

А.С. Машжан^{1,2,3}, **Р. Хавьер-Лопес²**, **А.О. Бисенбай^{1,3}**,
А.Б. Галипова¹, **И.С. Савицкая¹**, **Н.К. Биркеланд²**,
А.С. Кистаубаева^{1*}

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Университет Бергена, Норвегия, г. Берген

³Филиал ТОО «Национальный центр биотехнологии», Казахстан, г. Алматы

*e-mail: kistaubayeva.kaznu@gmail.com

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ГОРЯЧЕГО ИСТОЧНИКА КАЗАХСТАНА И ОЦЕНКА ИХ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Термофильные микроорганизмы являются менее изученной, но важной группой микроорганизмов за счёт их способности продуцировать уникальные по своим свойствам ферменты. В связи с этим требуется изучение ранее не исследованных термальных источников на территории Казахстана для поиска новых теплолюбивых микроорганизмов с биотехнологическим потенциалом. Для этого в данной работе впервые были выделены и охарактеризованы термофильные бактерии из геотермального источника, Алматинская область, Республика Казахстан на предмет их способности продуцировать внеклеточные гидролитические ферменты (амилаза, целлюлаза, протеаза, и липаза). По результатам проведенных исследований было определено, что три из пяти изолятов показали высокую ферментативную активность на все четыре типа фермента и остальные продуцировали, по крайней мере, несколько внеклеточных гидролитических ферментов. Филогенетический анализ по универсальному бактериальному гену 16s рНК и результаты биохимической характеристики (на полосках API 50CHE и API Zym) показали, что все выделенные изоляты из термального источника отличаются от ныне известных видов рода *Geobacillus*, что в свою очередь указывает на то, что данный геотермальный источник является богатым местом обитания новых неизученных видов микроорганизмов с уникальными ферментами, более того один из пяти изолятов показал самую высокую оптимальную температуру роста при 75°C среди представителей данного рода.

Ключевые слова: термофильные бактерии, идентификация, 16S рНК, филогенетический анализ, гидролитические ферменты.

A. Mashzhan^{1,2,3*}, R. Javier-Lopez², A.O. Bisenbay^{1,3},
A.B. Talipova¹, I.S. Savitskaya¹, N.K. Birkeland², A.S. Kistaubayeva^{1*}

¹Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

²University of Bergen, Norway, Bergen

³Almaty Branch of the National Center for Biotechnology, Kazakhstan

*e-mail: kistaubayeva.kaznu@gmail.com

Identification of thermophilic bacteria from the hot spring of Kazakhstan and assessment of their enzymatic activity

Thermophilic microorganisms are a less studied, but important group of microorganisms due to their ability to produce enzymes that are unique in their properties. In this regard, it is required to study previously unexplored thermal springs on the territory of Kazakhstan in order to search for new thermophilic microorganisms with biotechnological potential. For this purpose, under this study, for the first time, thermophilic bacteria from a geothermal source near the city of Zharkent, Almaty region, Republic of Kazakhstan were isolated and characterized for their ability to produce extracellular hydrolytic enzymes (amylase, cellulase, protease, and lipase). Based on the results of the studies, it was determined that three of the five isolates showed high enzymatic activity for all four types of enzymes and the rest produced at least several extracellular hydrolytic enzymes. Phylogenetic analysis for the universal bacterial 16s rRNA gene and biochemical characterization results (on API 50CHE and API Zym strips) showed that all derived isolates from the thermal spring differ from the currently known species of the genus *Geobacillus*, which indicates that this geothermal spring is a

rich habitat for new unexplored species of microorganisms with unique enzymes. Moreover, one of the five isolates showed the highest optimal growth temperature at 75°C among the representatives of this genus.

Key words: thermophilic bacteria, identification, 16S rRNA, phylogenetic analysis, hydrolytic enzymes.

А.С. Машжан^{1,2,3}, Р. Хавьер-Лопес², А.О. Бисенбай^{1,3},
А.Б. Талипова¹, И.С. Савицкая¹, Н.К. Биркеланд², А.С. Кистаубаева^{1*}

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²Берген университеті, Норвегия, Bergen қ.

³«Национальный центр биотехнологии», Қазақстан, ЖШС Алматы қаласындағы филиалы.

*e-mail: kistaubayeva.kaznu@gmail.com

Қазақстанның ыстық термалды су көздерінен термофильді бактерияларды анықтау және олардың ферментативті белсенділігін бағлау

Термофилді микроорганизмдердің зерттелуі сирек кездеседі, бірақ ерекше ферменттер бөліп шығару қасиеттеріне байланысты микроорганизмдердің маңызды тобына жатады. Осы тұрғыдан алғанда, Қазақстан аумағындағы зерттелмеген ыстық су көздері биотехнологиялық потенциалы бар жаңа жылу сүйгіш микроорганизмдерді іздеу үшін зерттеуді қажет етеді. Бұл жұмыста алғаш рет Қазақстан Республикасы, Алматы облысындағы геотермиялық су көзінен термофилді бактериялар бөлініп, олардың жасушадан тыс гидролитикалық ферменттерді (амилаза, целлюлаза, протеаза, және липаза) зерттелген. Зерттеу нәтижелері бойынша бес изоляттың үшеуі ферменттің барлық төрт түріне жоғары ферментативті белсенділік танытқан, ал қалғандары кем дегенде бірнеше жасушадан тыс гидролитикалық ферменттер түзетіні анықталған. Бактериялық әмбебап 16s рРНҚ генінің филогенетикалық талдауы және биохимиялық сипаттамасының нәтижелері (API 50CHE және API Zym жолақтарында) осы термалды су көзінен оқшауланған барлық изоляттардың қазіргі уақытта белгілі *Geobacillus* тұқымдас түрлерінен ерекшеленетінін көрсетті. Аталған геотермалды су көзі – бірегей ферменттері бар зерттелмеген жаңа микроорганизмдердің түрлеріне бай мекен екені көрсетілген және бес изоляттың біреуі 75°C-та өсуге қабілеттілігі бар екені анықталған, бұл осы тұқымдас өкілдерінің арасында ең жоғары оңтайлы өсу температурасы екені дәлелденген.

