

МРНТИ: 34.27.23

А.Ж. ИЗМУҚАН^{1*}, А.С. КИСТАУБАЕВА¹, А.С. МАШЖАН¹, Н. БИРКЕЛАНД²,
И.С. САВИЦКАЯ¹

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

²Университет Бергена, Берген, Норвегия

*e-mail: izmukan@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРМОЗИМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖАРКЕНТСКОГО ГЕОТЕРМАЛЬНОГО ИСТОЧНИКА

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.08

Аннотация

Объектами исследования служили термофильные бактерии, обитающие в горячих источниках Жаркента Алматинской области. Способность этих микроорганизмов поддерживать жизнедеятельность в экстремальных условиях демонстрирует их потенциал для биотехнологических процессов. Выделено четыре бактериальных изолята с оптимальной температурой роста от 75°C и 85°C. Четыре бактериальных изолята охарактеризованы по морфологическим, микроскопическим, биохимическим показателям. Все полученные изоляты подвергнуты скринингу на амилазную, протеазную, липазную и целлюлазную активность. Полученные изоляты предварительно идентифицированы как *Bacillus* sp. по морфологическим, биохимическим и физиологическим характеристикам.

Ключевые слова: термозимы, геотермальные источники, изоляты.

Термофильные бактерии являются одной из наиболее обширных и активно изучаемых групп экстремофильных микроорганизмов [1-3]. Термофильные и гипертермофильные микроорганизмы интересны для биотехнологии, главным образом, как продуценты высокоспецифичных термостабильных ферментов.

Продуцируемые ими ферменты, так называемые термозимы, имеют ряд биотехнологических преимуществ: высокая устойчивость ферментативных реакций при высоких температурах, устойчивость к высоким концентрациям субстрата из-за снижения вязкости раствора и увеличения коэффициентов диффузии. Термостабильные ферменты зачастую обладают повышенной устойчивостью к денатурирующим агентам [2]. Применение в индустрии ферментативного гидролиза обусловлено строгой специфичностью и направленным действием ферментов, и, соответственно, возможностью управления процессом трансформации веществ и получения на выходе чистого целевого продукта. Кроме того, процесс гидролиза осуществляется при температуре 70-80°C. Это, с одной стороны, препятствует развитию патогенных бактерий, которые могут присутствовать в сырье для переработки. С другой стороны, при такой температуре не происходит разрушения незаменимых аминокислот [4, 5].

Постоянный поиск новых термофильных прокариот проводится для того, чтобы найти бактерии с биотехнологически привлекательными свойствами. Таким образом, поиск новых термофильных бактерий гидролитиков остается актуальной проблемой исследований с научной и прикладной точек зрения [6, 7].

В связи с этим, ранее нами была сформирована уникальная коллекция аэробных и анаэробных термофильных бактерий, выделенных из термального источника Алматинской области Жаркентского геотермального горячего источника, расположенного на 43°97'14.93"N, 79°66'12.09"E, 273 км от города Алматы [8].

Цель исследования - выделение термофильных бактерий из геотермального горячего источника Алматинской области, определение термостойкости изолятов, проведение скрининга и получение изолятов с широким спектром гидролазной активности.

Материалы и методы

Место исследования и сбор образцов. Жаркентский геотермальный горячий источник расположен на 43°97'14.93"N, 79°66'12.09"E, 273 км. от города Алматы, не доходя до города Жаркент, в 80 км от границы с Китаем. Несколько скважин находятся в пределах города Жаркент, во впадинах урочища Жаркунак. Жаркунакское месторождение подземных вод является центральной частью Жаркентского геотермального источника, включающего скважины № 5539, 1-РТ. Все скважины расположены в пределах территории землепользования ТОО "Байсерек-Агро" [8].

Химический состав скважины № 5539 характеризуется как слабоминерализованный щелочной, умеренно радоновый, кремнистый, преимущественно хлоридно-бикарбонатно-натриевый с высокой концентрацией содержания фтора. Характерными особенностями воды являются слабая минерализация (до 1,0 г/дм³), щелочная реакция (pH 8,1–9,0), высокое содержание фтора (до 10 мг/дм³), бальнеологически активная концентрация кремниевой кислоты (свыше 50 мг/дм³), наличие радона в концентрациях до 60 пСи/л, свойственные для умеренно радоновых вод [8].

Выделение бактерий. Пробы воды и осадков из горячих источников отбирались в пластиковые пробирки типа «Falcon» объемом 15 мл, заполняя весь объем без воздушных пустот. Перед отбором проб в источниках определяли температуру, значения pH среды.

Пробы воды вносились в мясопептонный бульон (HiMedia, Индия) при 80°C, по истечению 3 суток обогащенную культуру высевали на питательный агар (HiMedia, Индия) для получения отдельных колоний. Все бактериальные изоляты, полученные на чашках Петри, отбирались и очищались методом истощающего штриха. Изоляты были определены как чистые после микроскопирования колоний культур.

