

ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДАЧНЫХ ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ КАМЧАТКИ (ДАЛЬНИЙ ВОСТОК, РОССИЯ)

© 2020

Лебедева Е.Г., Харитонов Н.А.

Дальневосточный геологический институт ДВО РАН (г. Владивосток, Российская Федерация)

Аннотация. В данной работе изучены некоторые эколого-биохимические характеристики (культуральные, морфологические, физиолого-биохимические свойства, экзогенная ферментативная активность, рост бактерий в различном диапазоне температур, pH, концентраций NaCl, устойчивость к тяжелым металлам) 14 штаммов термофильных бактерий, выделенных из термальных вод и микробных матов Дачных источников Камчатки. Выделенные штаммы формировали на селективных средах колонии в основном прозрачного, бежевого, бело-серого, коричневого, желтого и розового цвета. Показано, что выделенные изоляты представлены более всего аспорогенными, каталаза положительными и оксидаза положительными, подвижными, грамтрицательными палочками различных размеров. Большинство культур были способны к образованию экзоферментов, особенно амилазы и протеиназы. Штаммы росли в широких пределах температур (+35...+50°C), pH (5–8), концентрации NaCl (1–5%) и характеризовались повышенной устойчивостью к ряду тяжелых металлов. Множественную полирезистентность к металлам проявляли 4 штамма термофильных гетеротрофных бактерий. Проведена их идентификация, показано, что изоляты представлены бактериями рода *Bacillus* sp. (№ 19), *Thermus* sp. (№ 40), *Pseudomonas* sp. (№ 15), *Rhizobium* sp. (№ 125). Выделенные штаммы, обладающие высокой ферментативной активностью и повышенной устойчивостью к загрязнителям, перспективны для применения в сфере экологии для очистки загрязненных объектов окружающей среды.

Ключевые слова: термофильные бактерии; функциональные группы микроорганизмов; среда обитания; местообитания; термальные источники; Камчатка; эколого-биохимические свойства; гидролитическая активность; резистентность; термотолерантность; тяжелые металлы; устойчивость; протеаза; амилаза; липаза; штаммы; минимальная ингибирующая концентрация; Дачные горячие источники; бактериальные маты.

ECOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THERMOPHILIC BACTERIA TAKEN FROM THE DACHNIE HOT SPRINGS OF KAMCHATKA (FAR EAST, RUSSIA)

© 2020

Lebedeva E.G., Kharitonova N.A.

Far Eastern Geological Institute of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (Vladivostok, Russian Federation)

Abstract. In this work, we studied some ecological and biochemical characteristics (cultural, morphological, physiological and biochemical properties, extracellular enzymatic activity, bacterial growth in various ranges of temperatures, pH, NaCl concentrations, resistance to heavy metals) of 14 strains of thermophilic bacteria taken from thermal waters and microbial mats of Kamchatka Dachnie springs. On selective environment the strains formed mostly transparent, beige, white-gray, brown, yellow and pink colonies. It was shown that the isolates were represented most of all by asporogenic, catalase-positive and oxidase-positive, mobile, gram-negative rods of various sizes. Most of the cultures were capable of forming exozymes, especially amylases and proteinases. The strains grew in a wide range of temperatures (35–50°C), pH (5–8), NaCl concentration (1–5%) and were characterized by increased resistance to a number of heavy metals. 4 strains of thermophilic heterotrophic bacteria exhibited multiple multidrug resistance to metals. They were identified and it was shown that the isolates were represented by bacteria of the genus *Bacillus* sp. (№ 19), *Thermus* sp. (№ 40), *Pseudomonas* sp. (№ 15), *Rhizobium* sp. (№ 125). The strains with high enzymatic activity and increased resistance to pollutants are promising for use in the field of ecology for cleaning contaminated environmental objects.

Keywords: thermophilic bacteria; functional groups of microorganisms; habitat; thermal springs; Kamchatka; ecological and biochemical properties; hydrolytic activity; resistance; thermal tolerance; heavy metals; protease; amylase; lipase; strains; minimum inhibitory concentration; Dachnie hot springs; bacterial mats.

Введение

Полуостров Камчатка является одним из самых больших районов современной вулканической активности на Земле, в котором сосредоточено множество термальных полей с горячими источниками, гейзерами, грязевыми вулканами, фумаролами и другими поствулканическими проявлениями. Термальные источники являются естественной средой обитания термофильных микроорганизмов и представляют собой уникальные геотермальные местообитания, характеризующиеся высокой температурой и pH, а

иногда и повышенным содержанием токсичных и тяжелых элементов, таких как кадмий, свинец, ртуть, железо и др. [1, с. 655; 2, с. 211]. Очевидно, что микроорганизмы в этих условиях должны обладать высоким адаптационным потенциалом для реализации стратегий выживания и сохранения способности активного функционирования [3, с. 568]. Водное микробное сообщество и бактериальные маты, образующиеся в местах выхода термальных вод, играют важную роль в биогеохимических процессах в наземных гидротермах, участвуя в создании геохи-

