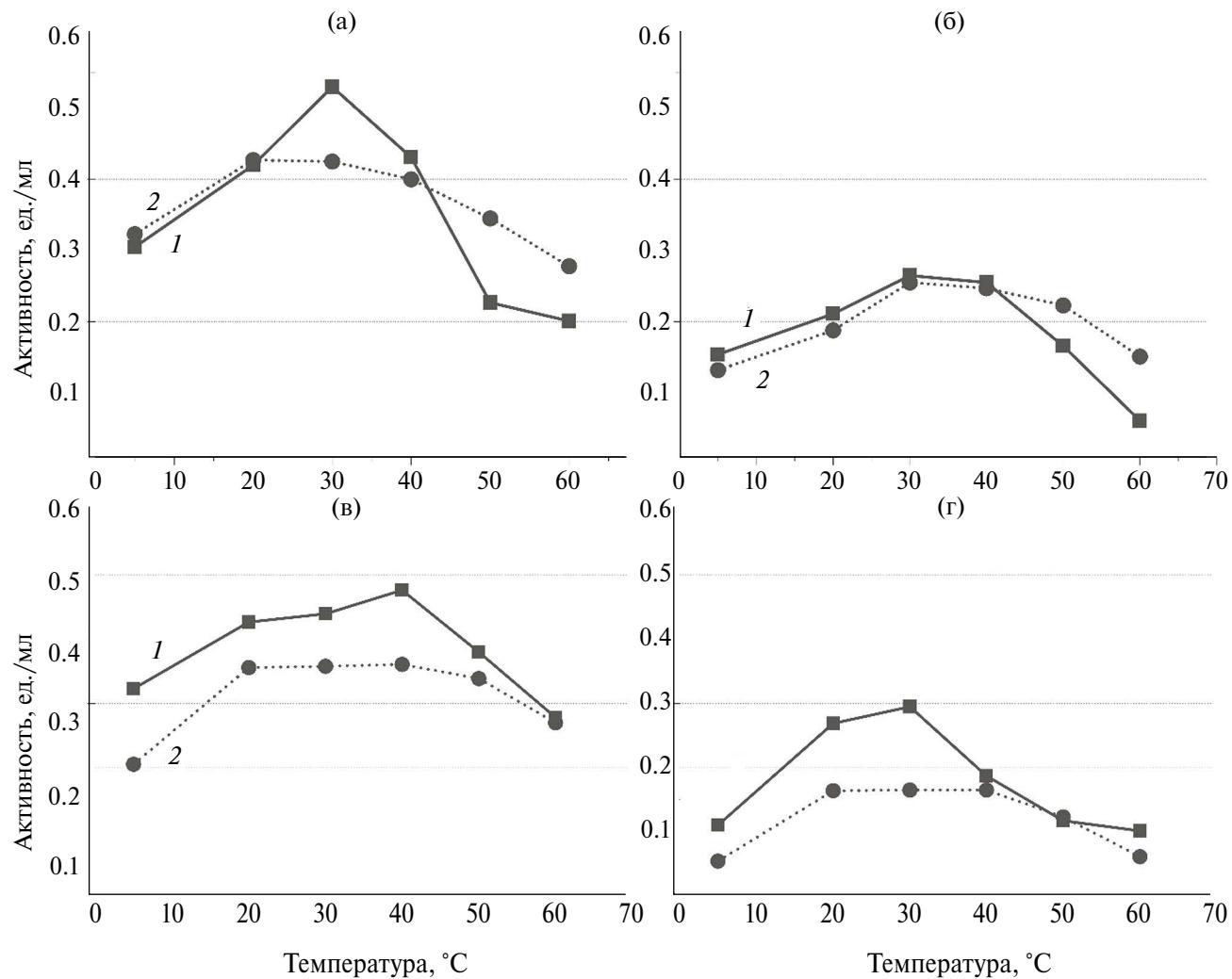


Рис. 3. Температурный оптимум (1) и термостабильность (2) внеклеточных пептидаз выделенных бактерий: а – Н–Н1; б – Н–Н2; в – Н–Н3; г – Н–Н4.