Определение термоустойчивости. Для исследования термофильных характеристик каждый бактериальный изолят инокулировался в 10 мл питательной бульонной среды (HiMedia, Индия) в течение 3 дней при 80°C. Каждую бульонную культуру бактерий высевали на свежеприготовленную питательную агаровую среду и 24 часа культивировали при 75°C и 80°C. Бактериальные изоляты отбирались и повторно тестировались на термостойкость при более высокой температуре, 85°C, в течение 3 суток. В итоге, для дальнейшего изучения были отобраны изоляты, которые могли переносить температуру 85°C.

Морфологическая и биохимическая характеристика изолятов. Изучены изоляты термофильных бактерий по различным морфологическим признакам, а именно: цвет, окраска по Граму, форма, образование спор и подвижность.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) выделенных бактерий. Морфологические признаки выделенных штаммов бактерий были дополнительно исследованы методом СЭМ анализа при поддержке института ПВХ "ННЛОТ" КазНУ. Образец для СЭМ готовили путем переноса микробных изолятов в чистую пробирку для микрофугирования, содержащую примерно 1,5 мл 3,5% раствора глутарового альдегида. Затем изоляты промывали фосфатным буфером (100 мм, pH 7,2), следом - изоляты обезвоживали с использованием спиртового градиента от 10 до 95%. Далее обезвоженные образцы высушивались на воздухе и закреплялись на углеродном носителе. Образец покрывали тонким слоем серебра. Подготовленные образцы исследовались под растровым электронным микроскопом - Raster electron microscope Quanta 3D 200i Dual system (FEI Company, USA) SEM.

Проведены биохимические исследования, такие как ферментация сахаров, образование H₂S, окисление Mn и Fe, отношение к кислороду, или аэрации, наличие каталазы и оксидазы по методикам, описанным Прескоттом et al [9-11]. Газообразование определяли на скошенном TSI agare (HiMedia, Индия) [12, 13].

Оценка ферментативной продукции. Скрининг и идентификацию термофильных бактерий, продуцирующих гидролазы, проводили с использованием различных субстратов, таких как карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) - по Рамешу et al [14], картофельный крахмал -

по Бласам et al [15], твин 80 - по Донг-Бу et al [16], и обезжиренное молоко - по Халед et al [17].

Результаты и обсуждение

Из Жаркентского геотермального источника выделено четыре бактериальных изолята, которым были присвоены следующие кодовые названия: AC2S, AC3S, AC4S, AC5S. Два из них были отнесены к грамотрицательным бактериям: AC2S, AC3S; и два изолята AC4S, AC5S были грамположительными.

Проведено физиолого-биохимическое исследование изолятов с помощью различных идентификационных тестов: на каталазу и оксидазу, ферментацию сахаров (глюкозы, сахарозы, лактозы), отношение к кислороду (таблица 1).

Таблица 1- Биохимическая характеристика бактериальных изолятов, полученных из Жаркентского геотермального источника

Биохимические тесты	AC2S	AC3S	AC4S	AC5S
Сероводородный тест	-	-	-	-
Каталаза	+	+	+	+
Оксидаза	+	-	+	-
Гидролиз крахмала	+	+	+	+
Ферментация сахаров				
Глюкоза	+	-	+	+
Сахароза	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	-
Окисление Mn	+	+	-	-
Окисление Fe	-	-	-	-
Облигатный аэроб	-	-	-	-
Факультативный анаэроб	+	+	+	+
Подвижность	+	+	+	+
Образование эндоспор	+	+	+	+
Символы: + указывают на положительный показатель; - отрицательный показатель				

Установлено, что все исследуемые изоляты не относились к облигатным аэробам, не окисляли Fe, показали отрицательный результат на сероводородный тест. Однако положительную реакцию они проявили на каталазную активность, на гидролиз крахмала, на окисление Mn. Кроме того, выявлено, что они сбраживали все испытанные сахара, образовывали оксидазу и были факультативными анаэробами.

Изоляты отличались между собой и по морфологическим характеристикам: колонии бактерий AC4S были окрашены в бело-кремовый цвет, формы и структуры колоний были неправильной формы, а колонии AC2S, AC3S, AC5S были круглыми с ровными краями (таблица 2). У всех бактериальных изолятов изучались ростовые характеристики.

Таблица 2 - Морфология колоний изолятов, выделенных из Жаркентского геотермального источника

Изоляты	Консистенция	Форма	Края	Профиль колоний	Цвет
1	2	3	4	5	6
AC2S	Слизистая, Гладкая	Круглая	Ровные	Плоский	Кремовый
AC3S	Гладкая	Круглая	Рельефные	Плоский	Бело-кремовый
AC4S	Слизистая	Неправильная	Ровные	Выпуклый	Бело-кремовый
AC5S	Слизистая, Гладкая	Круглая	Ровные	Выпуклый	Белый

Морфологические характеристики всех изолятов были исследованы на СЭМ при различных увеличениях от 6,000X до 36,556X.

Сканирующая электронная микрофотография изолятов представлена на рисунке 1.