мических барьеров. В результате деятельности различных функциональных групп микроорганизмов происходит резкое уменьшение интенсивности миграции ряда элементов и образование минералов [4, с. 95; 5, с. 675]. Исследование микроорганизмов в термальных местобитаниях позволяет не только лучше понять происхождение и эволюцию ранней жизни, но также дает возможность практического применения выделенных штаммов и их ферментов в промышленности и биотехнологии [6, с. 39; 7, с. 516]. В гидротермах Камчатки, особенно в кальдере вулкана Узон, микроорганизмы достаточно подробно исследованы ранее [8–11]. Однако изучение бактериальных сообществ в Дачных горячих источниках Камчатки ранее практически не проводилось. Ранее нами с соавторами в Дачных источниках изучено распределение, состав и численность эколого-трофических групп бактерий и оценен состав диатомовых водорослей в воде и микробных матах гидротерм [12, с. 303; 13, с. 311].

Целью настоящей работы являлось выделить термофильные бактерии из воды и микробных матов Дачных источников Камчатки и изучить их некоторые культуральные, морфологические, физиолого-биохимические свойства, внеклеточную гидролитическую активность и устойчивость к тяжелым металлам.

Материалы и методы

Пробы термальных вод и микробных матов отбирали в августе 2015 г. в Дачных горячих источниках, расположенных на полуострове Камчатка. Дачные источники – наиболее крупная группа комплекса Мутновских термальных проявлений. Дачные термы представляют собой активное фумарольное поле, горячие газы которого нагревают подземные грунтовые воды. Отбор проб осуществляли из двух термальных ручьев, характеризующихся разным уровнем pH и температуры (М-1, М-3). В точке М-1 в месте отбора проб воды и микробных матов температура и pH составляли +55°C, pH 3,05, в точке М-3 +60°C, pH 6,05 соответственно. При проведении полевых работ нестабильные показатели химического состава (pH, температура) измерялись непосредственно на месте. Пробы воды отбирали в стеклянные бутылки объемом 1000 мл в трех повторностях, соблюдая условия стерильности, образцы микробных матов отбирали в стерильные стеклянные флаконы объемом 100 мл. Отобранные пробы хранили в холодильнике не более 12 часов, затем анализировали в лаборатории.

Для выделения термофильных бактерий использовали различные селективные питательные среды [14, с. 101–260]. Гетеротрофные бактерии учитывали на питательной среде YK следующего состава (г/л): CaCO_3 – 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; пептон – 5; дрожжевой экстракт – 5; глюкоза – 0,2; K_2HPO_4 – 0,2 [15, с. 243]. Для выявления максимального разнообразия бактерий, в связи с их невысоким содержанием в термальных водах, выделение микроорганизмов производили методом мембранной фильтрации. Бактерии выращивали в термостате при температуре +35°C и +50°C в течение 1–7 суток. Морфологические свойства выделенных изолятов, их размеры, подвижность, спорообразование изучали путем микроскопирования окрашенных по методу Грама мазков с использованием светового микроскопа AxioStar plus

(Carl Zeiss, Германия) ($\times 1000$). Подвижность клеток оценивали методом висючей капли. Продукцию каталазы определяли с использованием 10% раствора перекиси водорода, выявление фермента оксидазы проводили методом Эрлиха [16, с. 120–220]. Для определения бактерий, синтезирующих экзогенные гидролазы, штаммы высевали на чашки со средой YK с добавкой в качестве субстрата оливкового масла и твин-80 (липаза), молока (протеиназа), крахмала (амилаза). Микроорганизмы культивировали в термостате при температурах +50°C в течение 2–3 суток. О наличии энзиматической активности судили по появлению зон гидролиза субстрата вокруг посева бактерий. Для выявления зон гидролиза на среде с крахмалом в чашки дополнительно вносили раствор Люголя и отмечали появление светлых колец вокруг посевов, свидетельствующих о наличии амилаз [16, с. 120–220]. Способность штаммов к росту при различных температурах, pH, концентрациях NaCl изучали при инкубировании в среде YK [16, с. 120–220]. Для этого бактерии выращивали при различных температурах (+35, +50, +60, +65°C) в термостате в течение 2–3 суток. Различные значения pH устанавливали 10% раствором соляной кислоты или 10% раствором едкого натрия. В базовую среду YK вносили различные концентрации NaCl (1, 5, 10, 15%). Результат устанавливали через 2–3 суток инкубации в термостате при +50°C.

