СТАТЬИ

УДК 579.68

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ПСЕКУПСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ ТЕРМАЛЬНЫХ ВОД

¹Богомаз О.Д., ^{1,2}Владимиров И.А., ¹Павлова О.А., ^{1,3}Богомаз Д.И.

¹ООО «Бигль», Санкт-Петербург, e-mail: lisokot@list.ru, olga.an.pavlova@gmail.com;

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, e-mail: ivanpentod@gmail.com;

³Санкт-Петербургский политехнический университет им. Петра Великого, Санкт-Петербург, e-mail: bogomazden@mail.ru

Псекупское месторождение минеральных вод обеспечивает потребности бальнеологического курорта Горячий ключ, а также завода по производству минеральных вод. В данной работе изучили микробиологический состав минеральной воды из данного месторождения с целью проверки гипотезы о возможном наличии терапевтического действия данной воды не только за счет химического состава, но и за счет входящих в её состав микроорганизмов. Среда и условия пробоотбора подобраны таким образом, чтобы выявлять виды бактерий, с одной стороны, способных переносить без потери жизнеспособности нахождение в горячем источнике, и, с другой стороны, способных к росту в нормальных условиях и теоретически хотя бы некоторое время способных выживать в ЖКТ человека. Видоидентификацию выделенных микроорганизмов произвели с помощью ПЦР 16S рДНК с последующим секвенированием. В ходе исследования были обнаружены термофильные бактерии следующих таксономических единиц: *Ureibacillus thermosphaericus*, *Geobacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus borbori*, *Streptomyces sp.* Произведен анализ литературы на предмет продукции данными микроорганизмами биологически активных веществ, потенциально обладающих терапевтическим эффектом (антибиотиков, ферментов и т.п.). Для ряда микроорганизмов примеры таких веществ действительно были найдены.

Ключевые слова: микробиота, биоразнообразие, термофильные бактерии, горячие источники, Псекупское месторождение минеральных вод

THE DIVERSITY STUDY OF THERMOPHILIC BACTERIA FROM THE PSEKUPS THERMAL WATER DEPOSIT

¹Bogomaz O.D., ^{1,2}Vladimirov I.A., ¹Pavlova O.A., ^{1,3}Bogomaz D.I.

¹Beagle Ltd., St. Petersburg, e-mail: lisokot@list.ru, olga.an.pavlova@gmail.com;

²St. Petersburg State University, St. Petersburg, e-mail: ivanpentod@gmail.com;

³St. Petersburg Polytechnic University Peter the Great, St. Petersburg, e-mail: bogomazden@mail.ru

The Psekupskoe mineral water deposit provides the mineral water for the balneological resort Goryachiy Klyuch, as well as a mineral water production plant. In this paper, we have studied the microbiological composition of mineral water from this deposit in order to test the hypothesis about the possible presence of the therapeutic effect of this water not only due to the chemical composition, but also due to the microorganisms in it. The environment and conditions of sampling were selected in such a way as to identify the types of bacteria that, on the one hand, could be tolerance to hot spring conditions without losing vitality, and, on the other hand, were capable to grow under normal conditions and theoretically could survive in the human gastrointestinal tract for at least some time. Species identification of the isolated microorganisms was performed using 16S rDNA PCR followed by sequencing. The study revealed thermophilic bacteria of the following taxonomic units: *Ureibacillus thermosphaericus*, *Geobacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus borbori*, *Streptomyces sp.* An analysis of the literature on the subject of production of biologically active substances by these microorganisms, potentially having a therapeutic effect (antibiotics, enzymes, etc.) was made. For a number of microorganisms, examples of such substances have indeed been found.

Keywords: microbiota, biodiversity, thermophilic bacteria, hot springs, Psekupskoe mineral water deposit

В нашей работе осуществлены поиск и видоидентификация термофильных бактерий в Псекупском месторождении минеральных вод.

Псекупское месторождение минеральных вод находится в южной части территории г. Горячий ключ. Город расположен в 65 км к юго-востоку от краевого центра г. Краснодара в предгорье Кавказского хребта в долине реки Псекупс. Местность в районе месторождения имеет сложное геологическое строение и находится на стыке предгорий Кавказа и Прикубанской

низменности. Источниками сульфатных вод Псекупского месторождения являются высокотермальные воды нижнемеловых отложений, разгружающиеся по отдельным тектонически ослабленным зонам. Смешение этих вод с более холодными поверхностными водами в различных соотношениях приводит к большому разнообразию состава вод в различных скважинах данного месторождения [1]. Данная ситуация является уникальным случаем и представляет собой очень интересную для исследований нестабильную и динамически меняющуюся

ся экологическую нишу, где экстремальные термофилы, преимущественно анаэробы, попадают в аэробные и значительно менее минерализованные условия с пониженной до 50–60 °С температурой, а преимущественно аэробы из холодных поверхностных вод попадают в условия нехарактерных для них высоких температур и минерализации. На выходе минерального источника имеется совершенно новое, активно расселяющееся по опустевшей экологической нише микробиологическое сообщество, оптимизированное под создавшиеся в процессе смешивания вод условия.