Түйін сөздер: термофильді бактериялар, идентификация, 16S рРНҚ, филогенетикалық талдау, гидролиздік ферменттер.

Введение

Геотермальные зоны представляют собой селективные места обитания термофильных микроорганизмов, служащих ценным источником уникальных биомолекул и экстремозимов [1, 2]. Наиболее часто выделяемыми термофильными бактериями из горячих источников являются представители рода *Geobacillus*, *Anoxybacillus* и другие близкородственные бактерии [3, 4]. Бактерии рода *Geobacillus* вызывают особый интерес у биотехнологов за счёт их способности продуцировать термозимы, такие как, протеазы [5, 6], липазы [7, 8] и биоактивные молекулы. Род *Geobacillus*, как один из представителей порядка *Bacillales*, включает аэробные и факультативно анаэробные спорообразующие бациллы. До 2001 года они были сгруппированы как термофильные виды *Bacillus* spp., но накопление доказательств кластеризации многих термофилов в отдельную подгруппу (группа 5), на основе анализа бакте-

риального гена 16S рРНҚ, привело к их рекласификации в отдельный род, *Geobacillus* gen. nov [9]. Большинство штаммов *Geobacillus* растут в интервале температур 45-70°C и, будучи катаболически разнообразными, легко выделяются из активных сообществ, растущих в компосте, горячих источниках и глубоких геотермальных участках. Однако *Geobacillus* spp. также могут быть выделены в таких средах как почва, боливийские Анды, глубоководные воды и даже Марианский желоб, где температура редко превышает отметку 30°C. Это парадоксальное явление было недавно исследовано учёным Zeigler [10], который связывает это в основном со свойствами *Geobacillus* spp. образовывать споры.

Поиск и активное изучение новых термофильных микроорганизмов с высокой ферментативной активностью связан с их огромным потенциалом применения в фармацевтике, производстве моющих средств, целлюлозно-бумажной и крахмальной промышленности и многих

других производственных отраслях [11]. В этих промышленных процессах в основном используются такие ферменты как амилаза, целлюлаза, ксиланаза, пектиназа, протеаза и липаза, многие из которых были выделены из термофильных микроорганизмов и стабильно работают при высоких температурах [12, 13]. Эти ферменты секретируются культуральную жидкость, что значительно облегчает процесс очистки конечного продукта от клеток продуцентов.

С наступлением новой эры науки улучшились инструменты и методы в изучении микробиологических объектов. Современные молекулярно-биологические и независимые от культивирования методы существенно расширили наше понимание структурного и функционального состава микробных сообществ в термальных источниках [14]. Однако выделение чистых культур все ещё необходимо для оценки физиологического и биотехнологического потенциала термофильных микробов, обитающих в горячих источниках.

Цель настоящего исследования – выделить и идентифицировать термофильные бактерии из Жаркентского геотермального источника, способных продуцировать внеклеточные гидролитические ферменты, такие как липаза, протеаза, амилаза и целлюлаза.

Материалы и методы

Координаты геотермального источника Жаркент – 43°58'377" Ш., 079°39'424" Д., находится в Алматинской области, рядом с городом Жаркент, в урочище Жаркунак. На территории геотермального источника расположено множество термальных скважин с разной температурой и глубиной. Из-за своей удалённости, источник менее подвержен влиянию антропогенного фактора, и тем самым сохранил своё биоразнообразие. Температуру и pH воды в источнике определяли *in situ* с использованием портативного комбинированного измерителя температуры pH / EC / TDS (Milwaukee BEM802). Температура горячего источника в период отбора проб составляла 76°C, значение pH воды находилось в диапазоне 7-8. Образцы воды отбирались в стерильные пробирки объёмом 50 мл (Falcon).

Отобранную пробу воды высевали на питательную среду Nutrient Agar (HiMedia, Индия). Для получения чистых изолятов использовали метод штриха с повторением не менее трех раз. Такие характеристики как клеточная морфоло-

гия, спорообразование и подвижность изолятов бактерий анализировали с помощью фазо-контрастного микроскопа (Nikon, Eclipse E400) и сканирующего электронного микроскопа (Jeol JSM-7400F). Сканирование проводилось при увеличениях от 2,000X до 8,500X [15].

Изоляты тестировали на стрипах API 50СНВ (BioMerieux, Inc., Франция) на усвоение и ферментацию 49 соединений углеводов. Бактериальной суспензии в объёме 100 мкл наносились на полоски (strips) и инкубировались при 55-65°C в течение 48 часов в согласно инструкциям производителя. Каталазная активность определялось по образованию пузырьков после добавления нескольких капель 3% H₂O₂ [16]. Активность оксидазы определялась по окислению тетраметил-р-фенилендиамина [17]. Выделение H₂S определялась с использованием агаризованной среды TSI, (Triple sugar iron agar (Sigma, США)).

Для определения влияния температуры на рост изолятов, микроорганизмы культивировались в колбах объёмом 50 мл на универсальной среде Nutrient broth (Sigma-Aldrich, США) в объёме 25 мл. Оптимальные условия культивирования подбирались путём инкубирования в интервале заданных температур (от 40 до 95°C с регулярным шагом в 5°C), времени максимального накопления биомассы (12, 24, 36 часов) в зависимости от посевной концентрации клеток (10⁵-10⁷ КОЕ/см³) и pH среды (от 3 до 10). Рост изолятов измерялись путём определения оптической плотности. Оптическую плотность детектировали при 620 нм на спектрофотометре (спектрофотометр PD-303, Arel, Япония).

Скрининг термофильных бактерий, продуцирующих внеклеточные гидролазы, проводился с использованием различных источников углерода, таких как карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), картофельный крахмал, твин 80 и обезжиренное молоко. Ферментативная активность изолятов анализировалась по способности синтезировать протеазу, амилазу, липазу и целлюлазу по размеру (мм) и наличию зон специфического окрашивания или просветления вокруг колоний [16]. Эти зоны образуются в результате гидролиза соответствующих субстратов в конечные продукты ферментативных реакций.