Уровень индивидуальной устойчивости бактериальных штаммов к ионам тяжелых металлов оценивали на основе определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) соли каждого металла. МИК – это показатель действия вещества на бактериальную культуру, равный его минимальной концентрации, при которой происходит полное угнетение роста бактерий [17, с. 784; 18, с. 89]. Посев проводили в трех повторностях методом штриха на среде YK с добавлением солей металлов в возрастающих концентрациях: для CuCl_2 в диапазоне 100–1700 мг/л, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ – 100–4500, CdCl_2 – 5–1200, ZnSO_4 – 100–1700, NiSO_4 – 50–2200 и CoCl_2 – 100–1700 мг/л. Культуры инкубировали в термостате при температуре +50°C в течение 3–5 суток, после чего оценивали визуально их рост на поверхности агаризованной среды. Идентификацию микроорганизмов до рода проводили согласно определителю Берджи [19, с. 143–339], а также с использованием молекулярно-генетических методов.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения химического состава термальных источников Дачного участка, полученные ранее, показали, что исследуемые воды относятся к сульфатно-гидрокарбонатно-кальциево-натриевому типу ($\text{SO}_4\text{--HCO}_3\text{--Na--Ca}$) [20, с. 97–140]. Исследования эколого-трофических групп бактерий, проведенные нами ранее, выявили, что в термальном ручье М-1, характеризующимся температурой +55°C и низким pH 3,05, наблюдалось небольшое развитие функциональных групп бактерий, при этом в источниках доминировали тионовые ($1,5 \times 10^3$ кл/мл), денитрифицирующие ($1,0 \times 10^2$ кл/мл) и автотрофные железooksисляющие микроорганизмы ($0,6 \times 10^2$ кл/мл), в белых матах – бесцветные серобактерии ($4,0 \times 10^5$ кл/см³) рода *Beggiatoa* sp., *Thiotrix* sp. В термах М-3, отличающихся более высокой температурой и pH

(+60°C, 6,05), в воде преимущественно развивались автотрофные нитрификаторы ($1,0 \times 10^3$ кл/мл), а также азотфиксирующие ($1,1 \times 10^2$ кл/мл) и тионовые бактерии ($0,6 \times 10^2$ кл/мл), в матах преобладали сапрофиты ($6,2 \times 10^3$ кл/см³) [21, с. 106]. В составе диатомовой флоры на камнях и скальных грунтах в горячих источниках активной группы ранее отмечены *Pinnularia acidojaponica*, *Eunotia exigua*, *Frustulia saxonica*, *Pinnularia acidophila* и *P. acoricola* [13, с. 311].

Из термальных вод и микробных матов гидротерм Дачного участка в настоящей работе на различных селективных средах было выделено 14 культур термофильных гетеротрофных бактерий (вода – 4 шт., мат – 10 шт.). Выделенные штаммы формировали на селективных средах колонии в основном прозрачного, бежевого, бело-серого, коричневого, желтого и розового цвета. Среди изолятов значительно преобладали аспорогенные (64%), каталазаположительные (86%) и оксидазаположительные (71%), подвижные (57%), грамотрицательные (64%) палочки размером 0,1–1,5/0,50–8,0 мкм в длину (рис. 1, табл. 1). В культурах, выделенных из термальных вод, отмечены и грамотрицательные и грамположительные бактерии. В микробных матах участка М-3 6 штаммов из 8 были представлены грамотрицательными палочками. Подобное преобладание грамотрицательных, аспорогенных каталазаположительных палочек было отмечено нами ранее в термальных источниках Кульдур [21, с. 106]. Известно, что термофильные бактерии способны к образованию экзоферментов, относящихся к группе гидролаз, способных расщеплять крупные макромолекулы на более доступные соеди-

нения, проникающие через мембрану бактериальной клетки [22, с. 215]. В связи с этим выделенные термофильные гетеротрофные бактерии были протестированы на наличие экзогенной гидролитической активности (протеиназа, амилаза, липаза, целлюлаза). Результаты показали, что при температуре +50°C наибольшее количество штаммов обладали амилазной (93%) и протеиназной (43%) активностью, наименьшее число культур проявляли липазную гидролитическую активность (14%) (табл. 1). Целлюлазной активностью обладали 28% от изученных штаммов. Подобная более высокая амилазная, протеиназная и наиболее низкая липазная экзогенная гидролитическая активность штаммов отмечена также у бактерий, выделенных из термальных источников Кульдур и щелочных гидротерм Монголии [21, с. 106; 23, с. 156].

Среди выделенных штаммов, обладающих протеиназной активностью, 67% были представлены грамотрицательными палочками. Липазной активностью обладали только 2 штамма грамотрицательных бактерий. Множественной ферментативной экзогенной активностью (протеиназной, амилазной и целлюлазной) обладали штаммы грамположительных бактерий № 23 и грамотрицательных микроорганизмов № 68 и № 46 (табл. 1). Таким образом, выделенные термофильные гетеротрофные бактерии в большей части были способны синтезировать ферменты амилазу и протеиназу, гидролизовать белки и использовать полисахариды как источник углерода и энергии.

