

УДК [579.262+579.25+551.23] (724.4)

Б. НОРЬЕГА-ЛУНА,

Відділ цивільної інженерії, Університет Гуанахуато,
СР 36000, Мексика
berenice.noriega@ugto.mx

М.Й. ПУЙ-АЛЬКІЗА,

Відділ видобутку, металургії і геології, Університет Гуанахуато,
СР 36000, Мексика
yosune.puy155@gmail.com

А.Я. ВАСКЕС-ЛАРА,

Відділ цивільної інженерії, Університет Гуанахуато,
СР 36000, Мексика
americav399@gmail.com

М.М. САЛАЗАР-ЕРНАНДЕС,

Відділ видобутку, металургії і геології, Університет Гуанахуато,
СР 36000, Мексика
merceditas1103@gmail.com

А.Г. СЕРАФІН-МУНЬЙОС,

Відділ цивільної інженерії, Університет Гуанахуато,
СР 36000, Мексика
sermuah@ugto.mx

Р. МІРАНДА-АВІЛЕС,

Відділ видобутку, металургії і геології, Університет Гуанахуато,
СР 36000, Мексика
rmiranda@ugto.mx

Ж. КАРЕНЬО-АГІЛЕРА,

Відділ геоматики і гідравлики, Університет Гуанахуато,
СР 36000, Мексика
gilcarreno@gmail.com

ВИДІЛЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕРМОФІЛЬНИХ БАКТЕРІЙ МІКРОБНИХ МАТІВ З ГЕОТЕРМАЛЬНОЇ ЗОНИ КОМАНХІЛЬЯ, МЕКСИКА

У статті розглянуто фенотипічну і генотипічну характеристику бактерій, виділених з геотермальної зони Команхілья (Гуанахуато, Мексика). Досліджені термальні води класифіковані як гіпертермальні, глибокого залягання, низькомінералізовані. Продуктивність мікробіальних матів у термальних водах становить 1 т/40 м² за 15 діб. Мати складаються з кількох стратифікованих шарів зеленого і

Ц и т у в а н н я: Норьєга-Луна Б., Пуй-Алькіза М.Й., Васкес-Лара А.Я., Салазар-Ернандес М.М., Серафін-Муньйос А.Г., Міранда-Авілес Р., Кареньо-Агілера Ж. Виділення і характеристики термофільних бактерій з мікробних матів з геотермальної зони Команхілья, Мексика. *Гідробіол. журн.* 2021. Т. 57, № 2. С. 40—52.

помаранчевого кольору площею близько 100 см², у кожному домінують специфічні групи, наприклад діатомові або синьозелені водорості, але переважно бактерії. За морфологічними, мікроскопічними, біохімічними, молекулярними і фізіологічними характеристиками виділено вісім ізолятів. Секвенування 16S рДНК ізолятів виявило, що два штами можуть бути визначені як *Bacillus licheniformis*. Аналіз послідовностей BLAST показав найбільшу схожість (97—99%) з *Bacillus*. Тобто, очевидне домінування бактерій р. *Bacillus*, представленого *Brevibacillus agri* і *Paenibacillus* sp. Ізоляти здатні виробляти деякі термостабільні ферменти, такі, як амілаза, ліпаза, протеаза, що широко застосовуються у виробництві продуктів харчування, косметичній і фармацевтичній промисловості. Видовий склад термофільних бактерій геотермальної зони Команхілья характерний для центральної частини Мексики. Це перше дослідження цих мікроорганізмів регіону, яке має важливе значення з точки зору біотехнології і виробництва, зокрема у сільськогосподарській, харчовій і фармацевтичній галузі. У той же час дослідження термофільних бактерій як функціональної одиниці сприятиме кращому розумінню механізмів адаптації до існування у зоні впливу термальних вод.

Ключові слова: термофільні бактерії, геотермальна зона Команхілья, термостабільні ферменти.

Термальні води являють собою екстремальне середовище, де, незважаючи на високі температури, існує багато живих організмів. За відношенням до температури мікроорганізми можуть бути поділені на чотири групи: психрофіли (холодолюбні), мезофіли, термофіли і гіпертермофіли [12]. У свою чергу термофіли поділяються на три підгрупи залежно від оптимальної для їх росту температури: помірні (50—60 °С), екстремальні (60—80 °С) і гіпертермофіли (80—110 °С). Термофільні бактерії знаходять у гарячих джерелах, у районах глибоководних гідротермальних викидів, або інших місцях з підвищеною температурою [20].

