

УДК 550.72:579.22

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ
ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТЕРМАЛЬНЫХ ВОД И МИКРОБНЫХ
МАТОВ МЕСТОРОЖДЕНИЯ КУЛЬДУР**¹Лебедева Е.Г., ²Харитоновна Н.А.¹ФГБУ «Дальневосточный геологический институт» ДВО РАН, Владивосток, e-mail: microbiol@mail.ru;²ФГБОУ ВБ «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

Изучен химический состав термальных вод месторождения Кульдур. Показано, что термальные воды различных скважин отличались высокой температурой, низкой минерализацией, щелочными условиями и преобладанием в составе вод натрия, кремния, хлора, фтора, лития, мышьяка и стронция. Из воды и бактериальных матов выделены чистые культуры гетеротрофных микроорганизмов и изучены их некоторые физиолого-биохимические свойства и потенциальная внеклеточная ферментативная активность. Показано, что штаммы были представлены палочками различной длины, а также кокками, спирохетами и вибрионами. Среди выделенных штаммов в основном преобладали грамотрицательные, неподвижные, каталазоположительные, аспорогенные палочки. Выделенные гетеротрофные бактерии больше всего обладали ферментативным типом метаболизма. По типу питания большинство штаммов относились к хемоорганотрофам. Исследуемые штаммы были способны утилизировать достаточно широкий спектр сахаров и спиртов: глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, галактозу, маннозу, раффинозу, а также маннит и сорбит. Выделенные культуры были способны к росту в широком диапазоне pH (5,0–13,0) и температуры (до 60 °С). Большинство штаммов гетеротрофных микроорганизмов проявляли высокую потенциальную амилитическую, протеолитическую, липолитическую и более низкую лецитиназную ферментативную активность. Заметное влияние на потенциальную ферментативную активность изолированных штаммов оказывала температура культивирования: активность была выше при температуре инкубации 50 °С. Штамм грамотрицательных бактерий № 1 отличался наибольшей множественной ферментативной активностью и был способен утилизировать многие сахара, спирты и обладал, по сравнению с другими гетеротрофными бактериями, достаточно широким диапазоном роста. Выделенные культуры микроорганизмов являются перспективными для использования в области биотехнологии.

Ключевые слова: гетеротрофные бактерии, термальные воды, Кульдур, ферментативная активность, штаммы, физиолого-биохимические свойства, чистые культуры

**PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL PROPERTIES AND POTENTIAL ENZYMATIC
ACTIVITY OF HETEROTROPHIC BACTERIA, ISOLATED FROM THERMAL
WATERS AND MICROBIAL MATS OF THE KULDUR DEPOSIT**¹Lebedeva E.G., ²Kharitonova N.A.¹Far East geological Institute, FEB RAS, Vladivostok, e-mail: microbiol@mail.ru;²Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow

The chemical composition of the thermal waters of the Kuldur deposit was studied. It was shown that the thermal waters of various wells were characterized by high temperature, low salinity, alkaline conditions and the predominance of sodium, silicon, chlorine, fluorine, lithium, arsenic and strontium in the composition of the water. Pure cultures of heterotrophic microorganisms were isolated from water and bacterial mats and some of their physiological and biochemical properties and potential extracellular enzymatic activity were studied. It was shown that the strains were represented by rods of various lengths, as well as cocci, spirochetes and vibrios. Among the isolated strains, mainly gram-negative, motionless, catalase-positive, and asporogenic bacilli predominated. Isolated heterotrophic bacteria most of all possessed an enzymatic type of metabolism. By type of nutrition, most strains belonged to chemorganotrophs. The studied strains were able to utilize a fairly wide range of sugars and alcohols: glucose, fructose, maltose, lactose, galactose, mannose, raffinose, as well as mannitol and sorbitol. The isolated cultures were capable of growth over a wide range of pH 5.0–13.0 and temperature (up to 60 °C). Most strains of heterotrophic microorganisms showed a high potential amylolytic, proteolytic, lipolytic and lower lecithinase enzymatic activity. The cultivation temperature had a noticeable effect on the potential enzymatic activity of isolated strains: the activity was higher at an incubation temperature of 50 °C. wide range of growth. Highlighted cultures of microorganisms are promising for use in the field of biotechnology.