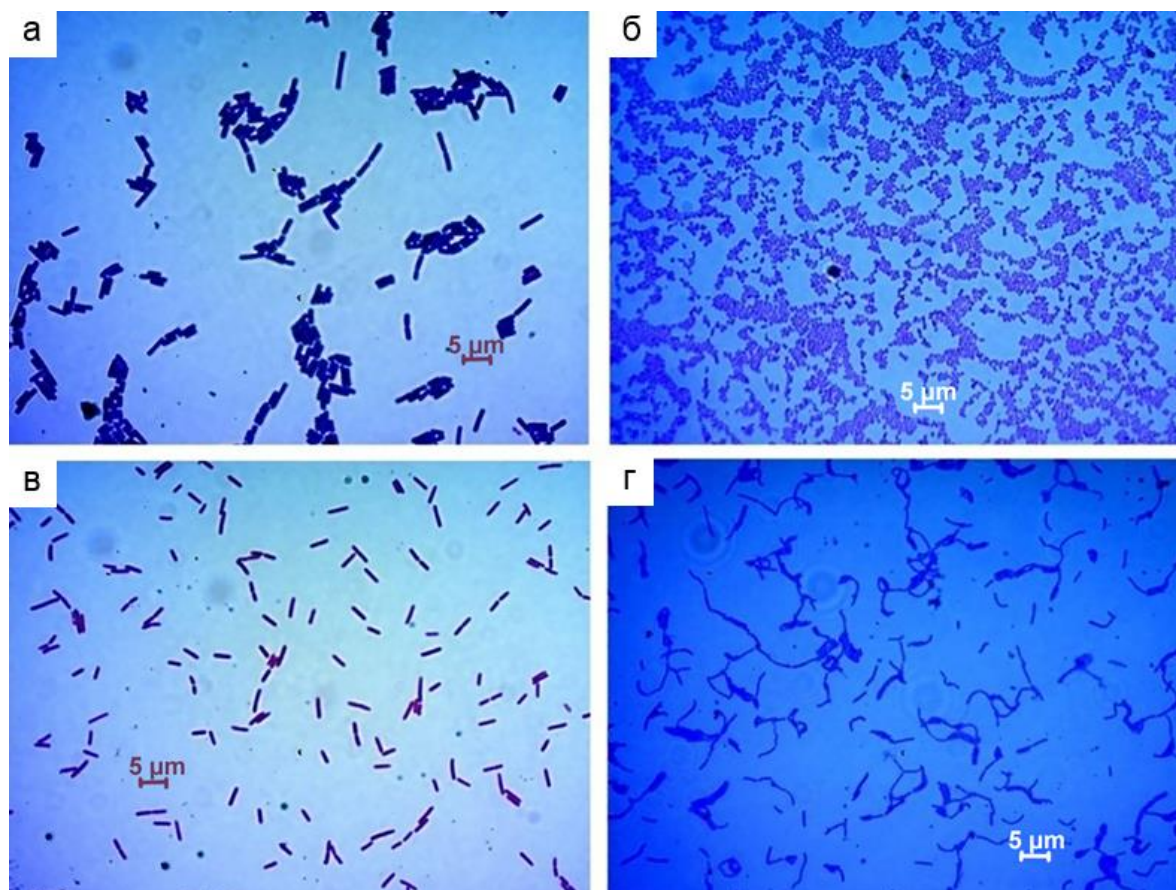


Рисунок 1 – Морфологические формы гетеротрофных термофильных бактерий, выделенных из термальных вод и микробных матов гидротерм Дачного участка (а – gr+ штамм № 111; б – gr– № 68; в – gr– № 88; г – gr+ № 19)

Таблица 1 – Некоторые морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства термофильных бактерий, выделенных из Дачных горячих источников Камчатки

Штамм, №	Место выделения	Вид колонии, морфология клеток, мкм	Спорообразование	Каталаза	Оксидаза	Подвижность	Гидролитическая активность			
							Протеиназа	Амилаза	Липаза	Целлюлаза
119	М-1, вода	Гр+ палочки 1,0–1,2/2–4. Плоские, прозрачные	+	+	–	–	–	+	–	–
23	М-1, зеленый мат	Гр+ палочки 1,0–1,2/3–8. Бежевые, пленчатые	+	+	–	+	+	+	–	+
125	М-1, зеленый мат	Гр– палочки 0,1–0,5/2–4. Коричнево-желтые матовые	–	–	+	–	–	+	–	–
40	М-3, вода	Гр– палочки 0,7–1,3/2–3. Розовые маслянистые	–	–	–	+	+	+	–	–
68	М-3, вода	Гр– палочки 0,3–0,5/0,5–0,8. Серые, глянцевые	–	+	+	–	+	+	–	+
19	М-3, вода	Гр+ палочки 0,5–0,8/2–5. Белые, матовые	+	+	–	+	–	+	–	–
15	М-3, мат	Гр– палочки 0,5–0,9/1–2. Коричневые, гладкие	–	–	+	–	+	+	–	–
46	М-3, мат	Гр– палочки 0,7–0,8/1–3. Желтые, блестящие	–	+	+	+	+	+	–	+
43	М-3, мат	Гр– палочки 0,5–1,0/1–2. Бежевые, пленчатые	–	+	–	–	–	+	+	–
113	М-3, мат	Гр– палочки 1,2–1,5/2–3. Бежевые, глянцевые	–	+	–	+	–	+	–	–
111	М-3, мат	Гр+ палочки 0,8–1,2/3–5. Серо-белые, матовые	+	+	–	+	+	–	–	+
88	М-3, мат	Гр+ палочки 1,0–1,5/2–5. Белые, морщинистые	+	+	–	+	–	+	–	–
18	М-3, мат	Гр– палочки 0,7–1,2/4–7. Бело-серые с изрезанными краями	–	+	–	–	–	+	+	–
13	М-3, мат	Гр– палочки 0,8–1,0/3–8. Коричнево-желтые, глянцевые	–	+	–	+	–	+	–	–