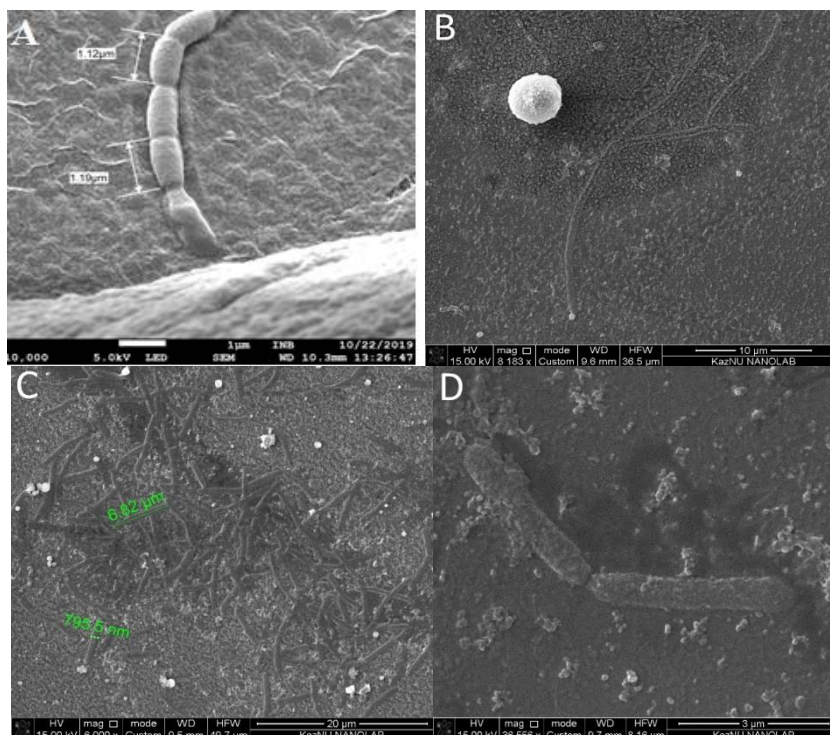


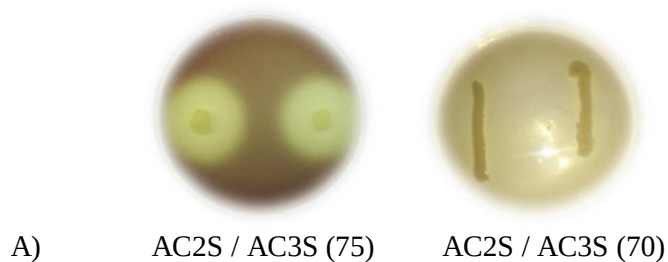
Рисунок 1 - Сканирующая электронная микрофотография изолятов.

А. AC2S В. AC3S (8,183X), С. AC4S (6,000X), D. AC5S (36,556X)

На микрофотографиях видно, что бактериальные изоляты: AC2S, AC3S, AC4S, AC5S имеют палочковидную форму размером 1,8x3,1 x 4,1 -0,6 мкм. При выращивании на обогащенной питательной среде имеют вид толстых и больших палочек, иногда расположенных в цепочках (рисунок 1).

На следующем этапе микробные изоляты подвергались скринингу на термостойкость при различных температурах, начиная с 40°C до 95°C. Для изолятов AC2S, AC3S оптимальная температура роста составляла 75°C, а максимальная и минимальная - 95°C и 45°C. Для изолятов AC4S, AC5S оптимальная температура составляла 85°C, а максимальная и минимальная - 95°C и 40°C.

Затем бактериальные изоляты подвергались скринингу на амилазную, протеазную, липазную и целлюлазную активность (рисунок 2).



А)

AC2S / AC3S (75)

AC2S / AC3S (70)

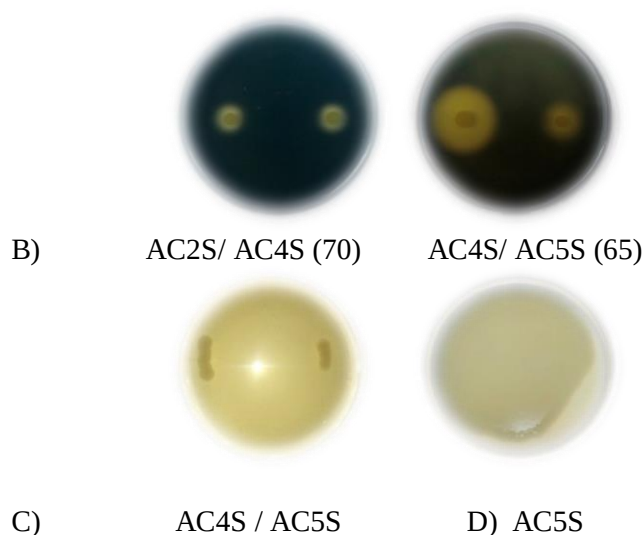


Рисунок 2 - Ферментативная активность изолятов, выделенных из Жаркентского геотермального горячего источника. А) целлюлазная активность, В) амилазная активность, С) липазная активность, D) протеазная активность.

Оценка результатов проводилась по определению диаметра зон гидролиза субстратов (рисунок 2).

Как видно из таблицы 3, три изолята (AC2S; AC4S; AC5S) производили амилазу при 75°C, причём AC2S и AC4S проявляли амилазную активность на 52-54% больше, чем штамм AC5S при 75°C, однако при 80°C изолят AC5S проявляет амилазную и целлюлазную активности больше, чем на 75% при 75°C. Другие два изолята (AC3S; AC4S) продуцировали протеазу при 75°C, однако при 80°C у этих изолятов отсутствовала протеазная активность.