Гидролиз казеина тестировались на чашках со средой, содержащий (мас./об.) сухое обезжиренное молоко (20%), глюкозу (0,5%) и гелрит (1,5%); на положительные результаты указывали чёткие зоны гидролиза вокруг колоний [16]. Разложение КМЦ тестировалась на среде, содержа-

шей (мас./об.) КМЦ (1%), NaCl (0,01%), NaNO₃ (0,02%), K₂HPO₄ (0,01%), MgSO₄ (0,003%), KCl (0,003%), пептон (0,01%), гелерит (1,5%) [18, 19]. Гидролиз крахмала определялась путём тестирования на чашках со средой, содержащей (мас./об.) растворимый крахмал (2%), триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,1%) и гелерит (1,5%). Прозрачная зона гидролиза вокруг колонии, образовавшаяся после окрашивания раствором Люголя (0,5% I₂ и 1,0% KI в дистиллированной воде), указывала на наличие активности целлюлазы и амилазы [20, 21]. **Продукция липолитических ферментов** оценивалась на среде Spirit blue agar (Sigma, США) с добавлением 1% твина 80 (Sigma, США) и гелерита (1,5%). Наличие липазной активности определялись видимыми осадками кальциевых солей жирных кислот [16]. Ферментативная активность определялась, также с использованием индикаторных стрипов API ZYM (bioMérieux, Inc., Франция). Целостность клеток изолятов была разрушена с помощью соникатора (MSE Mk 2 150 watts, USA).

После культивирования бактерий перенесли в пробирку Falcon объемом 25 мл, и затем центрифугировали при 4°C в течение 12 минут при 7500 об/мин, надосадочная жидкость сливалась. Геномная ДНК выделяли из осажденных клеток с помощью набора для экстракции бактериальной геномной ДНК NA2100 SIGMA GenElute™ компании Sigma-Aldrich, согласно стандартному протоколу производителя. Качество и количество ДНК определялась с помощью UV-Vis спектрофотометра NanoDrop™ One / OneC Microvolume UV-Vis от ThermoFisher Scientific. После этого проводились электрофорез в 0,8% агарозном геле для анализа размера и качества ДНК. В качестве маркера использовались GeneRuler DNA Ladder Mix от ThermoFisher (номер по каталогу: SM0333). Электрофоретическое разделение проводилось в течение 35 минут при 80 В /см. Для амплификации генов 16S рРНК были использованы универсальные пары праймеров 27f (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA -3') и 1525r (5'-GAA AGG AGG AGA TCC AGC C-3') (нумерация *Escherichia coli*) [22]. Состав реакционной смеси, использованной для амплификации, содержал: 10 нг ДНК, 5 мкл 10x буфера для ПЦР, 5 мкл 10 mM дНТФ, 0,5 мкл каждого праймера (10 mM / мкл), 0,125 мкл Taq ДНК-полимеразы и деионизированная вода до конечного объема 25 мкл. Программа ПЦР: начальная денатурация матриц в течение 3 мин при 96°C, затем 30 циклов стадий включающих;

денатурацию в течение 30 с при 96°C, отжиг в течение 30 с при 55°C и удлинение в течение 2,5 мин при 72°C (окончательное удлинение в течение 10 мин при 72°C). Для очистки ПЦР продуктов использовали набор NA1020-1KT GenElute™ PCR Cleanup Kit (Sigma).

Продукты ПЦР анализировались в лаборатории UiB Sequencing facility (Бергенский университет, Норвегия) для проведения циклов реакции секвенирования в соответствии с протоколом Big Dye v3.1 в. Полученные последовательности были скорректированы с использованием программного обеспечения MEGA X [23]. Затем они были объединены с использованием программного пакета EMBOSS [24]. Готовая последовательность сравнивалась в BLAST с помощью пакета Blastn, используя параметры по умолчанию (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Филогенетическое древо, основанное на последовательности анализа гена 16S рРНК выделенных изолятов, было построено для изучения эволюционной взаимосвязи между описанными видами рода *Geobacillus*. Последовательности гена 16S рРНК различных видов *Geobacillus* были получены из базы данных Genbank [25, 26]. Филогенез был построен с помощью веб-сервера GGDC [27], доступному по адресу <http://ggdc.dsmz.de/>, с использованием программного конвейера филогеномики DSMZ [28], адаптированного к отдельным генам. Множественное выравнивание последовательностей было создано с помощью MUSCLE [29]. Деревья максимального правдоподобия (ML) и максимальной приближенности (MP) были выведены из сопоставления с RAxML [30] и TNT [31]. Для максимального правдоподобия (ML) использовалась быстрая начальная загрузка в сочетании с критерием начальной загрузки autoMRE [32] и последующий поиск лучшего дерева; для максимальной приближенности (MP) использовалось 1000 повторений начальной загрузки в сочетании с заменой ветвей пополам и повторным соединением дерева и десятью повторениями добавления случайных последовательностей. Последовательности были проанализированы на композиционную предвзятость с использованием теста X², реализованного в RAUP [33]. **Типовые штаммы некоторых видов** рода *Geobacillus* были включены в филогенетический анализ, где *Caldibacillus debilis* Tf (NR_029016.1) был использован в качестве внешней группы.

Последовательности гена 16S рРНК, описанные в этом исследовании, были депонированы в GenBank под регистрационными номерами (Accession numbers) OQ296045-OQ296049.

Результаты и обсуждение

Из пробы, собранной в геотермальном источнике Жаркент, было выделено пять различных бактериальных изолятов. Им были присвоены следующие коды: 1AkW1, 1AkW2, 1AkW4, 1AkW5, 1AkW8. Для данных изолятов был выполнен ряд различных идентификационных тестов, такие как анализ на спорообразование; исследование морфологии; определение подвижности; способность к аэробному росту; тест

на каталазную и оксидазную активность; способность использования сахаров (API 50CHE); энзиматическая активность (API Zym) и продукцию H_2S . Морфологически колонии изолятов незначительно различались по форме, цвету, текстуре и консистенции. Через 18 часов инкубации, исследуемые изоляты образовывали округлые выпуклые колонии бело-кремового цвета с волнистым краем. Клетки всех изолятов были неподвижными, грамположительными, палочковидными, спорообразующими и облигатными аэробами. Морфологические характеристики некоторых изолятов исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа. Полученные изображения изолятов представлены на рисунке 1.