Исследование экофизиологии культур, выделенных из термальных источников, показало, что штаммы способны развиваться в широком диапазоне температур (+35...+65°C), pH (5,0–10,0) и концентрации NaCl (1–10%), проявляя свойства гало-, алкало- и термотолерантности (табл. 2). Большинство тестируемых штаммов проявляли рост при температуре +35...+50°C, 5 штаммов из 14 были способны расти в диапазоне +35...+60°C, один штамм (№ 68) проявлял рост при +65°C (табл. 2). По отношению к кислотности среды большинство штаммов были способны развиваться при pH 5–8, рост в более щелочных условиях (pH 10) был характерен для грамположительных культур № 23, 19, 111, 88. Большинство изученных штаммов проявляли рост при концентрации NaCl в среде в пределах 1–5%, 5 из 14 изолятов были способны развиваться при высокой концентрации NaCl 10% (табл. 2).

Таблица 2 – Диапазон роста штаммов термофильных бактерий при различных температурах, pH, концентрации NaCl

Штаммы, №	Температура, °C				pH				NaCl, %			
	25	50	60	65	5,0	7,0	8,0	10,0	1	5	10	15
119	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	–	–
23	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–
125	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–	–
40	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	–
68	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–
19	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–
15	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	–	–
46	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+	–	–
43	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+	–	–
113	+	+	–	–	+	+	+	–	+	+	–	–
111	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	–
88	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–
18	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	–	–
13	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	–

Концентрация соли 15% была критична для роста штаммов. Отмеченный широкий диапазон роста изученных культур указывает о высокой приспособленности штаммов к росту при различных температурах, pH и солёности. Высокая ферментативная активность бактерий и способность их роста в широком диапазоне температур, pH, концентрации NaCl указывает на перспективность использования выделенных культур в области экологии для биологической переработки органических загрязнений.

В настоящее время известно, что бактерии способны проявлять устойчивость практически ко всем тяжелым металлам (ТМ) [24, с. 753; 25, с. 730]. Микроорганизмы способны за счет поглощения и связывания ТМ снижать их подвижность и токсичность. Некоторые микроорганизмы могут аккумулировать металлы в количествах, в десятки и сотни раз превышающих их содержание в питательной среде [26, с. 105]. Так как в термальных водах различных гидротерм часто отмечаются повышенные концентрации ряда тяжелых металлов то, возможно, обитающие в этих условиях термофильные микроорганизмы могли развить специфические механизмы устойчивости к ТМ. В связи с этим, а также с перспективой использования штаммов для очистки объектов окружающей среды, подверженных техногенному загрязнению, был изучен уровень устойчивости культур термофильных гетеротрофных бактерий к некоторым тяжелым металлам. Обнаружено, что все исследованные бактерии проявляли высокую устойчивость к изученным тяжелым металлам (табл. 3). Действие МИК солей тяжелых металлов на размножение термофильных гетеротрофных бактерий по мере их возрастания можно расположить в следующий ряд: $Pb^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+}$. Так, в большей степени токсичны для изученных бактерий Cd^{2+} и Co^{2+} , так как уже небольшие концентрации этих металлов подавляют размножение бактерий (табл. 3).