стабильность – до рН 10.0, их следует отнести к классу щелочных пептидаз.

Таким образом, определение физико-химических свойств ферментов исследуемых штаммов показало, что исследуемые пептидазы имели высокую активность и стабильность в широком диапазоне рН (5.8–10.0) и температуры (5–50°C), что в целом соответствует условиям среды, в которых функционируют бактерии в естественных местообитаниях.

Алкалофильные протеолитические бактерии, представители родов *Nitrincola* и “*Polymorphum*” филума *Pseudomonadota*, родов *Trichococcus* и *Planococcus* филума *Bacillota*, родов *Arthrobacter* и *Micrococcus* филума *Actinomycetota* были выделены из образцов воды и донных осадков содового озера Нуухэ–Нур. В основном их ближайшие гомологии выделены из экстремальных сред, такие как соленые (морские) щелочные среды. Исследование

экофизиологии культур показало, что все штаммы развиваются в области высоких значений рН и являются облигатными алкалофилами и умеренными алкалофилами. По отношению к солености выделенные бактерии в основном являлись галотолерантными. Анализ пептидазной активности выделенных штаммов показал высокую стабильность исследуемых ферментов в щелочной области, которая, в целом, типична для протеолитических ферментов алкалофильных бактерий. Активная секреция внеклеточных ферментов совпадает с замедлением роста культур в период пост-экспоненциальной фазы. Данные анализа субстратной специфичности наиболее активных внеклеточных пептидаз указывают на их принадлежность к классу сериновых протеаз субтилизин-подобного и трипсин-подобного типа, а также аминопептидаз. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что изученные