Keywords: heterotrophic bacteria, thermal waters, Kuldur, enzymatic activity, strains, physiological and biochemical properties, pure cultures

Кульдурское месторождение термальных вод располагается во внутриконтинентальной части юга Дальнего Востока, в районе поселка Кульдур Еврейской автономной области. Кульдурские источники выходят в центральной части Пионерского

гранитного массива и приурочены к зоне меридионального разлома на участке пересечения с оперяющим его нарушением северо-восточного направления. Вмещающими породами являются палеозойские граниты и гранодиориты. Воды Кульдур-

ского термального поля щелочные фторидно-хлоридно-кремниевые-гидрокарбонатные натриевые, слабоминерализованные. Температура воды достигает 73 °С. Содержание общего углерода органического имеет невысокие значения и колеблется в пределах 0,3–3,7 мг/дм³ [1].

Известно, что термальные источники являются естественной средой обитания различных микроорганизмов. Водное микробное сообщество и бактериальные маты, образующиеся в местах выхода термальных вод, являются уникальным объектом исследований, поскольку они вовлечены в большое разнообразие трансформаций элементов, многие из этих трансформаций являются ключевыми стадиями геохимических процессов, происходящих в гидротермальных экосистемах. Гетеротрофные бактерии являются важным компонентом термальных вод и микробных матов, поскольку осуществляют деструкцию органических веществ и могут обладать уникальными свойствами и являться потенциальными продуцентами термостабильных ферментов [2, 3]. Изучение термофильных гетеротрофных бактерий, их потенциальной ферментативной активности и физиолого-биохимических особенностей представляет большой практический интерес, так как бактерии и продуцируемые ими ферменты могут найти широкое применение в промышленности, в том числе пищевой, фармацевтической, текстильной и других областях. Ранее было показано, что термальные воды Кульдур населены различной микрофлорой, но в небольшой численности [4]. Однако отсутствуют данные о потенциальной внеклеточной ферментативной активности бактерий, выделенных из Кульдурских терм, и их физиолого-биохимических свойствах.

Цель исследования: исследовать химический состав вод месторождения Кульдур, выделить гетеротрофные бактерии и изучить их некоторые физиолого-биохимические свойства и потенциальную внеклеточную ферментативную активность.

Материалы и методы исследования

Пробы воды отбирали в стеклянные бутылки объемом 1000 мл в трех повторностях, соблюдая условия стерильности, из скважин 1-87, 2-87, 3-87, 3-51, 5-51 термальных вод месторождения Кульдур. Отбор проб осуществляли в августе 2015 г. Также проводили отбор микробных матов, формирующихся на выходах термальных источников.

Всего было отобрано 2 типа микробных матов. Отобранные пробы хранили в холодильнике не более 12 ч, затем анализировали в лаборатории. Химический анализ термальных вод осуществляли в аккредитованной лаборатории Дальневосточного геологического института ДВО РАН г. Владивосток. Для выделения и культивирования бактерий использовали традиционные методы практической микробиологии [5]. Для выделения термофильных микроорганизмов использовали питательные среды с различными донорами и акцепторами электронов [6]. Гетеротрофные бактерии учитывали на питательной среде УК следующего состава (г/л): CaCO₃ – 1; MgSO₄*7H₂O – 1; пептон – 5; дрожжевой экстракт – 5; глюкоза – 0,2; K₂HPO₄ – 0,2 [7]. Выделение микроорганизмов из подземных вод производили методом мембранной фильтрации. Микроорганизмы выращивали в термостате при температурах 25 °С и 50 °С в течение 1–7 суток. Тип клеточной стенки бактерий определяли по методу Грама. Морфологию, размеры, подвижность, спорообразование выделенных чистых культур исследовали с использованием светового микроскопа AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия) [8]. Способность штаммов к росту при различных температурах и значениях pH питательной среды исследовали при инкубировании в среде УК. Диапазон pH устанавливали с разными концентрациями бикарбоната и карбоната натрия (от 5,0 до 13,0). Для изучения способности бактерий утилизировать моно- и дисахариды, спирты использовали готовые среды Гисса «Биокомпас-С» (Углич, Россия). Тестирование выделенных изолятов на наличие внеклеточных ферментов каталазы, протеазы, амилазы, липазы, лецитиназы проводили согласно [8]. Культивирование микроорганизмов проводили в термостате при температурах 25 °С и 50 °С в течение 2–3 суток. О наличии энзиматической активности судили по появлению зон гидролиза субстрата вокруг посева бактерий на соответствующих средах.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования химического состава термальных вод показали, что среди катионов в изученных скважинах значительно преобладали натрий (89,0–94,3 мг/л) и кремний (43,3–52,3 мг/л), при этом почти отсутствовал магний (0,0–0,03 мг/л). Среди анионов доминировали хлор (31,5–34,9 мг/л), фтор (17,7–18,9 мг/л) и суль-