Термофільні бацити краще ростуть при температурі 45—70 °С, вони можуть бути виділені з різних середовищ, наприклад з постійно холодних глибоководних, мілководних морських гарячих джерел і глибоководних геотермальних викидів [2]. Перші дослідження термофільних бактерій, що ростуть при температурі 70 °С, були проведені ще у 1888 р. [14]. Нові термофільні бактерії ізолювані і досліджені у різних країнах світу: Саудівській Аравії [7], США (Йелоустонський національний парк) [3], Китаї [11], Індії [21], Туреччині [1], Болгарії [6], Італії [19], Ісландії [13], Греції [23]. Наразі термофільні бактерії привертають все більшу увагу дослідників завдяки важливості використання як джерела термостабільних ферментів (амілази, целюлази, хітинази, пектинази, ксиланази, протеази, ліпази і ДНК-полімерази) для різних сфер застосування, зокрема виробництва продуктів харчування і харчових добавок, біомедичних досліджень, хімічної промисловості [17].

Геотермальна зона Команхілья розташована на віддалі 32 кілометрів від м. Гуанахуато, Мексика (21°09' N, 101°53' W). Інтерес до досліджень термофільних бактерій мікробіальних матів термальних вод спричинений відсутністю мікробіологічних досліджень цієї території. Метою роботи було розпочати роботи з виділення і характеристики нових екстре-

мально термофільних мікроорганізмів, що можуть мати високий біотехнологічний та екологічний потенціал.

Матеріал і методика досліджень¹

Одне скупчення гарячих джерел геотермальної зони Команхілья досліджували з лютого 2017 р. до березня 2018 р.

Відбір бактеріальних матів і виділення штамів. Поверхня мікробіальних матів нагадує зеленувату кірку драглистого виду. Вони складаються з двох шарів помаранчевого і зеленого забарвлення, що утворюють мат товщиною до 5 мм.

З кожного мата асептично відбирали по дві проби, кожену в окрему посудину. Проби поміщали у термоконтейнери при температурі 4—10 °С і доставляли у лабораторію. У лабораторії проби були поміщені у живильне середовище при температурі 55 °С для збагачення. Через добу вони були висіяні на агаризоване середовище і інкубовані 12—48 год в аеробному інкубаторі при тій же температурі для отримання окремих колоній. Після інкубації колонії, що розвивались на соєвому трипсиновому бульйоні, були відібрані і очищені шляхом пересівання. Поживний агар і соєвий трипсиновий бульйон були використані тому, що повідомлялось про ріст термофільних мікроорганізмів саме на цих середовищах. Кожен ізолят був охарактеризований за кольором, консистенцією, висотою, формою і характером країв колонії, її прозорістю, здатністю до гемолізу із застосуванням 5%-го кров'яного агару.

Фізичні характеристики води і мікробіальних матів. Фізичні властивості води (температура, рН, електропровідність, сухий залишок і твердість) і бактеріальних матів були встановлені на місці. Температуру вимірювали ртутним термометром з точністю 1 °С, рН — потенціометром Corning 610 A. Електропровідність встановлювали за допомогою приладу 850037 SPER SCIENTIFIC, сухий залишок — TDS PURIKOR PK-TDS3, твердість води розраховували за вмістом солей кальцію і магнію.

Хімічний аналіз води і мікробіальних матів. Вміст металів встановлювали методом ICP-MS (аналізи проведені лабораторією CINESTAV, м. Керетаро). У всіх зібраних пробах встановлювали концентрацію хлоридів, бікарбонатів, сульфатів, кальцію, магнію, натрію, калію, марганцю, алюмінію, хрому, міді, заліза, сірки, кадмію, нікелю, олова, свинцю і кремнію.

Морфологічні і біохімічні властивості ізолятів. Морфологію клітин вибраних штамів досліджували за допомогою світлового мікроскопа (Olympus BX40), обладнаного цифровою фотокамерою (Olympus BX40) після фарбування клітин за Грамом. Біохімічні характеристики ізолятів досліджували за методами, описаними у [4, 8, 9], за наступними показниками: каталаза, оксидаза, амілаза, лецитиназа, ліпаза, протеаза, розрід-

¹ Автори висловлюють подяку Maytee Corona і Jesus Rene Baez Espinosa за технічну допомогу. Спеціальна подяка лабораторії StrainBiotech laboratory за генотипічний опис і філогенетичний аналіз проб. Також висловлюємо подяку Вченій раді Університету Гуанахуато за фінансування цих досліджень.

ження желатину, нітрат-редукція, реакція Фогеса-Проскауера, ферментація маннітолу і ферментація лактози. Всі дослідження проведені при 37 °С.