Потребление минеральной воды Псекупского источника благотворно сказывается на здоровье человека при различных заболеваниях. Принято считать, что полезные свойства минеральной воды обусловлены исключительно её минеральным составом,

однако мы предположили, что микробиологический состав воды также может влиять на профилактические и терапевтические свойства воды. На пути к проверке этой гипотезы было принято решение изучить максимально представленные аэробные виды, способные некоторое время поддерживать жизнеспособность в условиях ЖКТ человека.

Цель исследования: поиск и видоидентификация умеренно термофильных аэробных бактерий в Псекупском месторождении минеральных вод.

Материалы и методы исследования

В работе использовались: вода из Псекупского месторождения минеральных вод г. Горячий Ключ (Россия, Краснодарский край) (рис. 1).

Вода из источника «2-к» была собрана 15.08.2015 в стерильную посуду и доставлена в место проведения эксперимента.

Рис. 1. Схема Псекупского месторождения [2]
и расположение места пробоотбора – источника «2-к» (красная стрелка)

Непосредственно перед экспериментом была приготовлена среда LB [3] с модификациями, оптимизированная для роста умеренно термофильных аэробов (О.К. Кабоев, устное сообщение).

Образцы воды из источника были пропущены через бактериальную мембрану размером пор 25 μm с использованием максимального давления фильтрации до 67 psi для концентрирования бактерий. На каждые 150 мл воды был использован один фильтр. Мембрана с микроорганизмами была перенесена на питательную среду и далее микроорганизмы выращивались в термостате на температуре 60 °C. Эта температура сходна с температурой в горячем источнике и позволяет подавить рост других бактерий и грибов, которые могут попасть в образец в результате его возможного загрязнения.

Далее образцы колоний были расштрихованы для получения чистой культуры (рис. 2).

Соскоб культуры размером со спичечную головку ресуспендировали в 300 мкл дистиллированной воды, замораживали при температуре –70 °C, а затем нагревали до 96 °C в течение 15 мин. Остатки клеток и свернувшиеся белки удаляли центрифугированием (10 мин, *10000 g).

Постановка ПЦР: объем реакционной смеси – 20 мкл на пробирку. Состав реакционной смеси для ПЦР с праймерами к последовательности 16S рДНК: 1х буфер для Taq-полимеразы, 2,5 mM магния хлорид, 0,125 mM трифосфаты нуклеотидов, 0,25 мкМ праймер прямой, 0,25 мкМ праймер обратный, 0,125 е.а./мкл Taq-полимераза, 0,2 % БСА.

Использовали праймеры 16SF: GTGCCAGCMGC-CCGCGTAA; 16SR: GGACTACVSGGGTATCTAAT [4].

Реакцию проводили по программе: начальная денатурация – 94 °C (5 мин), далее 45 циклов: 94 °C (18 с), 50 °C (40 с), 72 °C (40 с), финальная элонгация – 72 °C (5 мин). Анализ результатов ПЦР произведен методом электрофореза в агарозном геле. Продукты ПЦР-реакции были секвенированы. Обработка сиквенсов производилась с использованием программы «Mega5». Последовательность праймера длиной 19 нуклеотидов из сиквенса вычиталась и в дальнейшем анализе не использовалась.

Анализ сиквенса производился путем поиска гомологичных последовательностей с помощью базы данных NCBI.

В случае, если полученный сиквенс был одинаково похож на последовательности бактерий разных видов, определение производилось только до рода. Такое ограничение связано с малой длиной ампликона, из-за чего у достаточно близкородственных бактерий может не быть различий в последовательности 16S рДНК в пределах участка-мишени.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе выполнения работы получены концентрированные образцы природных организмов, обитающих в Псекупском месторождении минеральных вод. После высева образцов на культуральную среду были получены одиночные колонии, позже расштрихованные для получения чистой культуры (рис. 2).

Была проведена ПЦР с праймерами к таксономически значимым районам 16S рДНК, ПЦР продукты были секвенированы.

Рис. 2. Расштрихованные образцы с колоний

В ходе исследования были обнаружены термофильные бактерии следующих таксономических единиц:

Ureibacillus thermosphaericus, *Geobacillus* sp., *Bacillus licheniformis*, *Bacillus borbori*, *Streptomyces* sp

На рис. 3 и 4 сиквенсы, представленные ниже (Query), получены в ходе работы.