фат-ионы (15,9–18,5 мг/л). В микроэлементном составе изученных вод наиболее преобладали литий (351,8–369,7 мкг/л), мышьяк (79,2–113,1 мкг/л) и стронций (65,3–83,3 мкг/л) (табл. 1). Отличительной чертой термальных вод этих скважин является высокая температура (до 72 °С), низкая минерализация 0,30–0,36 г/л и щелочная реакция (рН = 9,4–9,7). Как растворенные, так и спонтанные газы исследуемых терм представлены в основном азотом (до 98 об.%), примеси других газов (CO₂, H₂S, O₂), как правило, незначительны.

Из термальных вод и бактериальных матов месторождения Кульдур на различных селективных средах были выделены чистые культуры мезофильных и термофильных гетеротрофных бактерий. Всего было изолировано 35 чистых культур (12 штаммов из подземных вод, 23 штамма из микробных матов). Среди изолированных из подземных вод гетеротрофных микроорганизмов преобладали плоские, матовые и глянцево-светло-бежевые колонии с неровным краем, а также пигментированные светло-желтые и оранжевые выпуклые блестящие колонии (рисунок, а–в). Морфологическое разнообразие выделенных из бактериальных матов колоний было выше, здесь отмечены в основном колонии лишенные пигмента: различных оттенков бежевые, плоские и выпуклые, а также прозрачные, выпуклые и молочного цвета колонии (рисунок, г–е). По количеству выделенных бактерий значительно преобладали в подземных водах всех изученных скважин и микробных матах крупные грамположительные неподвижные спорообразующие каталазоположительные палочки размером 2,21–5,45 мкм в длину. Подобные крупные грамположительные палочки были выявлены нами ранее в подземных рассолах и техногенных водах хвостохранилищ Приморского края [9, 10]. Остальные изоляты были представлены палочками различной длины, а также кокками, спирохетами и вибрионами.

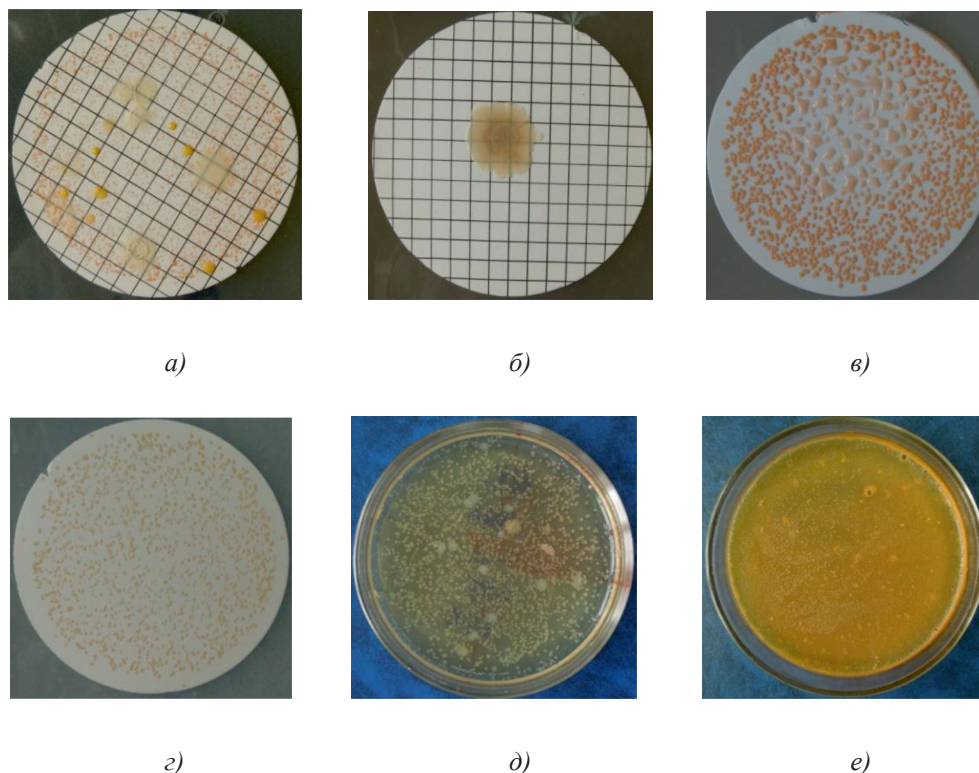
Исследование некоторых морфо-биохимических особенностей чистых культур гетеротрофных бактерий показало, что штаммы в основном были грамотрицательными (60%), преимущественно неподвижными (70%), аспорогенными (70%), каталазоположительными (80%) и оксидазоотрицательными (90%) палочками с различным отношением к кислороду (табл. 2). Выделенные гетеротрофные бактерии больше всего были способны ферментировать глюкозу (65%), т.е. обладали ферментативным типом метаболизма. По типу питания большинство штаммов относились к хемоорганотрофам. Исследование физиологических характеристик штаммов показало, что в целом культуры обладали способностью к росту в широком диапазоне рН 5,0–13,0 и температуры (до 60 °С) (табл. 3). Выявленные особенности роста данных микроорганизмов могут свидетельствовать об их приспособленности к высоким температурам и щелочным условиям среды. Культуры бактерий использовали широкий спектр субстратов. Все штаммы обладали способностью к росту на среде с комплексными субстратами, внесенными в качестве единственных источников углерода и энергии – дрожжевом экстракте и пептоне.