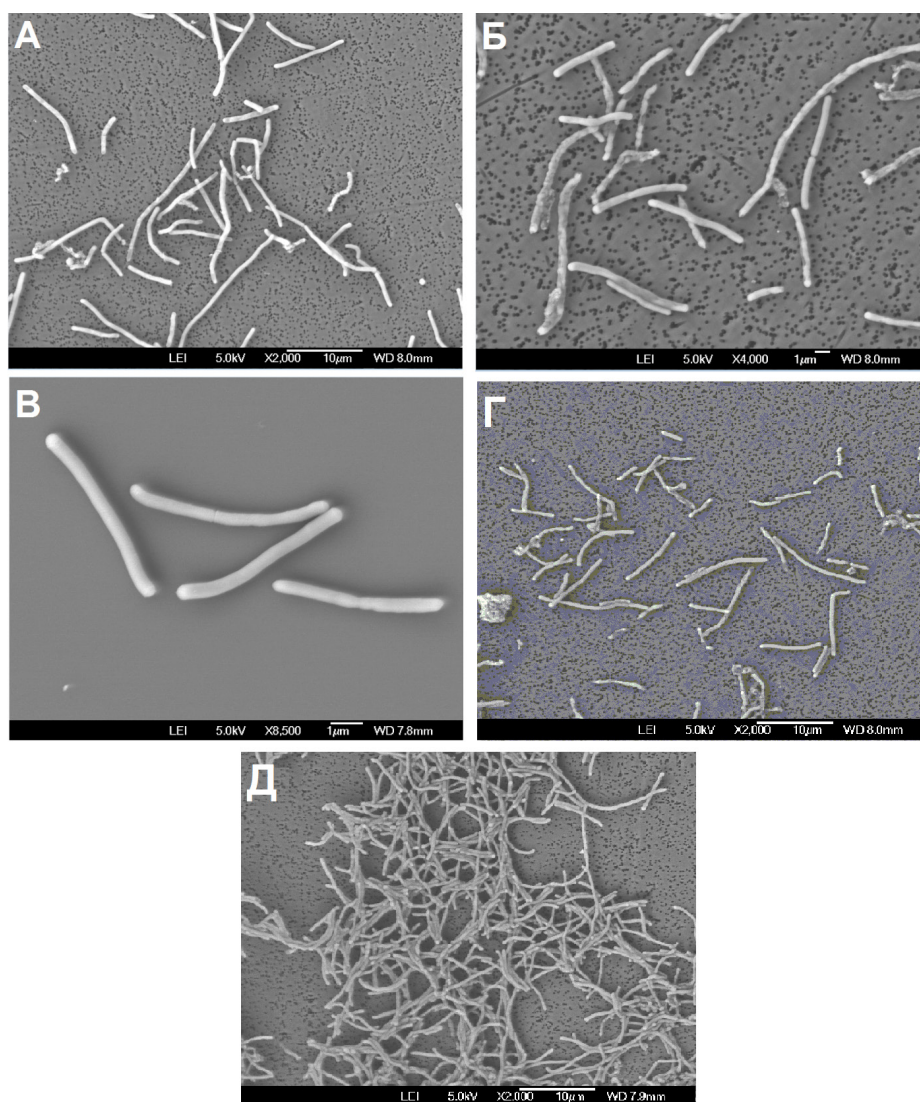


Рисунок 1 – Электронные фотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа; А. 1AkW1, Б. 1AkW8, В. 1AkW2, Г. 1AkW4, Д. 1AkW5 (при увеличениях от 2,000X до 8,500X)

Морфология этих изолятов типична для бактерий, принадлежащих к группе *Geobacillus*. Было обнаружено, что бактериальные изоляты (1AkW1, 1AkW2, 1AkW4, 1AkW5 и 1AkW8) имеют палочковидную форму. Размеры клеток варьировались от 2,4 до 8 мкм в длину и от 0,4 до 0,9 мкм в ширину.

4 до 0,9 мкм в ширину.

Полученные изоляты были способны к росту на питательных средах при pH 5-11 и при температурах от 45 до 83°C и при оптимальных условиях при значении pH 6-8 и температуре от 65 и до 75°C, соответственно. Для изолятов 1AkW2, 1AkW4 и 1AkW5 оптимальная температура роста составила 65°C, а максимальная и минимальная температуры составили 80°C и 45°C. Для изолята 1AkW1 оптимальная температура роста составила 70°C, а максимальная и минимальная температуры составили 75°C и 45°C. Самая высокая оптимальная температура роста наблюдалась у изолята 1AW8, 75°C, а максимальная и минимальная температуры 83°C и 45°C. При сравнении диапазона температуры для роста выделенных изолятов с наиболее близкородствен-

ными видами было определено, что изоляты в данном исследовании имеют более высокую температуру роста и более широкий диапазон значений pH (таблица 1).

Все выделенные бактериальные изоляты не продуцировали H₂S, но образовывали каталазу. Профили, полученные на стрипах API 50 CH для пяти штаммов, показали фенотипическое разнообразие, и ни один из восьми изолятов не обладал одинаковыми фенотипическими особенностями (таблица 1). Использование сахаров варьировало: изолят 1AW5 был способен использовать N-ацетилглюкозамин и амигдалин, а изолят 1AkW4 D-тагатозу, в то время как 1AkW8 рамнозу. Все изоляты образовывали кислоту из глюкозы, фруктозы и мальтозы, но ни один из пяти выделенных изолятов не был способен использовать эритритол, D-арабинозу, L-ксилозу, адонитол, метил-D-ксилопиранозид, L-сарбозу, дульцитол, D-сорбитол, Метил-D-маннопиранозид, арбутин, салицин, D-лактозу, инулин, ксилит, гентиобиозу, D-ликсозу, D-фукозу, L-фукозу, D-арабитол, L-арабитол, глюконат, 2-кетоглюконат и 5-кетоглюконат.