Sbjct – последовательность из базы.

Bacillus licheniformis – грамположительная мезофильная спорообразующая бактерия. Широко представлена в разнообразных сообществах, в частности в почве. Выделялась также и из вод разнообразных горячих источников. Данные бактерии являются продуцентами высокоэффективных антибиотиков, в частности бацитрацина – циклопептидного антибиотика, эффективно действующего на грамположительную патогенную микрофлору, в частности на стрептококки и стафилококки.

Еще одной интересной особенностью этих бактерий является способность продуцировать ферменты, разрушающие внеклеточную ДНК (extracellular DNA, eDNA) [5]. Внеклеточная ДНК является важным компонентом внеклеточного матрикса, участвующего в построении биопленок различных видов бактерий, включая патогенные штаммы. Одним из примеров подобного рода является зубной налет [5]. В экспериментах *in vitro* фермент, выделенный из *Bacillus licheniformis*, разрушал существующие биопленки бактерий, вызывающих появление зубного налета, а также препятствовал образованию новых. Бактерии рода *Bacillus* довольно характерны для горячих источников, в частности они обнаружены в водах источников Горячий ключ (Приморский край, Россия) и Чистоводное (Приморский край, Россия) [6].

Ureibacillus thermosphaericus strain DSM 10633 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [ref|NR_040961.1](#) Length: 1540 Number of Matches: 1

Range 1: 571 to 788 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
396 bits(214)	2e-110	217/218(99%)	1/218(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGT-AAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGG	59		
Sbjct 571	CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGG	630		
Query 60	AGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGGAGAGGGGAAGCGGAATTCATGTGTAG	119		
Sbjct 631	AGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGGAGAGGGGAAGCGGAATTCATGTGTAG	690		
Query 120	CGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTTCTGGCTGTA	179		
Sbjct 691	CGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTTCTGGCTGTA	750		
Query 180	ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGG	217		
Sbjct 751	ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGG	788		

Geobacillus galactosidasius strain CF1B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [ref|NR_108140.1](#) Length: 1426 Number of Matches: 1

Range 1: 468 to 685 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
396 bits(214)	2e-110	217/218(99%)	1/218(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGT-AAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCACGGCTCAACCGTGG	59		
Sbjct 468	CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCACGGCTCAACCGTGG	527		
Query 60	AGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAGAGGAGAGCGGAATTCACGTGTAG	119		
Sbjct 528	AGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAGAGGAGAGCGGAATTCACGTGTAG	587		
Query 120	CGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTTCTGGCTGTA	179		
Sbjct 588	CGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTTCTGGCTGTA	647		
Query 180	ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGG	217		
Sbjct 648	ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGG	685		

Рис. 3. Результаты поиска гомологичных последовательностей в базе данных NCBI.
Выявлена гомология последовательностей к 16S рДНК *Ureibacillus* и *Geobacillus*

Из бактерий вида *Streptomyces globisporus* рода *Streptomyces* выделяют аминогликозидный антибиотик стрептомицин. Этот антибиотик используется для лечения туберкулеза в различных локациях, венерической гранулемы, туляремии, бруцеллеза, чумы, кишечных инфекций, инфекций мочевыводящих путей и бактериального эндокардита [7].

Интересно отметить, что очень похожий состав бактериальных сообществ получен для высокотемпературных компостов [8]. Важно подчеркнуть, что эти бактерии (*Bacillus* sp., *Ureibacillus* sp. и др.) в указанной работе обнаружены в среде, в которой температура почти на 20 °C превышает максимальные для роста данных бактерий температуры.

Как и предполагалось, экстремальных термофилов обнаружено не было. Подтверждена высокая биологическая активность обнаруженных микроорганизмов, многие из них являются источниками высокоэффективных антибиотиков и об-

ладают активностью к разрушению биопленок. Таким образом, микробиота минеральных вод Псекупского источника проявляет выраженные антимикробные свойства и не исключено, что профилактические и терапевтические её свойства связаны с микробиологическим составом. В случае дальнейшего подтверждения этого тезиса необходимо будет пересматривать способы подготовки, сроки и варианты использования бутилированной минеральной воды и рассматривать минеральную воду в качестве пробиотического препарата. На настоящий момент максимальный титр жизнеспособных бактериальных клеток в минеральной воде для внутреннего применения жестко нормируется ГОСТ Р 54316-2011 «Воды минеральные природные питьевые. Общие технические условия», а для выполнения этих требований производителями нередко применяются жесткие методики обеззараживания (включая обработку ультрафиолетом) и глубокую фильтрацию.