Кроме того, низкую протеазную активность при 75°C проявляли AC2S и AC4S, а при 80 °C и 85 °C у всех изолятов протеазной активности не наблюдалось, у изолята AC2S при 75°C наблюдалась липазная активность, тогда как при других температурных режимах липаза не производилась.

В результате анализа данных, представленных в таблице 3, можно сделать вывод о том, что при оптимальном температурном режиме, 75°C, изолят AC2S может производить одновременно 3 различных биокатализатора, такие как: целлюлаза, амилаза и липаза.

Такое же количество термозимов (целлюлаза, амилаза и протеаза) при 75°C может выделять и изолят AC4S, однако при 80°C этот изолят производит со средней активностью только два фермента - целлюлазу и амилазу, напротив, высокую активность к этим ферментам при таком температурном режиме может проявлять изолят AC5S.

Таблица 3 – Зона гидролиза субстратов (мм) в зависимости от температурного режима (°C)

Изоляты	Температура роста, °C	Целлюлаза	Амилаза	Протеаза	Липаза
1	2	3	4	5	6
AC2S	75	39±7	16±2	-	23±3
AC3S	75	-	-	5±1	-
AC4S	75	25±2	18±2	7±1	-
AC5S	75	9±1	7±1	-	-
AC2S	80	-	-	-	-
AC3S	80	-	-	-	-
AC4S	80	20±2	15±2	-	-
AC5S	80	35±2	28±1	-	-
AC2S	85	-	-	-	-

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
AC3S	85	-	-	-	-
AC4S	85	-	-	-	-
AC5S	85	-	-	-	-
Символы: (–) отсутствие активности.					

Таким образом, в проведенных исследованиях получены потенциальные промышленно-ценные изоляты термофильных бактерий, которые могут быть продуцентами термозимов для биотехнологии.

Заключение

Исследование показало, что Жаркентские горячие источники являются богатым источником ценных термофильных микроорганизмов - продуцентов промышленно важных ферментов, термозимов, для использования их в различных промышленных и биотехнологических процессах.

Финансирование

Проведенное исследование финансируется Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (№ гранта AP14871683 «Биотехнология переработки кератиновых побочных продуктов с помощью иммобилизованных термофильных бактерий»).

Литература:

- Colletier J.P., Aleksandrov A., Coquelle N., Mraihi S., Mendoza-Barbera E., Field M., Madern D. (2012) Sampling the conformational energy landscape of a hyperthermophilic protein by engineering key substitutions. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 29, no. 6, pp. 1683–1694.
- Tehei M., Madern D., Franzetti B., Zaccai G., (2005) Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 49, pp. 40974–40979.
- Liszka M.J., Clark M.E., Schneider E., Clark D.S. (2012) Nature versus nurture: Developing enzymes that function under extreme conditions. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 3, pp. 77–102.
- Adrio J.L., Demain A.L. (2014) Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, vol. 4, pp. 117–139.
- Binod P., Palkhiwala P., Gaikawari R., Nampoothiri K.M., Duggal A., Dey K., Pandey A. (2013) Industrial enzymes—Present status and future perspectives for India. *J. Sci. Ind. Res. India*, vol. 72, no. 5, pp. 271–286.
- Pikuta, E.V., Hoover, R.B., Tang, J. (2007) Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 33, pp. 183–209.
- Kumar L., Awasthi G., Singh B. (2011) Extremophiles: A novel source of industrially important enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. no. 2, 10, pp. 1–15.
- Мендебаев Т.Н. Геотермальная энергетика. Ресурсы в Казахстане и технологическая схема их освоения // Новости науки Казахстана. – 2017. – №3. – С. 57-67.
- Prescott L. M., Harley G. P., and Klein D. E. (1993) Microbiology. W. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, USA. vol. 2, pp. 588-591.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. and. Staley J.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Nineteenth edition, Williams and wilkins company, Baltimore, MD, USA, pp: 255-273.
- Murray, Baron, Jorgenson, Landry and Pfaller. (2007) Manual of clinical microbiology. American society for microbiology, Washington, Dc, no 9, pp.1-10
- Harley J.P. and Prescott L.M. (2002) Laboratory Exercise in Microbiology 5th ed, The McGraw–Hill Companies, pp. 1-466.
- Sharma K. (2007) Manual of Microbiology: Tools and Techniques. 2nd ed. Ane Books India, New Delhi. ISBN(10): 81-8052-143-5.
- Ramesh Ch. K., Richa S. et al. (2008) Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol.* vol. 57, no. 10, pp.503-507.

15 Blasam T. M., Hala I., Al D., Atef J., Saleh AL., Christian K. (2017) Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *Inter. J. of Microbiology*. pp. 1-12.

16 Dong-Woo L., You-Seok K., Ki-Jun K., et al. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 179, pp. 393 – 400.

17 Khaled E. El-Gayar, Mohamed A., Al Abboud and Ashraf M. M. Essa. (2017) Characterization of Thermophilic Bacteria Isolated from two Hot Springs in Jazan, Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol.11, no. 2, pp. 1-10.