Таблица 1 – Характеристики, отличающие выделенные изоляты из Казахстана от близкородственных видов рода *Geobacillus*

Характерная особенность	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Подвижность	-	-	-	-	-	+	+	НД	+
Длина клеток	2-3,6	1,7-2,9	2-3,9	2-2,9	2-4,7	НД	2-3,5	≤0,9	3,5
Ширина клеток	0,5-1	0,6-1	0,5-1,2	0,6-0,9	0,7-1,4	НД	0,6-1	≤3	1,5
Оксидазная активность	±	-	-	±	±	+	-	+	+
Продукция H ₂ S	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
Споры									
Цилиндрический	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Субтерминальный	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Терминальный	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Центральный / парацентральный	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Диапазон температуры для роста (°C)	45-80	45-80	45-80	45-80	45-83	55-70	30-70	37-68	37-70
Оптимальная температура для роста (°C)	70	65	65	65	75	55-60	40-60	55	60
Диапазон pH для роста	5.0-11	5.0-11	5.0-11	5.0-11	5.0-11	6.0-8.0	6.0-9.0	6.0-8.0	5.0-9.0
API 50 CH									
Глицерин	+	-	+	+	-	НД	±	-	+
Эритритол	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
D-арабиноза	-	-	-	-	-	+	НД	НД	НД
L-арабиноза	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Продолжение таблицы

Характерная особенность	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Рибоза	+	±	+	+	-	НД	-	-	+
D-ксилоза	+	-	-	+	+	+	-	+	В
L-ксилоза	-	-	-	-	-	+	НД	НД	НД
Адонит	-	-	-	-	-	НД	В	+	-
Метил-D-ксилопиранозид	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
Галактоза	+	+	+	+	-	+	±	V	V
D-манноза	+	±	+	-	+	+	+	+	+
L-сорбоза	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
Рамноза	-	-	-	-	+	НД	-	-	-
Дульцит	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
Инозитол	+	+	-	-	-	НД	-	+	V
D-маннитол	+	-	-	+	+	+	-	+	V
D-сорбитол	-	-	-	-	-	НД	-	-	-
Метил-D-маннопиранозид	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
Метил-D-глюкопиранозид	+	+	+	+	+	НД	+	НД	V
N-ацетилглюкозамин	-	-	-	±	-	НД	-	НД	V
Амигдалин	-	-	-	+	-	НД	-	НД	-
Арбутин	-	-	-	-	-	НД	-	НД	-
Эскулин	+	+	+	+	+	НД	±	-	+
Салицин	-	-	-	-	-	НД	-	НД	±
D-целлобиоза	-	-	+	+	+	+	-	+	V
D-лактоза	-	-	-	-	-	НД	±	-	В (±)
D-мелибиоза	+	+	+	+	±	НД	+	НД	V
D-трегалоза	+	+	+	+	+	НД	+	+	V
Инулин	-	-	-	-	-	НД	0	0	0
D-мелецитоза	+	+	+	+	+	НД	0	0	0
D-рафиноза	+	+	+	+	+	НД	+	НД	V
Крахмал	+	+	+	+	±	+	+	+	+
Гликоген	-	-	+	+	±	НД	+	НД	V
Ксилит	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
Генциобиоза	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
D-гураноза	+	-	+	+	+	НД	+	НД	-
D-Ликсоза	-	-	-	-	-	НД	НД	НД	НД
D-Тагатоza	-	-	±	-	-	НД	НД	НД	НД

Примечание: Виды: 1, изолят 1AkW1; 2, изолят 1AkW2; 3, изолят 1AkW4; 4, изолят 1AkW5; 5, изолят 1AkW8; 6, *G. Lituanicus*; 7, *G. stearothermophilus*; 8, *G. kaustophilus*; 9, *G. thermoleovorans*. Данные для 6 были взяты из Kuisiene и др. [34]; для 7–9 были взяты из Coorevits и др. [35]; данные для 1–5 были получены в ходе настоящего исследования. +, положительный; ±, слабopоложительный; -, отрицательный; В, результат варьируется в пределах штаммов; НД, нет доступных данных. Все штаммы были отрицательными на продукцию индола, D-фукоза, L-фукоза, D-арабитол, L-арабитол, Глюконат, 2-кетоглюконат, 5-кетоглюконат. Все штаммы были положительными на каталазу и продукцию кислоты из глюкозы, фруктозы, D-сахароза, и мальтозы.

В ходе экспериментов выяснилось, что в результате скрининга ферментативной активности все изоляты были способны продуцировать вне-

клеточные гидролитические ферменты, такие как протеаза, целлюлаза, амилаза, и липаза (таблица 2).

Таблица 2 – Продукция гидролаз изолятами при разных температурах

Изоляты	Ферментная активность*																			
	Протеаза					Целлюлаза					Амилаза					Липаза				
	45°	55°	65°	75°	80°С	45°	55°	65°	75°	80°С	45°	55°	65°	75°	80°С	45°	55°	65°	75°	80°С
1AkW1	O	O	O	O	O	L	M	H	L	O	L	M	H	O	O	O	O	O	O	O
1AkW2	L	M	H	L	O	L	M	H	L	O	L	M	H	O	O	O	O	O	O	O
1AkW4	L	M	H	L	O	L	M	M	O	O	L	M	H	L	O	L	M	H	O	O
1AkW5	L	M	H	O	O	L	M	H	O	O	M	H	H	O	O	L	M	M	L	O
1AkW8	L	L	H	H	L	L	M	H	H	L	L	L	M	H	L	L	M	H	H	O

* Активность фермента выражается диаметром прозрачной зоны (в случае протеазы, амилазы и целлюлозы) и осадением (в случае липазы) вокруг колоний (<5 мм; L(low)) (5-10 мм; M (medium)) (>10 мм; H (high)) (отсутствует; O(zero))

Все пять изолятов были способны продуцировать амилазу и целлюлазу, четыре из них продуцировали протеазу, три продуцировали липазу. Кроме того, три изолята (1AkW4, 1AkW5, 1AkW8) продуцировали комбинацию из четырёх внеклеточных гидролитических ферментов, изолят 1AkW2 продуцировал 3 (протеаза, целлюлаза, и амилаза) внеклеточных фермента и изолят 1AkW1 продуцировал 2 (протеаза, и амилаза)

внеклеточных фермента. Оптимальная температура для активности ферментов была в диапазоне температур между 65 и 70°С, минимальная – 45°С, максимальная – 75°С. Оптимальное значение pH для работы ферментов находилось в диапазоне от 6,5 до 8.