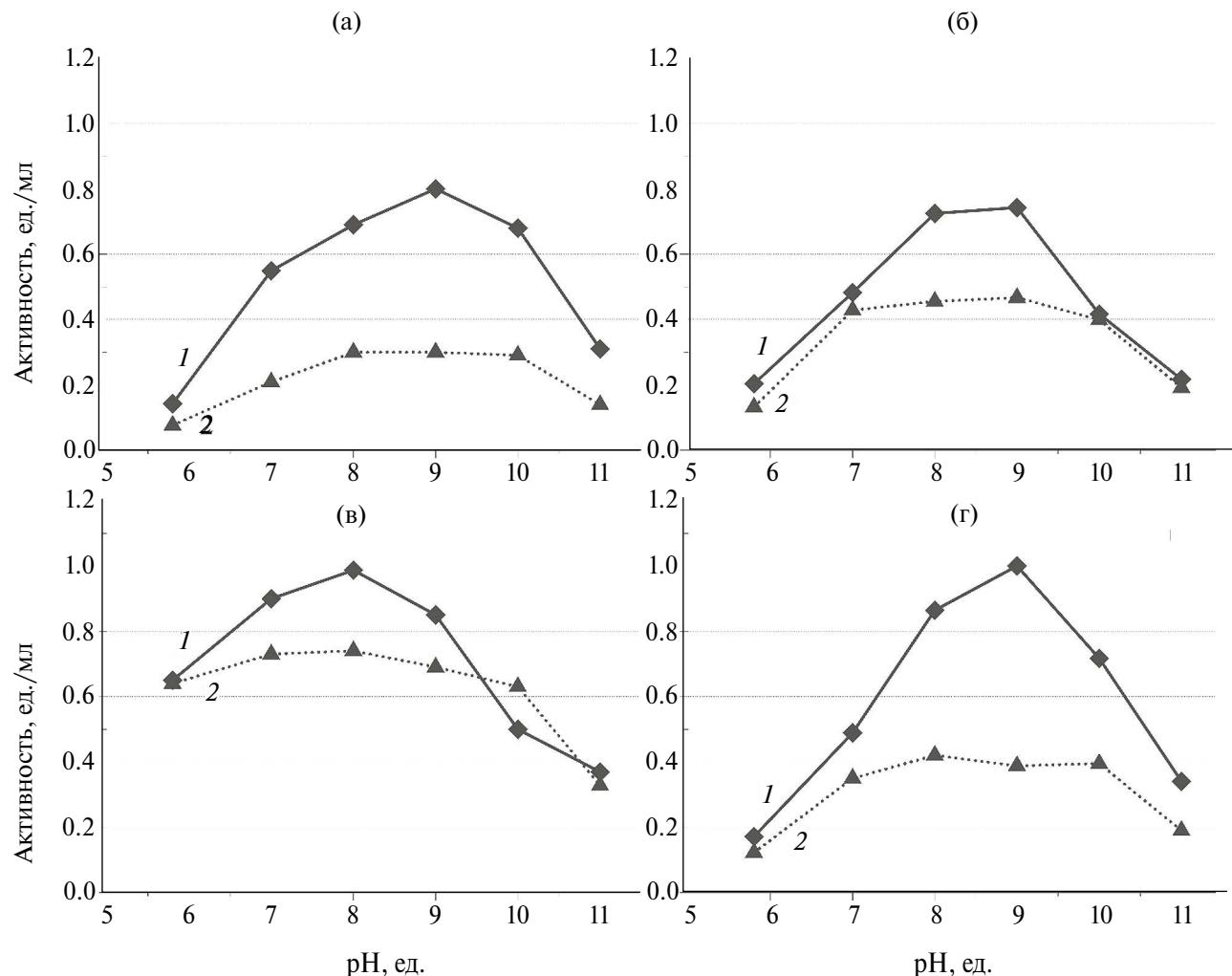


Рис. 4. Оптимум pH (1) и pH-стабильность (2) внеклеточных пептидаз выделенных бактерий: а – H-H1; б – H-H2; в – H-H3; г – H-H4.

алкалофильные бактерии имеют широкий спектр секретируемых пептидаз, что, возможно, в природных местообитаниях позволяет им успешно использовать природные белковые субстраты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20050, <https://rscf.ru/project/24-24-20050/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Зайцева С.В., Абидуева Е.Ю., Бурюхов С.П., Намсараев Б.Б. Факторы, контролирующие активность микробного сообщества щелочного озера Белое (Забайкальский край) // Микробиология. 2012. Т. 81. С. 508–516.

Zaitseva S.V., Abidueva E.Y., Buryukhaev S.P., Namsaraev B.B. Factors controlling the activity of the microbial community of the alkaline lake Beloe (Transbaikal region) // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. C. 468–476.

Лаврентьева Е.В., Эрдынгевеа Е.Б., Дунаевский Я.Е., Болтянская Ю.В., Кевбрин В.В. Внеклеточные