А.Ж.ІЗМҰҚАН¹, А.С. КИСТАУБАЕВА¹, А.С. МАШЖАН¹, Н. БИРКЕЛАНД²,
И.С. САВИЦКАЯ¹

¹әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

²Берген Университеті, Берген, Норвегия

*e-mail: izmukan@mail.ru

ЖАРКЕНТ ГЕОТЕРМАЛДЫҚ СУЫНАН БӨЛІНГЕН ТЕРМОЗИМДЕР- ПРОДУЦЕНТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Түйін

Зерттеу нысандары ретінде Алматы облысының Жаркент ыстық бұлақтарында мекендейтін термофильді бактериялар қолданды. Бұл микроорганизмдердің экстремалды жағдайларда тіршілікке бейімделуін олардың биотехнологиялық процестер үшін әлеуетін көрсетеді. Оңтайлы өсу температурасы 75°C және 85°C болатын төрт бактериялық изолят бөлінді. Төрт бактериялық изолят морфологиялық, микроскопиялық, биохимиялық көрсеткіштермен сипатталды. Алынған барлық изоляттар амилаза, протеаза, липаза және целлюлоза белсенділігіне скринингтен өтті. Алынған изоляттар морфологиялық, биохимиялық және физиологиялық сипаттамалары бойынша *Bacillus sp* ретінде алдын ала анықталды.

Кілтті сөздер: термозимдер, геотермальды көздер, изолят.

IRSTI: 34.27.23

A.Zh. IZMUKAN^{1*}, A.S. KISTAUBAYEVA¹, A.S. MASHZHAN¹, N. BIRKELAND²,
I.S. SAVITSKAYA¹

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²University of Bergen, Bergen, Norway

*e-mail: izmukan@mail.ru

THE STUDY OF THERMOZYME-PRODUCERS ISOLATED FROM ZHARKENT GEOTHERMAL HOT SPRING

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.08

Abstract

The objects of the study were thermophilic bacteria living in the hot springs of Zharkent in the Almaty region. The ability of these microorganisms to maintain vital activity in extreme conditions demonstrates their potential for biotechnological processes. Four bacterial isolates were isolated, with an optimal growth temperature of 75°C and 85°C. Four bacterial isolates were characterized by morphological, microscopic, and biochemical parameters. All obtained isolates were screened for amylase, protease, lipase and cellulase activity. The obtained isolates were preliminarily identified as *Bacillus sp.* according to morphological, biochemical and physiological characteristics.

Keywords: thermozymes, geothermal sources, isolate.

Thermophilic bacteria are one of the most extensive and actively studied groups of extremophilic microorganisms [1-3]. Thermophilic and hyperthermophilic microorganisms are interesting for biotechnology, mainly as producers of highly specific thermostable enzymes.

The enzymes produced by them, the so-called thermozymes, have several biotechnological advantages: high stability of enzymatic reactions at high temperatures, resistance to high substrate concentrations due to a decrease in the viscosity of the solution and an increase in diffusion coefficients. Thermostable enzymes often have increased resistance to denaturing agents [2]. The use of enzymatic hydrolysis in the industry is due to the strict specificity and directed action of enzymes, and, accordingly, the possibility of controlling the process of transformation of substances and obtaining a pure target product at the output. In addition, the hydrolysis process is carried out at a temperature of 70-80°C. This, on the one hand, prevents the development of pathogenic bacteria that may be present in raw materials for processing. On the other hand, at this temperature, there is no destruction of essential amino acids [4, 5].

The constant search for new thermophilic prokaryotes is carried out to find bacteria with biotechnologically attractive properties. Thus, the search for new thermophilic hydrolytic bacteria remains an urgent research problem from a scientific and applied point of view [6, 7].

In this regard, we have formed a unique collection of aerobic and anaerobic thermophilic bacteria isolated from the thermal spring of the Almaty region of the Zharkent geothermal hot spring located at 43°97'14.93" N, 79°66'12.09"E, 273 km from the city of Almaty [8].

The study aimed to isolate thermophilic bacteria from the geothermal hot spring of the Almaty region and determine the heat resistance of the isolates, as well as to screen and obtain isolates with a wide spectrum of hydrolase activity.

Materials and methods

Place of research and collection of samples. Zharkent geothermal hot spring is located at 43°97'14.93" N, 79°66'12.09" E, 273 km from the city of Almaty, near Zharkent city, and 80 km away from the border with China. Several wells are located within the Zharkent, in the depressions of the Zharkunak tract. The Zharkunak underground water deposit is the central part of the Zharkent geothermal source, including well No. 5539 (1-RT). All wells are located within the land use territory of LLP "Bayserek-Agro" [8].

The chemical composition of well No. 5539 is characterized as a weakly mineralized alkaline, moderately radon, siliceous mainly chloride-bicarbonate-sodium composition with a high concentration of fluorine content. The characteristic features of this water are weak mineralization (up to 1.0 g/dm³), alkaline reaction (pH 8.1–9.0), high fluorine content (up to 10 mg/dm³), the balneological active concentration of silicic acid (over 50 mg/dm³), the presence of radon in concentrations up to 60 nCi/l, characteristic of moderately radon waters [8].