Таблица 3 – Устойчивость штаммов термофильных бактерий, выделенных из Дачных горячих источников Камчатки к ионам ТМ

Штамм, №	Минимальная ингибирующая концентрация, мг/л					
	Pb ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Cd ²⁺
119 гр+	3500	1000	500	300	200	10
23 гр+	3500	500	1000	1500	300	30
125 гр–	3500	1500	1000	1000	1000	50
40 гр–	3500	1000	1500	1500	500	500
68 гр–	2500	1000	1000	100	300	10
19 гр+	4000	1000	500	1500	300	30
15 гр–	3500	2000	1500	1500	1000	1500
46 гр–	3000	1000	1000	1000	500	50
43 гр–	3500	500	1000	1000	200	50
113 гр–	3000	1000	1000	1000	1000	500
111 гр+	3000	1000	500	1000	1000	200
88 гр+	3000	1000	500	1000	1000	200
18 гр–	3000	1000	500	300	500	30
13 гр–	3000	1000	1000	200	500	30

Необходимо отметить, что МИК свинца, по сравнению с другими металлами, был наиболее высок для всех изученных штаммов (табл. 3). Следовательно, свинец в меньшей степени, по сравнению с другими тяжелыми металлами угнетает рост термофильных бактерий [27, с. 32–33]. Обнаружено, что все исследованные микроорганизмы хорошо росли на среде УК с Pb²⁺ (100–2000 мг/л), Ni²⁺ (50–450 мг/л), Cu²⁺ (100–450 мг/л), Zn²⁺ (50–170 мг/л), Co²⁺ (50–170 мг/л) и Cd²⁺ (1–7 мг/л), что свидетельствует о наличии множественной устойчивости изученных бактерий к данным ТМ [22, с. 215]. При повышении концентрации ТМ наблюдалось постепенное угнетение роста бактерий. Для свинца МИК для изученных культур составила 2500–4000 мг/л, при этом максимальной устойчивостью отличался штамм грамположительных бактерий № 19. При концентрации свинца в среде от 2500 мг/л биомасса разных культур по сравнению с контролем приобретала различный коричневый оттенок (рис. 2), что, скорее всего, связано с процессами поглощения, адсорбции и аккумуляции свинца бактериальными клетками для снижения подвижности и токсичности этого элемента.

МИК никеля для изученных штаммов составляла 500–2000 мг/л, при этом наибольшую устойчивость проявляли два грамотрицательных изолята № 125 (1500), № 15 (2000). МИК меди для выделенных штаммов термофильных бактерий была равна 500–1500 мг/л, при этом наименьшая устойчивость к меди была характерна для большинства грамположительных культур, наибольшая отмечена для грамотрицательных палочек № 40 и № 15 (табл. 3). Для цинка МИК для выделенных штаммов составила 200–1500 мг/л, при этом максимальной устойчивостью характеризовались штаммы № 23, № 40, № 19, № 15. При концентрации цинка в среде от 200 мг/л у некоторых штаммов наблюдали появление желтой опалесценции вокруг штриха посеянной культуры, которая отсутствовала в контроле. МИК кобальта для изученных штаммов составляла 200–1000 мг/л,

при этом наибольшей устойчивостью характеризовались штаммы № 125, № 15, № 113, № 111, № 88. Культуры наиболее устойчивых к кобальту грамположительных бактерий № 111 и № 88 отличались также способностью роста в широком диапазоне pH до 10, температуре до +50°C и концентрации NaCl 1–5–10% (табл. 2). МИК кадмия была ниже для изученных культур и составляла 10–1200 мг/л. Максимальную устойчивость к кадмию (МИК 500–1200 мг/л) проявляли штаммы грамотрицательных бактерий № 113, № 40 (500 мг/л) и № 15 (1200 мг/л). Необходимо отметить, что штамм № 40 характеризовался широким диапазоном роста при температурах +35...+60°C, pH 5,0–8,0, концентрации NaCl 1–10% и был способен к амилазной и протеиназной ферментативной активности. Проведен сравнительный анализ индивидуальной металлорезистентности выделенных культур из Дачных термальных источников и штаммов, изолированных из загрязненных морей Приморья. Отмечается, что культуры, выделенные из Дачных источников, отличаются сопоставимой или даже большей устойчивостью к ряду тяжелых металлов, особенно к кадмию, меди и свинцу (табл. 3). МИК металлов для штаммов в загрязненных морских водах составляли Cd²⁺ (80–310 мг/л), Cu²⁺ (500–1000 мг/л), Pb²⁺ (1800–2600 мг/л) [18, с. 89]. Множественную полирезистентность к наиболее высоким концентрациям нескольких тяжелых металлов проявляли 4 штамма термофильных бактерий № 19 гр+ (Pb²⁺ 4000 мг/л, Zn²⁺ 1500 мг/л), № 125 гр– (Ni²⁺ 1500 мг/л, Co²⁺ 1000 мг/л), № 40 гр– (Cu²⁺ 1500 мг/л, Zn²⁺ 1500 мг/л, Cd²⁺ 500 мг/л), № 15 гр– (Ni²⁺ 2000 мг/л, Cu²⁺ 1500 мг/л, Zn²⁺ 1500 мг/л, Co²⁺ 1000 мг/л Cd²⁺ 1200 мг/л). Данные штаммы были очищены, проведена их идентификация с использованием молекулярно-генетического метода секвенирования гена 16S рРНК. Показано, что выделенные изоляты представлены бактериями рода *Bacillus* sp. (№ 19), *Thermus* sp. (№ 40), *Pseudomonas* sp. (№ 15), *Rhizobium* sp. (№ 125). Выделенные штаммы перспективны для применения в сфере биотехнологии для очистки загрязненных объектов окружающей среды.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования позволили выделить из Дачных термальных источников Камчатки термофильные бактерии и изучить их некоторые культуральные, морфологические и физиолого-биохимические свойства. Показано, что большинство термофильных бактерий представлено грамотрицательными неспорообразующими подвижными палочками. Выделенные изоляты обладали больше всего протеиназной и амилазной внеклеточной гидролитической активностью и были способны расти в широких пределах температур, pH и концентрации NaCl, что указывает на их приспособленность к высоким температурам, минерализации и щелочным условиям среды. Разнообразие условий роста штаммов позволяет предположить, что их гидролитические ферменты обладают набором полезных характеристик, в том числе термостабильностью и устойчивостью в широком диапазоне значений pH и минерализации.