Результаты оценки энзиматической активности с помощью полосок (strips) API ZYM приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Ферментативная активность выделенных изолятов на полосках API ZYM

Изоляты	Название обнаруженного фермента*																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1AkW1	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	3	3	0	0	0
1AkW2	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	4	4	4	0	0	4	2	0	2	0
1AkW4	0	4	4	4	4	4	4	4	2	4	4	4	4	1	0	4	2	0	0	0
1AkW5	0	4	4	4	4	4	2	2	1	4	4	4	4	0	0	4	1	0	0	0
1AkW8	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0

Примечание: *1, Отрицательный контроль; 2, щелочная фосфатаза; 3, эстераза (C4); 4, эстераза липаза (C8); 5, липаза (C14); 6, leucine arylamidase; 7, валинариламидаза; 8, цистинариламидаза; 9, трипсин; 10, α-химотрипсин; 11, кислая фосфатаза; 12, нафтол-AS-BI-фосфогидролаза; 13, α-галактозидаза; 14, β-галактозидаза; 15, β-глюкуронидаза; 16, α-глюкозидаза; 17, β-глюкозидаза; 18, N-ацетил-β-глюкозаминидаза; 19, α-маннозидаза; 20. α-фукозидаза.

Бактериальные изоляты культивировали в течение 15 ч при 65-75°С на питательном агаре. Тест-полоски инкубировали при 65 ° С в течение 8 часов, после считывали результаты. Степень продукции фермента оценивали качественно по шкале от 0 до 4,0 где 0 указывает на отсутствие продукции фермента, а 4 указывает на высокую продукцию фермента.

Все изоляты, протестированные с помощью API ZYM, оказались положительными по следующим ферментам: Щелочная фосфатаза, Эстераза (С 4), Эстераза липаза (С 8), Кислая фосфатаза, Нафтол-АС-БИ-фосфогидролаза, α -галактозидаза и α -глюкозидаза и отрицательны по β -галактозидаза, β -глюкуронидаза, N-ацетил- β -глюкозаминидаза и α -фукозидаза. Не один из выделенных изолятов не был способен образовывать β -галактозидазу, β -глюкуронидазу, N-ацетил- β -глюкозаминидазу. Полученные с помощью стрипов API ZYM результаты еще раз доказывают высокую ферментативную активность выделенных термофильных бактерий.

Филогенетический анализ изолятов начинался с ПЦР-амплификации гена 16S рРНК с использованием программы, описанной в разделе «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ». Продукты ПЦР проверялись с помощью электрофореза в 1,0% агарозном геле. Было проведено несколько реакций секвенирования с использованием ПЦР продуктов. Последовательности ДНК, полученные с помощью каждого праймера,

были объединены, и была получена последовательность, соответствующая почти полному гену 16S рРНК. Эта последовательность сравнивалась в BLAST (NCBI). После чего изолят 1AkW1 продемонстрировал родство со штаммом *Geobacillus stearothermophilus* DSM 458 (сходство 99,80%) и *Geobacillus lituanicus* N-3 (сходство 99,80%); 1AkW2 со штаммом *Geobacillus lituanicus* N-3 (сходство 99,53%); 1AkW4 со штаммом *Geobacillus stearothermophilus* B5 (сходство 99,80%); 1AkW5 со штаммом *Geobacillus kaustophilus* NBRC 102445 (сходство 99,92%) и *Geobacillus thermoleovorans* FJAT-2391. Изолят 1AkW8 продемонстрировал родство со штаммом *Geobacillus kaustophilus* NBRC 102445 (сходство 99,59%).

Филогенетическая принадлежность пяти изученных изолятов показали ближайших филогенетических соседей в банке данных генов со значением гомологии от 99,3% до 100%. Филогенетическое дерево для рода *Geobacillus*, построенное на основе последовательности гена 16S рРНК, показано на рисунке 2.

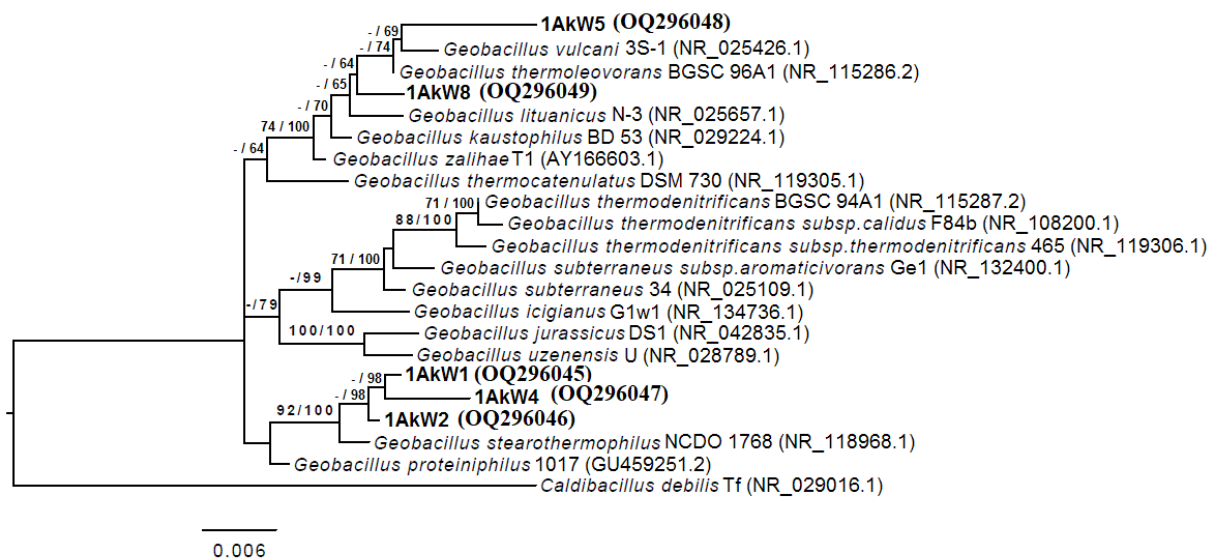


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево с выделенными изолятами и представителями рода *Geobacillus*.

Дерево максимального правдоподобия (ML), выведенное в рамках модели GTR + GAMMA и укорененное путём укоренения в средней точке. Ветви масштабируются с точки зрения ожидаемого количества замен на сайт.