Isolation of bacteria. Samples were taken in Falcon tubes with a volume of 15 ml. Samples of water and precipitation were taken from hot springs, filling the entire volume of the tube without air voids. Before sampling, the temperature and pH values of the medium were determined in the sources.

A water sample was introduced into a meat-peptone broth (HiMedia, India) at 80°C, and for 3 days the enriched culture was sown on nutrient agar (HiMedia, India) to obtain individual colonies. All bacterial isolates obtained on Petri dishes were selected and purified by the streak plate method. The isolates were determined to be pure after microscopy of the culture colonies.

Determination of thermal stability. To study the thermophilic characteristics, each bacterial isolate was inoculated in 10 ml of nutrient broth medium (HiMedia, India) and incubated for 3 days at 80°C. Each broth culture of bacteria was sown on a freshly prepared nutrient agar medium and cultured at 75°C and 80°C for 24 hours. Bacterial isolates growing in Petri dishes were selected and retested for heat resistance at a higher temperature of 85°C for 3 days. As a result, isolates that could tolerate a temperature of 85°C were selected for further study.

Metabolic and biochemical characteristics of isolates. Isolates of thermophilic bacteria have been studied according to various morphological characteristics, like colour, Gram staining, shape, spore formation, and mobility.

Scanning electron microscopy (SEM) of isolated bacteria. Morphological features of the isolated bacterial strains were further investigated by the SEM analysis method with the support of the SSE "NNLOT" KazNU Institute. The sample for SEM was prepared by transferring microbial isolates into a clean microfugation tube containing approximately 1.5 ml of 3.5% glutaraldehyde solution. Then the isolates were washed with a phosphate buffer (100 mm, pH 7.2). After the isolates are dehydrated using an alcohol gradient from 10 to 95%. Then the dehydrated samples were dried in air and fixed on a carbon carrier. The samples were coated with a thin layer of silver. These samples were then observed under a scanning electron microscope - Raster electron microscope Quanta 3D 200i Dual system (FEI Company, USA) SEM.

Various biochemical studies have been carried out, such as the fermentation of sugars, the H₂S formation, the oxidation of Mn and Fe, obligate aerobes, facultative anaerobes, and the presence of catalase and oxidase enzymes investigated by the methods described by Prescott et al. [9-11]. The gas formation was determined using a TSI slant agar (HiMedia, India) [12, 13].

Evaluation of enzymatic products. Screening and identification of thermophilic bacteria producing hydrolase were carried out using various carbon sources, such as carboxymethyl cellulose (CMC) according to Ramesh et al. [14], potato starch according to Blasam et al. [15], twin 80 according to Dong-Woo et al. [16], and skimmed milk according to Khaled et al. [17].

Results and discussion

Four bacterial isolates were isolated from the Zharkent geothermal source, which was assigned the following code names: AC2S, AC3S, AC4S, and AC5S. Two of them were classified as Gram-negative bacteria: AC2, AC3S; and two isolates AC4S, and AC5S were Gram-positive.

Further, a physiological and biochemical study of the isolates was carried out using various identification tests: for catalase and oxidase, fermentation of sugars (glucose, sucrose, lactose), and oxygen ratio (Table 1).

Table 1- Biochemical characteristics of bacterial isolates obtained from the Zharkent geothermal source

Biochemical tests	AC2S	AC3S	AC4S	AC5S
Hydrogen sulfide test	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	-	+	-
Starch hydrolysis	+	+	+	+
Fermentation of sugars				
Glucose	+	-	+	+
Sucrose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Oxidation of Mn	+	+	-	-
Oxidation of Fe	-	-	-	-
Obligate aerobe	-	-	-	-
Facultative anaerobe	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+
Formation of endospores	+	+	+	+
Symbols: + indicate a positive indicator; - negative indicator				

The studied isolates showed negative results on the hydrogen sulfide test, were not obligate aerobes and did not oxidize Fe. However, they showed a positive reaction to catalase activity, starch hydrolysis, and Mn oxidation. In addition, they showed good enzyme reactions to sugars, and oxidase and were facultative anaerobes.

The obtained isolates differed among themselves in morphological characteristics: the colonies of AC4S bacteria were coloured white-cream, the shapes and structures of the colonies

were irregular, and the colonies of AC2S, AC3S, AC5S were round with even edges (Table 2). Growth characteristics were studied in all bacterial isolates.

Table 2 - Morphology of colonies of four isolates isolated from the Zharkent geothermal source

Isolates	Consistency	Form	Edges	Colony type	Color
AC2S	Slimy, Smooth	Round	Smooth	Flat	Creamy
AC3S	Smooth	Round	Wavy	Flat	White and creamy
AC4S	Slimy	Irregular	Smooth	Convex	White and creamy
AC5S	Slimy, Smooth	Round	Smooth	Convex	White

Further, the morphological characteristics of all isolates were studied on SEM at various magnifications from 6,000X to 36,556X.

Scanning electron micrography of isolates is shown in Fig. 1.