- высокостабильные щелочные пептидазы алкалофильных бактерий *Alkalicaulis satelles* и *Aliidiomarina* sp., перспектива их применения в составе дeterгентов // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. С. 563–570.
- Lavrentyeva E.V., Erdyneeva E.B., Dunaevskii Y.E., Boltynskaya Y.V., Kevbrin V.V.* Extracellular, highly stable, alkaline peptidases of the alkalophilic bacteria *Alkalicaulis satelles* G-192^T and *Aliidiomarina* sp. P-156 and their possible use in the composition of detergents // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. P. 725–731.
- Лаврентьева Е.В., Эрдынцева Е.Б., Дунаевский Я.Е., Болтынская Ю.В., Кевбрин В.В.* Пептидазная активность бактерий рода *Proteinivorax* и их возможная экологическая роль в микробном сообществе содовых озер Танатар (Алтайский край) // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 735–739.
- Lavrentyeva E.V., Erdyneeva E.B., Dunaevskii Y.E., Boltynskaya Y.V., Kevbrin V.V.* Peptidase activity of *Proteinivorax* bacteria and their possible ecological role in the microbial communities of Tanatar soda lakes (Altai Krai, Russia) // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 773–776.
- Солоноватые и соленые озера Забайкалья: гидрохимия, биология / Отв. ред. Б.Б. Намсараев. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского госуниверситета, 2009. 340 с.
- Эрдынцева Е.Б., Раднагуруева А.А., Дунаевский Я.Е., Белькова Н.Л., Намсараев З.Б., Лаврентьева Е.В.* Аминопептидазная активность галоалкалофильных бактерий рода *Halomonas*, выделенных из содово-соленых озер пустыни Бадаин Жаран // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 397–408.
- Erdyneeva E.B., Radnagurueva A.A., Lavrentyeva E.V., Dunaevsky Y.E., Belkova N.L., Namsaraev Z.B.* Amino-peptidase activity of haloalkalophilic bacteria of the genus *Halomonas* isolated from the soda-saline lakes in the Badain Jaran desert // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 538–548.
- Banerjee G., Ray A.K.* Impact of microbial proteases on biotechnological industries // Biotechnology and genetic engineering reviews. 2017. V. 33. P. 119–143.
- Busse H.-J., Wieser M.* The genus *Arthrobacter* // The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. P. 105–132.
- Cai M., Wang L., Cai H., Li Y., Tang Y.Q., Wu X.L.* *Rubrimonas shengliensis* sp. nov. and *Polymorphum gilvum* gen. nov., sp. nov., novel members of *Alphaproteobacteria* from crude oil contaminated saline soil // Syst. Appl. Microbiol. 2011 V. 34. P. 321–327.
- Dai Y.M., Zhang L.L., Li Y., Li Y.Q., Deng X.H., Wang T.T., Yang F., Tian Y.Q., Li N., Zhou X.M., Liu X.F., Wen-Jun Li W.J.* Characterization of *Trichococcus paludicola* sp. nov. and *Trichococcus alkaliphilus* sp. nov., isolated from a high-elevation wetland, by phenotypic and genomic analyses // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 99–105.
- Fleger A., Runzheimer K., Kombeitz V., Manz A.T., Heidler von Heilborn D., Etzbach L., Schieber A., Holzl G., Huttel B., Woehle C., Lipski A.* *Arthrobacter bussei* sp. nov., a pink-coloured organism isolated from cheese made of cow's milk // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 3027–3036.
- 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. V. 12. P. 133–145.
- Goker M.* Filling the gaps: missing taxon names at the ranks of class, order and family // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2022. V. 72. Art. 5638.
- Gupta G.N., Srivastava S., Khare S.K., Prakash V.* Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment // Int. J. Agric. Environ. Biotechnol. 2014. V. 7. P. 371–380.
- Hordt A., Lopez M.G., Meier-Kolthoff J.P., Schleuning M., Weinhold L.M., Tindall B.J., Gronow S., Kyrpides N.C., Woyke T., Goker M.* Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of *Alphaproteobacteria* // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 468.
- Ibrahim A.S.S., Elbadawi Y.B., El-Tayeb M.A., Al-maary K.S., Maany D.A.F., Ibrahim S.S.S., Elagib A.A.* Alkaline serine protease from the new halotolerant alkaliphilic *Salipaludibacillus agaradhaerens* strain AK-R: purification and properties // 3 Biotech. 2019. V. 9. Art. 391.
- Jones D., Keddie R.M.* The genus *Arthrobacter* // The Prokaryotes / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E.N.Y.: Springer, 2006. P. 945–960.
- Lee A.Y., Chen C.H., Liou J.S., Lin Y.C., Hamada M., Wang Y.T., Peng L.L., Chang S.C., Chen C.C., Lin C.F., Huang L., Huang C.H.* *Micrococcus porci* sp. nov., isolated from feces of black pig (*Sus scrofa*) // Life. 2022. V. 12. Art. 1749.
- Masi C., Gemechu G., Tafesse M.* Isolation, screening, characterization, and identification of alkaline protease-producing bacteria from leather industry effluent // Ann. Microbiol. 2021. V. 71. Art. 24.
- Naveed M., Nadeem F., Mehmood T., Bilal M., Anwar Z., Amjad F.* Protease – a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review // Catal. Lett. 2021. V. 151. P. 307–323.
- Nguyen T.T.H., Myrold D.D., Mueller R.S.* Distributions of extracellular peptidases across prokaryotic genomes reflect phylogeny and habitat // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 413.
- Nouioui I., Carro L., García-López M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpides N.C., Pukall R., Klenk H.P., Goodfellow M., Göker M.* Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2007.
- Parshina S.N., Streptis N., Aalvink S., Nozhevnikova A.N., Stams A.J.M., Sousa D.Z.* *Trichococcus shcherbakoviae* sp. nov., isolated from a laboratory-scale anaerobic

- EGSB bioreactor operated at low temperature // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 529–534.