Цифры над ветвями являются значениями поддержки, если они превышают 60% от начальной загрузки ML (слева) и MP (справа)

Для построения дерева необходимо была входная матрица нуклеотидов, которая включала в себя 22 операционных таксономических единицы и 1574 символа, 173 из которых были переменными, а 58 из них были экономно-ин-

формативными. Проверка базовой частоты показала отсутствие смещения композиции ($p = 1,00$, $\alpha = 0,05$). Анализ максимального правдоподобия (ML) в рамках модели GTR + GAMMA дал наивысшую логарифмическую вероятность

-3656,78, тогда как расчётный параметр альфа составлял 0,02 единиц. Начальная загрузка ML не сходилась, поэтому было выполнено 1000 повторов; средняя поддержка составила 47,37%. Анализ максимальной экономии (MP) дал лучший результат 251 (индекс согласованности 0,74, индекс удерживания 0,71) и 2 лучших дерева. Средняя поддержка начальной загрузки MP составила 81,11%.

Таким образом, филогенетическое дерево показало, что изолят 1AW5 образует кластер с наиболее близким штаммом *G. vulcani* 3S-1 (NR_025426.1), тогда как изоляты 1AkW1, 1AkW2, 1AkW4, 1AkW8 образуют свои собственные ветви.

В настоящем исследовании для характеристики и идентификации пяти изолятов *Geobacillus spp.* особое внимание уделялось как фенотипическим, так и генотипическим признакам. Биохимические и физиологические признаки очень важны, поскольку они дают ключ к отбору более эффективных штаммов для дальнейших исследований, имеющих прикладное значение.

Основываясь на параметрах роста микроорганизмов и биохимических характеристиках, таких как устойчивость к высокой температуре, низкая потребность в питательных веществах, наличие спор и данные филогенетического анализа, было установлено, что все 5 изолятов оказались близкими представителями рода *Geobacillus*. Полученные данные согласуются с результатами ряда работ по изучению состава микрофлоры термальных источников [9, 34-38].

Одна из интересных особенностей, наблюдаемых с точки зрения физиологических особенностей, заключалась в том, что во время культивирования большинство выделенных изолятов могли расти при более высоких значениях температур (до 85°C) и в широком диапазоне pH (pH 5-10) по сравнению с ранее известными представителями рода *Geobacillus* [9, 34, 35, 38]. Поскольку известные виды *Geobacillus* демонстрируют низкие значения идентичности

на основе последовательности гена 16S рРНК [39], существует вероятность того, что некоторые штаммы (1AkW1, 1AkW2, 1AkW4, 1AkW5 и 1AkW8) из этого исследования представляют новые виды. Однако для определения этого потребуется ДНК-ДНК гибридизация и другие дополнительные анализы. Положительные результаты в отношении активности гидролитических ферментов указывают на потенциальное применение этих изолятов в промышленной биотехнологии.

Заключение

Таким образом, в результате проделанной работы было выделено 5 различных по своим характеристикам изолятов, продуцирующих термостабильные целлюлазы, протеазы, липазы и амилазы. Разнообразие условий роста изолятов позволяет надеяться, что их гидролитические ферменты будут обладать устойчивостью в широком диапазоне значений pH и термостабильностью. Это в свою очередь делает их потенциальными кандидатами для использования в пищевой [40], в производстве моющих средств [41] и целлюлозно-бумажной промышленности [42].

Настоящее исследование вносит новый и важный вклад в документирование микробного разнообразия экстремофилов в Казахстане. Более того, полученные данные позволяют утверждать, что термальный источник Жаркента содержит уникальное сообщество термофильных микроорганизмов.

Благодарность, конфликт интересов

Это исследование финансируется Комитетом науки Министерства высшего образования и науки Республики Казахстан (№ гранта AP14871683 «Биотехнология переработки кератиновых побочных продуктов с помощью иммобилизованных термофильных бактерий»). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Raddadi Noura, Cherif Ameer, Daffonchio Daniele, et al. "Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Issue no. 19 (October 2015): 7907-13. DOI: 10.1007/s00253-015-6874-9
2. DeCastro M.E., Rodriguez-Belmonte E., Gonzalez-Siso M.I. "Metagenomics of Thermophiles with a Focus on Discovery of Novel Thermozyms." *Front Microbiol.*, Issue no. 7 (September 2016): 1521. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01521
3. Suzuki Hirokazu. "Peculiarities and biotechnological potential of environmental adaptation by *Geobacillus* species." *Appl Microbiol Biotechnol*, Issue no. 102 (December 2018): 10425-37. DOI: 10.1007/s00253-018-9422-6