Исследуемые штаммы были способны утилизировать достаточно широкий спектр сахаров и спиртов: глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, галактозу, маннозу, раффинозу, а также маннит и сорбит. Слабый рост для большинства культур отмечен на рамнозе, сахарозе и ксилозе. Чрезвычайно важную роль на начальных этапах расщепления органических субстратов играют микроорганизмы, выделяющие в среду гидролитические ферменты. В связи с этим исследовали потенциальную внеклеточную ферментативную активность выделенных культур бактерий (протеолитическую, лецитиназную, липолитическую и амилолитическую). Тестирование проводили при двух температурных режимах (25 °С и 50 °С).

Таблица 1

Химический состав термальных вод месторождения Кульдур

Скважины:	Катионы/Анионы, мг/л					Микроэлементы, мкг/л			
	Na	Si	F	Cl	SO ₄	Li	As	Sr	Al
1-87	89,1	51,9	17,9	31,5	15,9	369,7	110,2	68,8	57,7
2-87	87,7	51,9	18,0	32,0	16,1	351,8	113,1	68,6	40,35
3-87	94,3	43,3	18,9	34,9	18,5	353,8	79,2	83,3	5,93
3-51	89,5	52,3	17,9	31,7	17,8	355,0	109,8	68,5	53,9
5-51	89,0	51,2	17,7	31,8	18,5	368,6	108,6	65,3	24,22



Внешний вид колоний гетеротрофных бактерий, выделенных из термальных вод (а–в) и микробных матов (г–е) месторождения Кульдур

Результаты исследования показали, что амилолитической активностью обладали наибольшее количество штаммов бактерий (80–90%), при этом оптимальной для большинства культур была температура инкубации 50 °С, где они проявляли наибольшую активность. Ширина зоны просветления амилолитической активности варьировала от 2 до 19 мм, достигая максимальных значений при более высокой температуре. Наибольшую амилазную активность проявляли как грамположительные (№ 11), так и грамотрицательные штаммы бактерий (№ 21, № 34, № 30). Протеолитической активностью обладали 40–60% от изученных штаммов, при этом она была выше при температуре инкубации 50 °С. Наиболее активно протеазы вырабатывали микробные культуры № 11, № 15 (грамположительные) и № 24 (грамотрицательные), при этом ширина зоны просветления составляла 5–16 мм. Липазную активность проявляли 20–40% от общего количества протестированных штаммов, при этом наибольшая активность отмечена при температуре 50 °С. Ширина зоны просветления достигала 0–10 мм, наибольшие значе-