Bacillus licheniformis strain DSM 13 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
Sequence ID: [ref|NR_118996.1](#) Length: 1545 Number of Matches: 1

Range 1: 570 to 787 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
396 bits(214)	2e-110	217/218(99%)	1/218(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGT-AAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG	59		
Sbjct 570	CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGG	629		
Query 60	AGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTCAGTGCAGAGAGGAGTGGAAATCCACGTGTAG	119		
Sbjct 630	AGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTCAGTGCAGAGAGGAGTGGAAATCCACGTGTAG	689		
Query 120	CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA	179		
Sbjct 690	CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA	749		
Query 180	ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG	217		
Sbjct 750	ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG	787		

Streptomyces leeuwenhoekii strain C34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [ref|NR_126200.1](#) Length: 1416 Number of Matches: 1

Range 1: 464 to 681 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
396 bits(214)	2e-110	217/218(99%)	1/218(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGT-AAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCCCGG	59		
Sbjct 464	CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCCCGG	523		
Query 60	GTCTGCAGTCGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAG	119		
Sbjct 524	GTCTGCAGTCGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAG	583		
Query 120	CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGAT	179		
Sbjct 584	CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGAT	643		
Query 180	ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG	217		
Sbjct 644	ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG	681		

Bacillus borbori strain DX-4 16S ribosomal RNA, partial sequence
Sequence ID: [ref|NR_132725.1](#) Length: 1453 Number of Matches: 1

Range 1: 541 to 758 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
396 bits(214)	2e-110	217/218(99%)	1/218(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGT-AAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGCAGCTCAACTGCGG	59		
Sbjct 541	CGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGCAGCTCAACTGCGG	600		
Query 60	AGGGTCATTGGAACTGGGAAGCTTCAGTGCAGAGAGGAGTGGAAATCCACGTGTAG	119		
Sbjct 601	AGGGTCATTGGAACTGGGAAGCTTCAGTGCAGAGAGGAGTGGAAATCCACGTGTAG	660		
Query 120	CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA	179		
Sbjct 661	CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA	720		
Query 180	ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG	217		
Sbjct 721	ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG	758		

Рис. 4. Результаты поиска гомологичных последовательностей в базе данных NCBI. Выявлена гомология последовательностей к 16S рДНК *Bacillus* и *Streptomyces*

Все идентифицированные бактерии выделены в виде чистых культур и поставлены на хранение, что дает возможности для их дальнейшего изучения.

Выводы

В Псекупском месторождении минеральных вод обнаружены термофильные

микрорганизмы родов *Ureibacillus*, *Geobacillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*. Показана потенциальная антимикробная активность минеральной воды, в том числе к патогенным бактериям формирующим биопленки.

Авторы работы выражают искреннюю благодарность В.Ю. Богомаз и П.В. Фоми-

ну за помощь в получении материала, а также за всестороннюю помощь и поддержку.

Список литературы

1. Мишурина В.М. Зависимость содержания сероводорода от условий эксплуатации сульфидных минеральных вод // Геология, география и глобальная энергия. Геология, поиски и разведка нефти и газа. 2013. № 1 (48). С. 38–46.
2. Машукова Л.И., Бжассо С.Х. Отчет о ведении объектного мониторинга минеральных вод и лечебных грязей на месторождениях, разрабатываемых ООО «Краснодарской ГПРЭС» // Псекупское месторождение минеральных вод. ГПРЭС, 2010. С. 4–15.
3. Bertani G. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1958. vol. 62. P. 293–300.
4. Davis J.P., Youssef N.H., Elshahed M.S. Assessment of the Diversity, Abundance, and Ecological Distribution of Members of Candidate Division SR1 Reveals a High Level of Phylogenetic Diversity but Limited Morphotypic Diversity // Appl Environ Microbiol. 2009. Vol. 75. no 12. P. 4139–4148.
5. Rostami N., Shieds R.C., Yassin S.A., Hawkins A.R., Bowen L., Luo T.L., Rickard A.H., Holliday R., Preshaw P.M., Jakubovics N.S. A Critical Role for Extracellular DNA in Dental Plaque Formation. J Dent Res. 2017. vol. 96. no 2. P. 208–216.
6. Калинина Е.Г., Никулина Т.В., Челноков Г.А., Брагин И.В., Зорин С.А. Микроорганизмы и водоросли в термальных источниках Горячий ключ и Чистоводное (Приморский край, Россия) // Чтения памяти Владимира Яковлевича Леванидова. 2014. № 6. С. 281–293.
7. Реестр лекарственных средств России. [Электронный ресурс]. URL http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1605.htm (дата обращения: 18.04.2019).
8. Hirota K., Miura C., Motomura N., Matsuyama H., Yumoto I. Isolation and identification of bacteria from high-temperature compost at temperatures exceeding 90 °C. African Journal of Microbiology Research. 2019. vol. 13. no. 7. P. 134–144.