4. Goh K.M., Kahar U.M., Chai Y.Y., et al. "Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*." *Appl Microbiol Biotechnol.*, Issue no. 97 (February 2013): 1475-88. DOI: 10.1007/s00253-012-4663-2
5. Zhu W., Cha D., Cheng G., et al. "Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTc 1049." *Enzyme Microb. Technol.*, Issue no. 6 (May 2007): 1592-7. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.11.007
6. Iqbal I., Aftab M.N., Afzal M., et al. "Purification and characterization of cloned alkaline protease gene of *Geobacillus stearothermophilus*." *J Basic Microbiol.*, Issue no. 2 (September 2015): 160-71. DOI: 10.1002/jobm.201400190
7. Balan A., Ibrahim D., Abdul Rahim R., Ahmad Rashid F.A. "Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra." *Enzyme Res.*, (November 2012): 1-7. DOI: 10.1155/2012/987523
8. Zhu Y., Li H., Ni H., et al. "Molecular cloning and characterization of a thermostable lipase from deep-sea thermophile *Geobacillus* sp. EPT9." *World J Microbiol Biotechnol.*, Issue no. 2 (February 2015): 295-306. DOI: 10.1007/s11274-014-1775-0
9. Nazina T., Tourova T., Poltarau A., et al. "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th*", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Issue no. 2 (March 2001): 433-46. DOI: 10.1099/00207713-51-2-433
10. Zeigler D.R. "The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?" *Microbiology*, Issue no. 1 (January 2014): 1-11. DOI: 10.1099/mic.0.071696-0
11. Coolbear T., Daniel R., Morgan H. *The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells*. Verlag, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992, 57-98.
12. Gupta G., Srivastava S., Khare S., Prakash V. "Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment." *Int. j. environ. agric. biotech.*, Issue no. 2 (June 2014): 371-80. DOI: 10.5958/2230-732X.2014.00258.7
13. Busk P.K., Lange L. "Cellulolytic potential of thermophilic species from four fungal orders." *AMB Express.*, Issue no. 1 (August 2013): 47. DOI: 10.1186/2191-0855-3-47
14. López-López O., Cerdán M.E., González-Siso M.I. "Hot spring metagenomics. *Life*." Issue no. 2 (February 2013): 308-20. DOI: 10.3390/life3020308
15. Mashzhan A., Javier-López R, Kistaubayeva A, Savitskaya I, Birkeland N-K. "Metagenomics and Culture-Based Diversity Analysis of the Bacterial Community in the Zharkent Geothermal Spring in Kazakhstan". *Current Microb.* Issue no. 8 (August 2021). DOI: 10.1007/s00284-021-02545-2
16. Wehr H.M., Frank JF. *Standard methods for the examination of dairy products. 17thedn*. Washington, DC, USA: American Public Health Association, 2004, 36-57
17. Kovacs N. "Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction." *Nature*, Issue no. 4535 (September 1956): 703. DOI: 10.1038/178703a0
18. Shaikh N.M., Patel A., Mehta S., Patel N. "Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria Inhabiting Different Environment and Optimization of Cellulase Production." *Univers. J. Environ. Res. Technol.*, Issue no. 1 (2013): 39-49.
19. Shokatayeva D., Ignatova L., Savitskaya I., et al. "Bacterial Cellulose and Pullulan from Simple and Low Cost Production Media." *Eurasian Chem.-Technol. J.*, Issue no. 3 (February 2019): 247-58. DOI: 10.18321/ectj866
20. Cowan D.A. *Industrial enzymes. Biotechnology, the Science and the Business*. London, UK: CRC Press, 1991, 311-40.
21. Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., et al. "A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine." *Curr. Microbiol.*, Issue no. 5 (September 2008): 503-7. DOI: 10.1007/s00284-008-9276-8
22. Woese CR., Gutell R., Gupta R., Noller H.F. "Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids." *Microbiol Rev.*, Issue no. 4 (December 1983): 621-69
23. Kumar S., Stecher G., Li M., et al. "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms." *Mol Biol Evol.*, Issue no. 6 (June 2018): 1547-9. DOI: 10.1093/molbev/msy096
24. Rice P., Longden I., Bleasby A. "EMBOSS: The European molecular biology open software suite." *Trends Genet.*, Issue no. 6 (Jun 2000): 276-7. doi: 10.1016/s0168-9525(00)02024-2
25. Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., et al. "GenBank." *Nucleic Acids Res.*, 33(Database issue) (January 2005): D34-D38. DOI: 10.1093/nar/gki063
26. Tatusova T. "Update on Genomic Databases and Resources at the National Center for Biotechnology Information. In: Carugo O., Eisenhaber F. (eds) *Data Mining Techniques for the Life Sciences. Methods in Molecular Biology*. New York, USA: Humana Press, 2016, 3-30.
27. Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., Goker M. "Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions." *BMC Bioinf.*, Issue no. 60 (February 2013). DOI: 10.1186/1471-2105-14-60
28. Meier-Kolthoff J.P., Hahnke R.L., Petersen J., et al. "Complete genome sequence of DSM 30083(T), the type strain (U5/41(T)) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy." *Stand. Genomic Sci.*, Issue no. 2 (December 2014). DOI: 10.1186/1944-3277-9-2
29. Edgar Robert, "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." *Nucleic Acids Res.*, Issue no. 5 (March 2004): 1792-7. DOI: 10.1093/nar/gkh340
30. Stamatakis Alexandros, "RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies." *Bioinformatics*, Issue no. 9 (May 2014): 1312-3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu033
31. Goloboff P.A., Farris J.S., Nixon K.C., "TNT, a free program for phylogenetic analysis." *Cladistics.*, Issue no. 5 (Jul 2008): 774-86. DOI: 10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x

32. Pattengale N.D., Alipour M., Bininda-Emonds O.R.P. et al., "How Many Bootstrap Replicates Are Necessary?" *J. Comput. Biol.*, Issue no. 3 (April 2010): 337-54. DOI: 10.1089/cmb.2009.0179
33. Swofford D., "PAUP*: *Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*, version 4.0 b10. Sunderland, UK: Sinauer Associates, 2002, 49-56.
34. Kuisiene N., Raugalas J., Chitavichius D. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, Issue no 6 (November 2004): 1991-5. DOI: 10.1099/ijs.0.02976-0
35. Coorevits A., Dinsdale A.E., Halket G., et al. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucoasidans'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, Issue no 7 (July 2012): 1470-85. DOI: 10.1099/ijs.0.030346-0
36. Adiguzel A., Ozkan H., Baris O., et al. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J. Microbiol. Methods.*, Issue no 3 (December 2009): 321-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.09.026
37. Verma A., Gupta M., Shirkot P. Isolation and characterization of thermophilic bacteria in natural hot water springs of Himachal Pradesh (India). *Bioscan.*, Issue no 3 (July 2014): 947-52.
38. Schleifer K.-H. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, USA: Springer, 2009, 19-1317.
39. Zeigler D.R. Application of a recN sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Issue no 55 (May 2005): 1171-9. DOI: 10.1099/ijs.0.63452-0
40. Novik G., Savich V., Meerovskaya O. *Geobacillus Bacteria: potential commercial applications in industry, bioremediation, and bioenergy production*, in: Mishra, M. (Eds.), *Growing and Handling of Bacterial Cultures*. London, UK: IntechOpen, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.76053
41. Naganthran A., Masomian M., Rahman R.N., Ali M., Nooh H. "Improving the Efficiency of New Automatic Dishwashing Detergent Formulation by Addition of Thermostable Lipase, Protease and Amylase." *Molecules.*, Issue no. 9 (September 2017): DOI:10.3390/molecules22091577
42. Yang S., Potprommanee L., Wang X-Q. et al. "Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass." *Plos One.*, Issue no. 4 (April 2017). doi: 10.1371/journal.pone.0175004