ния отмечены у грамотрицательных (№ 8, № 30) и грамположительных (№ 4) культур. Наименьшую активность бактерии проявили по расщеплению лецитина (лецитиназа), суммарно только 0–10% из 35 протестированных штаммов. При этом наибольшая активность отмечена при температуре 50 °С. Штаммы гетеротрофных бактерий, выделенные из подземных вод в целом, обладали меньшей гидролитической активностью. Штаммы грамположительных бактерий № 11 и грамотрицательных микроорганизмов № 30 отличались проявлением множественной протеазной, амилазной и липазной ферментативными активностями. Штамм грамотрицательных бактерий № 1, выделенный из микробного мата, характеризовался проявлением всех видов ферментативной активности, особенно при температуре 50 °С, и был способен утилизировать многие сахара, спирты и обладал, по сравнению с другими гетеротрофными бактериями, достаточно широким диапазоном роста (рН до 13, температура до 60 °С) (табл. 3). Выделенные культуры микроорганизмов являются перспективными для использования в области биотехнологии.

Таблица 2

Морфо-биохимические характеристики некоторых выделенных из термальных вод и микробных матов Кульдур культивируемых гетеротрофных бактерий

Место выделения	Штамм, №	Внешний вид колоний	Морфология клеток	Окраска по Граму	Подвижность	Наличие спор	Каталаза/оксидаза
Подземные воды	4	Светло-бежевые плоские, матовые с неровным краем	Крупные палочки	+	–	+	+/-
	15	Светло-желтые мелкие колонии	Диплококки	+	–	–	+/-
	21	Оранжевые блестящие с ровным краем	Мелкие спирохеты	–	+	–	+/-
	24	Светло-бежевые блестящие с ровным краем	Длинные палочки	–	+	–	-/-
Микробный мат	1	Молочные, блестящие	Мелкие кокки	–	–	–	+/-
	8	Молочно-бежевые, блестящие	Мелкие палочки	–	+	–	-/-
	11	Светло-бежевые плоские, матовые с неровным краем	Крупные палочки	+	–	+	+/-
	27	Пленочный рост	Прямые длинные палочки	+	+	–	+/+
	30	Светло-бежевые, выпуклые, гладкие	Толстые длинные палочки	–	–	+	+/-
	34	Прозрачные, блестящие	Вибрионы	–	–	–	+/-

Таблица 3

Рост выделенных из воды и микробных матов Кульдур штаммов гетеротрофных бактерий при различных температурах и рН

Штамм, №	Рост бактерий													
	Температура, °С							рН						
	25	35	42	50	55	60	65	5,0	6,0	7,0	9,0	10,0	12,0	13,0
4	++	++	++	++	+	+	–	++	++	++	++	++	+	–
15	++	++	++	+	+	–	–	++	++	++	+	–	–	–
21	++	++	+	+	–	–	–	++	++	++	+	+	–	–
24	++	++	++	++	+	+	–	++	++	++	++	++	+	–
1	+	+	++	++	+	–	–	++	++	++	++	++	++	+
8	++	++	++	+	–	–	–	++	++	++	++	++	+	–
11	++	++	++	++	+	–	–	++	++	++	++	++	+	–
27	+	+	+	++	++	+	+	++	++	++	+	+	+	–
30	+	+	++	++	+	–	–	++	++	++	++	++	++	+
34	++	++	++	++	+	–	–	++	++	++	++	++	+	+

Примечание: – отсутствие роста; + – заметный рост; ++ – обильный рост.

Заключение

Изучен химический состав термальных вод из различных скважин месторождения Кульдур. Показано, что отличительной чертой этих вод является высокая температура, низкая минерализация и щелочные условия среды. Воды наиболее обогащены натрием,

кремнием, хлором, фтором, литием, мышьяком и стронцием. Из термальных вод и микробных матов выделены 35 штаммов гетеротрофных бактерий, для которых изучены физиолого-биохимические свойства и потенциальная ферментативная активность. Отмечено, что среди выделенных штаммов в основном преобладали грамо-

трицательные, неподвижные, аспорогенные, каталазоположительные палочки различной длины. Культуры были способны к росту в широком диапазоне рН и температуры, утилизировали достаточно широкий спектр сахаров и спиртов бактерий и проявляли высокую амилалитическую, протеолитическую, липолитическую и более низкую лецитиназную внеклеточные ферментативные активности.