Phurbu D., Pema Y., Ma C., Lu H., Li H., Tian Y., Xing P. Nitrincola tibetensis sp. nov., isolated from lake XuguoCo on the Tibetan Plateau // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 123–128.

Prakash O., Nimonkar Y., Munot H., Sharma A., Vemuluri V.R., Chavadar M.S., Shouche Y.S. Description of *Micrococcus aloeverae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Aloe vera* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 3427–3433.

Preiss L., Hicks D.B., Suzuki S., Meier T., Krulwich T.A. Alkaliphilic bacteria with impact on industrial applications, concepts of early life forms, and bioenergetics of ATP synthesis // Front. Bioeng. Biotechnol. 2015. V. 3. Art. 75.

Sharma A. K., Singh S. P. Effect of amino acids on the repression of alkaline protease synthesis in haloalkaliphilic *Nocardiopsis dassonvillei* // Biotechnol. Rep. (Amst). 2016. V. 17. № 12. P. 40–51.

Sorokin D.Y., Banciu H.L., Muyzer G. Functional microbiology of soda lakes // Curr. Opin. Microbiol. 2015. V. 25. P. 88–96.

Sorokin D.Y., Berben T., Melton E.D., Overmars L., Vavourakis C.D., Muyzer G. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes // Extremophiles. 2014. V. 18. P. 791–809.

Uniacke-Lowe S., Stanton C., Hill C., Ross P. *Planococcus notacanthi* sp. nov., isolated from the skin of a deep-sea snub-nosed spiny eel // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2024. V. 74. Art. 006298.

Yang R., Zhang B., Wang J., Tai X., Sun H., Zhang G., Liu G. *Planococcus lenghuensis* sp. nov., an oil-degrading bacterium isolated from petroleum-contaminated soil // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. P. 839–850.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Diversity and Characteristics of Alkalophilic Proteolytic Bacteria from Soda Lake Nukhe-Nur (Barguzinsky Basin, Buryatia)

E. V. Lavrentyeva^{1, 2, *}, E. P. Nikitina^{2, 3}, T. G. Banzaraktsaeva¹, V. B. Dambaev¹

¹*Institute of General and Experimental Biology of the SB RAS, Ulan-Ude, 660047, Russia*

²Dorzhii Banzarov Buryat State University, Ulan-Ude, 670000, Russia

³Baikal Institute of Nature Management of the SB RAS, Ulan-Ude, 660047, Russia

*e-mail: lena_l@mail.ru

Abstract. Seven studied strains of proteolytic bacteria belonging to the phyla *Pseudomonadota*, *Actinomycetota* and *Bacillota* were isolated from water and bottom sediment samples of the Nukhe-Nur soda lake in the Barguzin depression. Determination of the ecophysiological properties of the cultures showed that the strains were alkaliphilic and alkali tolerant and developed at pH from 7.0 to 11.0 (optimum pH 7.5–9.5). In relation to salinity, the isolated bacteria were mainly halotolerant. It was shown that the strains are capable of hydrolyzing p-nitroanilide substrates and exhibited maximum activity in hydrolysis of GlpAALpNA, BzRpNA and LpNA. It was established that peptidases are most active under alkaline conditions at pH 8.0–10.0 and are thermostable up to 50°C. The study of the activity of extracellular peptidases in different species of alkaliphilic bacteria allowed us to identify natural isolates with high enzymatic activity and different spectra of secreted extracellular peptidases, which, possibly, allows them to successfully use natural protein substrates in natural habitats.

Keywords: alkaliphilic bacteria, peptidases, soda lakes, Barguzin Basin