Рисунок 2 – Рост выделенных штаммов термофильных бактерий на среде YK без добавления металлов (контроль) (а) и с добавлением Pb^{2+} 2500 мг/л (б)

Все выделенные термофильные микроорганизмы обладали устойчивостью по отношению ко всем исследованным ТМ. Процессы размножения выделенных изолятов в среде в большей степени тормозили кадмий и кобальт, в меньшей степени – свинец, что может быть связано с механизмами проникновения и воздействия тяжелых металлов на микробную клетку [27, с. 33]. Наибольшей множественной устойчивостью к нескольким ТМ отличались штаммы № 19, № 40, № 15, № 125, большинство из которых были грамотрицательными. Выделенные изоляты были представлены бактериями рода *Bacillus* sp., *Thermus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp. Обнаруженная у исследованных бактерий полирезистентность к ТМ, несомненно, является их отличительным признаком, благодаря которому эти микроорганизмы смогут проявлять деструктивную активность в отношении органических загрязнителей в условиях повышенных концентраций комплекса ТМ, содержащихся в загрязненных объектах [21, с. 106; 22, с. 215].

Полученные данные позволяют утверждать, что вода и микробные маты Дачных термальных источников Камчатки населены уникальным сообществом термофильных микроорганизмов. Несомненно, что это микробное сообщество играет особую роль в функционировании гидротермальной экосистемы, в том числе и в биогеохимических преобразованиях, именно за счет своей высокой потенциальной метаболической активности [8, с. 716].

Список литературы:

1. Sand W. Microbial life in geothermal waters // *Geothermics*. 2003. Vol. 32. P. 655–667.
2. Meyer-Dombard D.R., Shock E.L., Amend J.P. Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA // *Geobiology*. 2005. Vol. 3. P. 211–227.
3. Галачьянц А.Д., Белькова Н.Л., Суханова Е.В., Романовская В.А., Гладка Г.В., Бедошвили Е.Д., Парфенова В.В. Разнообразие и физиолого-биохимические свойства гетеротрофных бактерий, выделенных из нейстона озера Байкал // *Микробиология*. 2016. № 5. С. 568–579.

4. Franke R.B., Bazylnski D.A. Biologically induced mineralization by bacteria // *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. 2003. Vol. 54. P. 95–114.

5. Лазарева Е.В., Брянская А.В., Жмодик С.М., Смирнов С.З., Пестунова О.П., Бархутова Д.Д., Полякова Е.В. Минералообразование в цианобактериальных матах щелочных гидротерм Баргузинской впадины Байкальской рифтовой зоны // *Доклады Академии наук*. 2010. Т. 430, № 5. С. 675–680.

6. Huber H., Stetter K.O. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology // *Journal of Biotechnology*. 1998. Vol. 64. P. 39–52.

7. Lewin A., Wentzel A., Valla S. Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments // *Current Opinion in Biotechnology*. 2013. Vol. 24. P. 516–525.

8. Белькова Н.Л., Округин В.М., Тадзак К. Изучение микробных сообществ Вилучинской гидротермальной системы (Камчатка) методами оптической и электронной микроскопии // *Микробиология*. 2006. № 5. С. 713–716.

9. Андреева И.С., Морозов И.В., Печуркина Н.И., Морозова О.В., Рябчикова Е.И., Саоанина И.В., Емельянова Е.К., Пучкова Л.И., Торок Т.Т., Власов В.В., Репин В.Е. Выделение бактерий рода *Paenibacillus* из почвы и источников долины гейзеров (Камчатка) // *Микробиология*. 2010. № 5. С. 705–713.

10. Гумеров В.М., Марданов А.В., Белецкий А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. Молекулярный анализ биоразнообразия микроорганизмов в источнике Заварзина, кальдера Узон, Камчатка // *Микробиология*. 2011. № 2. С. 258–265.