Полученные данные позволяют утверждать, что вода и бактериальные маты термальных источников Кульдур населены уникальным сообществом гетеротрофных термофильных микроорганизмов. Несомненно, что это бактериальное сообщество играет особую роль в функционировании гидротермальной экосистемы, в том числе и в биогеохимических преобразованиях, именно за счет своей высокой потенциальной метаболической активности.

Авторы выражают благодарность ген. директору санатория «Кульдур» С.Н. Гончарову и начальнику Кульдурской гидрогеологической станции санатория А.Л. Кравченко за предоставление возможности отбора проб и помощь при проведении исследований.

Список литературы / References

1. Компаниченко В.Н., Потурай В.А. Вариации состава органического вещества в водах Кульдурского геотермального месторождения (Дальний Восток России) // Тихоокеанская геология. 2015. Т. 34. № 4. С. 96–107.
2. Radnagurueva A.A., Lavrentieva E.V., Budagaeva V.G., Barkhutova D.D., Dunaevskiy Y.E., Namsaraev B.B. Organotrophic bacteria of hot springs of the Baikal rift zone // Microbiology. 2016. T. 85. № 3. С. 347–360. DOI: 10.7868/S0026365616030125.
3. Galachyants A.D., Belkova N.L., Sukhanova E.V., Romanovskaya V.A., Gladka G.V., Bedoshvili E.D., Parfenova V.B. Разнообразие и физиолого-биохимические свойства гетеротрофных бактерий, выделенных из нейстона озера Байкал // Микробиология. 2016. Т. 85. № 5. С. 568–579. DOI: 10.7868/S0026365616050062.
4. Galachyants A.D., Belkova N.L., Sukhanova E.V., Bedoshvili E.D., Parfenova V.V., Romanovskaya V.A., Gladka G.V. Diversity and physiological and biochemical properties of heterotrophic bacteria isolated from lake Baikal neuston. Microbiology. 2016. vol. 85. no. 5. P. 604–613. DOI: 10.1134/S0026261716050064.
5. Калинина Е.Г., Харитоновна Н.А., Вах Е.А. Распространение бактерий различных эколого-трофических групп в подземных термальных водах Кульдурского месторождения (Дальний Восток России) // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=26940> (дата обращения: 08.10.2019).
6. Kalitina E.G., Kharitonova N.A., Vakh E.A. The distribution of bacteria of various ecological and trophic groups in the underground thermal waters of the Kuldurskoye deposit (Russian Far East) // Modern problems of science and education. 2017. № 5. [Electronic resource]. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=26940> (date of access: 08.10.2019) (in Russian).
7. Лысак В.В., Желдакова Р.А., Фомина О.В. Микробиология: практикум. Минск: БГУ, 2015. 115 с.
8. Lysak V.V., Zheldakova R.A., Fomina O.V. Microbiology: practical. Minsk: BGU, 2015. 115 p. (in Russian).
9. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 228 с.
10. Kuznetsov S.I., Dubinina G.A. Methods for studying aquatic microorganisms. M.: Nauka, 1989. 228 p. (in Russian).
11. Youchimizu M., Kimura T. Study of intestinal microflora of Salmonids. Fish. Pathol. 1976. vol. 10. no. 2. P. 243–245.
12. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Егорова Н.С. М.: Изд. МГУ, 1995. 224 с.
13. Guide to practical classes in microbiology / pod red. Egorova N.S. M.: Izd. MGU, 1995. 224 p. (in Russian).
14. Lebedeva E.G., Chelnokov G.A., Bragin I.V., Kharitonova N.A. Microorganisms of various ecological-trophic groups in the saline ground waters of Primorsky Region (distribution, number, participation in accumulation of microelements). E3S Web of Conferences. 2019. vol. 98. P. 02006. DOI: 10.1051/e3sconf/20199802006.
15. Kalitina E.G., Kharitonova N.A., Kuzmina T.V. Chemical and Microbiological Composition of Technogenic Waters in the Tailing Dumps of Krasnorechensk Ore-dressing Plant (Primorsky Krai, Russia). IOP Conf. series: Earth and environmental science. 2019. vol. 272. P. 032057. DOI: 10.1088/1755-1315/272/3/032057.