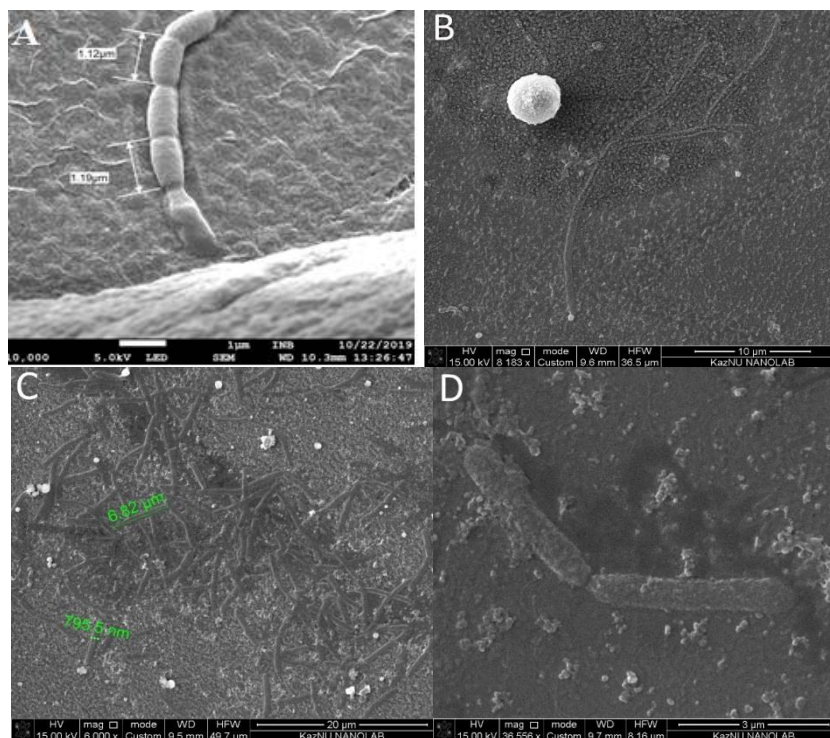


Figure 1 - Scanning electron micrography of isolates.

A. AC2S B. AC3S (8,183X), C. AC4S (6,000X), D. AC5S (36,556X)

Microphotographs showed that bacterial isolates: AC2S, A3S, AC4S, and AC5S had a rod-shaped shape with a size of $1.8 \times 3.1 \times 4.1 - 0.6$ microns. When grown on an enriched medium, they look like thick and large sticks, sometimes arranged in chains (Fig. 1).

At the next stage, microbial isolates were screened for heat resistance at various temperatures ranging from 40°C to 95°C . For AC2S and AC3S isolates, the optimal growth temperature was 75°C , and the maximum and minimum were 95°C and 45°C . For AC4S and AC5S isolates, the optimal temperature was 85°C , and the maximum and minimum were 95°C and 40°C .

Then bacterial isolates isolated from the hot spring were screened for amylase, protease, lipase and cellulase activity (Fig.2).

Isolates were screened for the content of enzymes. 4 isolated microorganisms were tested for the presence of secreted cellulase, amylase, protease and lipase. The results were evaluated by determining the diameter of the hydrolysis zones of the substrates shown in Figure 2.

Among the four identified isolates, at least two extracellular hydrolyzed enzymes were produced by each isolate (Table 3).

As can be seen from Table 3, three isolates (AC2S; AC4S; AC5S) produced amylase at 75°C, and AC2S and AC4S showed amylase activity by 52-54% more than the AC5S strain at 75°C, however, at 80°C, the AC5S isolate shows amylase and cellulase activity by more than 75% at 75°C. The other two isolates (AC3S; AC4S) produced protease at 75°C, but at 80°C these isolates had no protease activity.

In addition, low protease activity at 75°C showed AC2S and AC4S, and at 80°C and 85°C, protease activity was not observed in all isolates, and lipase activity was observed in AC2S isolate at 75°C at other temperature conditions, lipase was not produced.

As a result of the analysis of the data presented in Table 3, it can be concluded that at an optimal temperature regime of 75°C with AC2S isolates, it can simultaneously produce 3 different biocatalysts, such as cellulase, amylase and lipase.

The same number of enzymes (cellulase, amylase and protease) at 75°C can also secrete AC4S isolate, but at 80°C this isolate can produce only two enzymes with average activity cellulase and amylase, on the contrary, AC5S isolate can show high activity to these enzymes at this temperature regime.