11. Chernyh N.A., Mardanov A.V., Gumerov V.M., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Merkel A.Y., Crowe D., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Ravin N.V., Moran M.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial life in Bourlyashchy, the hottest thermal pool of Uzon caldera, Kamchatka // *Extremophiles*. 2015. Vol. 19. P. 1157–1171.

12. Лебедева Е.Г., Харитонов Н.А., Челноков Г.А. Бактерии различных эколого-трофических групп в Дачных термальных источниках (Камчатка, Дальний Восток) // *Естественные и технические науки*. 2019. № 11 (137). С. 303–305.

13. Nikulina T.V., Kalitina E.G., Kharitonova N.A., Chelnokov G.A., Vakh E.A., Grishchenko O.V. Diatoms from

hot springs of the Kamchatka Peninsula (Russia) // *Diatoms: Fundamentals & Applications*. Chapter 14 / eds. J. Seckbach, R. Gordon. Wiley-Scrivener, Beverly, MA, USA. 2019. Vol. 1. P. 311–333. DOI: 10.1002/9781119370741.ch14.

14. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Изд-во «Наука», 1989. 288 с.

15. Youchimizu M., Kimura T. Study of intestinal microflora of Salmonids // *Fish Pathology*. 1976. Vol. 10, № 2. P. 243–245.

16. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во «МГУ», 1995. 224 с.

17. Lambert R.J., Pearson J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values // *Microbiology*. 2000. Vol. 88. P. 784–790.

18. Безвербная И.П., Бузалева Л.С., Христофорова Н.К. Металлоустойчивые гетеротрофные бактерии в прибрежных акваториях Приморья // *Биология моря*. 2005. № 2. С. 89–93.

19. Определитель бактерий Берджи / под ред. Д. Холта, Н. Крига, П. Снита, Д. Стейли, С. Уилльямса в 2 т. Т. 1. М.: Изд-во «Мир», 1997. 432 с.

20. Чудаев О.В., Чудаева В.А., Карпов Г.А., Эдмундс М., Шанд П. Геохимия вод основных геотермальных районов Камчатки. Владивосток: Изд-во «Дальнаука», 2000. 157 с.

21. Лебедева Е.Г., Харитонов Н.А. Физиолого-биохимические свойства и потенциальная ферментативная активность гетеротрофных бактерий, выделенных из термальных вод и микробных матов месторождения Кульдур // *Успехи современного естествознания*. 2019. № 12. С. 106–111.

22. Бузалева Л.С., Смирнова М.А., Безвербная И.П. Биологические свойства морских нефтеуглеводородокисляющих бактерий из прибрежных акваторий Дальневосточных морей с разным характером загрязнения // *Известия ТИНРО*. 2008. Т. 155. С. 210–218.

23. Бабасанова О.Б., Бархутова Д.Д. Аэробные термофильные бактерии гидротермы Шаргулжунт (Монголия) // *Вестник Бурятского государственного университета*. Сер. 2. Биология. 2005. Вып. 7. С. 155–159.

24. Silver S., Phung L.T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises // *Annual Review of Microbiology*. 1996. Vol. 50. P. 753–789.

25. Nies D.H. Microbial heavy metal resistance // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999. Vol. 51. P. 730–750.

26. Беляков А.Ю. Оценка токсичности буровых шламов и эколого-функциональные особенности выделенных из них микроорганизмов: дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2014. 173 с.

27. Бузалева Л.С., Кривошеева А.М. Влияние тяжелых металлов на размножение патогенных бактерий // *Успехи современного естествознания*. 2013. № 7. С. 30–33.

Информация об авторе(-ах):	Information about the author(-s):
<p>Лебедева Елена Геннадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории геохимии гипергенных процессов; Дальневосточный геологический институт ДВО РАН (г. Владивосток, Российская Федерация). E-mail: microbiol@mail.ru.</p> <p>Харитонов Наталья Александровна, доктор эколого-минералогических наук, главный научный сотрудник лаборатории геохимии гипергенных процессов; Дальневосточный геологический институт ДВО РАН (г. Владивосток, Российская Федерация). E-mail: tchenat@mail.ru.</p>	<p>Lebedeva Elena Gennadievna, candidate of biological sciences, senior researcher of Geochemistry of Hypergene Processes Laboratory; Far Eastern Geological Institute of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (Vladivostok, Russian Federation). E-mail: microbiol@mail.ru.</p> <p>Kharitonova Natalya Aleksandrovna, doctor of geological and mineralogical sciences, chief researcher of Geochemistry of Hypergene Processes Laboratory; Far Eastern Geological Institute of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (Vladivostok, Russian Federation). E-mail: tchenat@mail.ru.</p>

Для цитирования:

Лебедева Е.Г., Харитонов Н.А. Эколого-биохимические свойства термофильных бактерий, выделенных из Дачных горячих источников Камчатки (Дальний Восток, Россия) // *Самарский научный вестник*. 2020. Т. 9, № 3. С. 79–85. DOI: 10.17816/snv202093114.