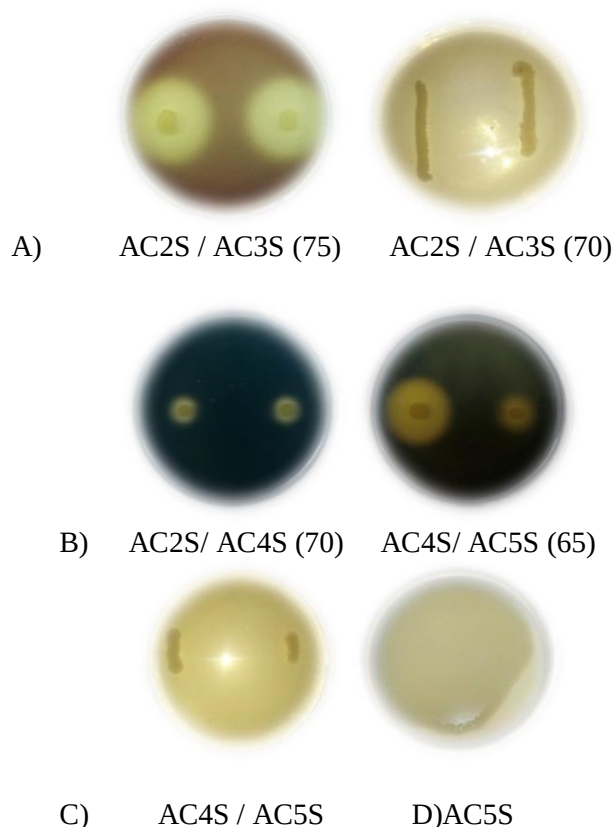


Figure 2 - Enzymatic activity of isolates obtained from the Zharkent geothermal hot spring.

A) cellulase activity, B) amylase activity, C) lipase activity, D) protease activity.

Table 3- The zone of hydrolysis of substrates (mm) depending on the temperature regime (° C)

Isolates	Optimal temperature	Cellulase	Amylase	Protease	Lipase
AC2S	75	39±7	16±2	-	23±3
AC3S	75	-	-	5±1	-
AC4S	75	25±2	18±2	7±1	-
AC5S	75	9±1	7±1	-	-
AC2S	80	-	-	-	-
AC3S	80	-	-	-	-
AC4S	80	20±2	15±2	-	-
AC5S	80	35±2	28±1	-	-
AC2S	85	-	-	-	-
AC3S	85	-	-	-	-
AC4S	85	-	-	-	-
AC5S	85	-	-	-	-
Symbols: (-) No activity.					

Thus, in our research, we have obtained potential industrially valuable isolates of thermophilic bacteria that may be attractive for biotechnology.

Conclusion

The study showed that the Zharkent hot springs are a rich source of many thermophilic microorganisms and should be investigated to obtain industrially important enzymes. These isolates can be used in various extreme industrial and biotechnological processes after studying and cloning their genes.

Funding

This research has been funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP14871683 «Biotechnology of processing keratin by-products using immobilized thermophilic bacteria»).

Conflict of interest

The authors state that they have no conflict of interest.

References:

- 1 Colletier J.P., Aleksandrov A., Coquelle N., Mraihi S., Mendoza-Barbera E., Field M., Madern D. (2012) Sampling the conformational energy landscape of a hyperthermophilic protein by engineering key substitutions. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 29, no. 6, pp. 1683–1694.
- 2 Tehei M., Madern D., Franzetti B., Zaccari G., (2005) Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 49, pp. 40974–40979.
- 3 Liszka M.J., Clark M.E., Schneider E., Clark D.S. (2012) Nature versus nurture: Developing enzymes that function under extreme conditions. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 3, pp. 77–102.
- 4 Adrio J.L., Demain A.L. (2014) Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, vol. 4, pp. 117–139.
- 5 Binod P., Palkhiwala P., Gaikaniwari R., Nampoothiri K.M., Duggal A., Dey K., Pandey A. (2013) Industrial enzymes—Present status and future perspectives for India. *J. Sci. Ind. Res. India*, vol. 72, no. 5, pp. 271–286.
- 6 Pikuta, E.V., Hoover, R.B., Tang, J. (2007) Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 33, pp. 183–209.
- 7 Kumar L., Awasthi G., Singh B. (2011) Extremophiles: A novel source of industrially important enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. no. 2, 10, pp. 1–15.
- 8 Mendibaev T.N. (2017) Geotermalnaja energija. Resursi v Kazakhstane i texnologijeskaja sxema ix osvoenie. *Novosti nayki Kazakhstana*. vol. 3, pp. 57-67.

- 9 Prescott L. M., Harley G. P., and Klein D. E. (1993) Microbiology. W. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, USA. vol. 2, pp. 588-591.
- 10 Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. and Staley J.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Nineteenth edition, Williams and Wilkins company, Baltimore, MD, USA, pp: 255-273.
- 11 Murray, Baron, Jorgenson, Landry and Pfaller. (2007) Manual of clinical microbiology. American society for microbiology, Washington, Dc, no 9, pp.1-10
- 12 Harley J.P. and Prescott L.M. (2002) Laboratory Exercise in Microbiology 5th ed, The McGraw-Hill Companies, pp. 1-466.
- 13 Sharma K. (2007) Manual of Microbiology: Tools and Techniques. 2nd ed. Ane Books India, New Delhi. ISBN(10): 81-8052-143-5.
- 14 Ramesh Ch. K., Richa S. et al. (2008) Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol.* vol. 57, no. 10, pp.503-507.
- 15 Blasam T. M., Hala I., Al D., Atef J., Saleh AL., Christian K. (2017) Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *Inter. J. of Microbiology.* pp. 1-12.
- 16 Dong-Woo L., You-Seok K., Ki-Jun K., et al. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 179, pp. 393 – 400.
- 17 Khaled E. El-Gayar, Mohamed A., Al Abboud and Ashraf M. M. Essa. (2017) Characterization of Thermophilic Bacteria Isolated from two Hot Springs in Jazan, Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol.11, no. 2, pp. 1-10.