Ампліфікація і секвенування 16S рДНК. ДНК була екстрагована з рідких культур бактерій за методом Вільсона [25]. Фрагменти рибосомальної 16S ДНК були ампліфіковані із застосуванням універсального праймера 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') і праймера 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'). Умови ПЛР були наступними: денатурація при 95 °С 10 хв, після цього 35 циклів при 95 °С 40 сек, при 55 °С — 45 сек, 72 °С — 90 сек і завершальна елонгація — 7 хв при 72 °С. Коли розмір фрагментів було підтверджено у 1%-ному агарозному гелі, ампліфіковані продукти очищені згідно з рекомендаціями виробника набору Jena Bioscience. Для кожного зразка було проведено пряму і зворотну реакції секвенування, для чого застосовували капілярну технологію за методом Сангера. Результати секвенування спочатку були візуалізовані у вигляді електрофореграм для отримання файлів FASTA для програми FinchTV, узгодження прямого і зворотного секвенування у єдину послідовність проведено за допомогою програмного продукту BioEdit. Після цього отримані узгоджені послідовності були проаналізовані за допомогою алгоритму BLAST для пошуку гомологічних послідовностей. Філогенетичне дерево побудоване на підставі аналізу матриці відстаней із застосуванням NTsystem.

Результати досліджень

Характеристика досліджених створів. Температура досліджених джерел була у межах 45—92 °С, середовище від нейтрального до слабколужного (рН 7,6—9,1), вони мали близьку електропровідність і вміст твердого залишку (табл. 1).

За хімічним складом гарячі джерела належать до сірчано-натрієво-хлоридного типу, оскільки вміст розчиненого сірководню перевищував 1 мг/л, що надавало воді запаху зіпсованих яєць. У цих водах відмічений низький вміст Ca²⁺ і високий вміст Mg²⁺, Si, Cu, and Cl⁻, що вказує на глибоке залягання. Вміст хлоридів становив 19,4—20,0 мг/дм³, що може викликати корозійні процеси, у той же час вміст сірки варіював у межах 24,2—25,0 мг/дм³. У всіх пробах відмічені слідові кількості Si і Cu, що сприятливе для здоров'я людини (табл. 2).

Таблиця 1

Фізичні характеристики гарячих джерел геотермальної зони Команхілья

Показники	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
T, EC	78—92	45—69	78—92	78—92	78—92	45—69	78—92	78—92
pH	9,1	7,6	9,1	9,1	9,1	7,6	9,1	9,1
EC (μS/cm)	698	658	698	698	698	658	698	698
TDS (мг/л)	314	324	314	314	314	324	314	314

Морфологічне і біохімічне дослідження ізолятів. Колонії, вирощені з ізолятів, мали різний колір, консистенцію, висоту, характер кромки і форму. Вони мали кремове, помаранчеве або біле забарвлення; були м'які або цупкі; пласкі або опуклі; з цільною або хвилястою кромкою; правильною або неправильною форми; непрозорими або напівпрозорими (рис. 1). Деякі колонії були вкриті дрібними зморшками і прилипали до поверхні агару. На 5%-му кров'яному агарі вони показували альфа- або бета-гемолітичну активність. За результатами фарбування всі вони виявились грам-позитивними (табл. 3).

За допомогою мікроскопії виявлені палички довжиною 0,5 мкм (рис. 2). Результати біохімічних аналізів показали, що всі ізоляти були Грам- і каталазо-позитивними, і негативними стосовно ферментації лактози, розрідження желатину і реакції Фогеса-Проскауера (табл. 4).

Таблиця 2

Хімічний склад (мг/л) гарячих джерел геотермальної зони Команхілья

Елементи	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	ВООЗ	НТП
Cr	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	0,05	0,05
Ni	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	—	—
Al ³⁺	238	247	238	247	238	238	247	247	—	0,20
Mn ²⁺	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	0,5	0,15
Cu	2,5	2,9	2,5	2,9	2,6	2,7	2,7	2,9	1,5	2,00
Na ⁺	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	—	200,00
As	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	0,05	0,05
Pb	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	0,10— 0,3	0,025
Cd	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	0,01	0,005
Ca ⁺	19,7	20,0	19,7	20,0	21,0	20,0	19,7	21,0	150,0	—
Mg ⁺²	112	110	112	109	110	112	110	112	15,0	5,00
Fe	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	нв	—	0,3
K ⁺	18,1	30,8	18,1	30,8	30,8	18,1	18,1	30,8	—	—
S	25,6	24,2	25,6	25,6	24,2	25,6	25,6	25,6	—	—
Cl ⁻	20	19,4	20	19,4	19,4	20	20	20	—	0,2— 1,50
Si	261	307	305	307	265	301	267	30	—	—
HCO ₃ ⁻	134	130	134	130	130	134	134	134	—	—
SO ₄ ⁻²	0,16	0,12	0,16	0,12	0,12	0,16	0,16	0,10	—	—

Примітка. Нв — не визначали. ВООЗ — нормативи Всесвітньої організації охорони здоров'я; НТП — нормативи Національної токсикологічної програми.

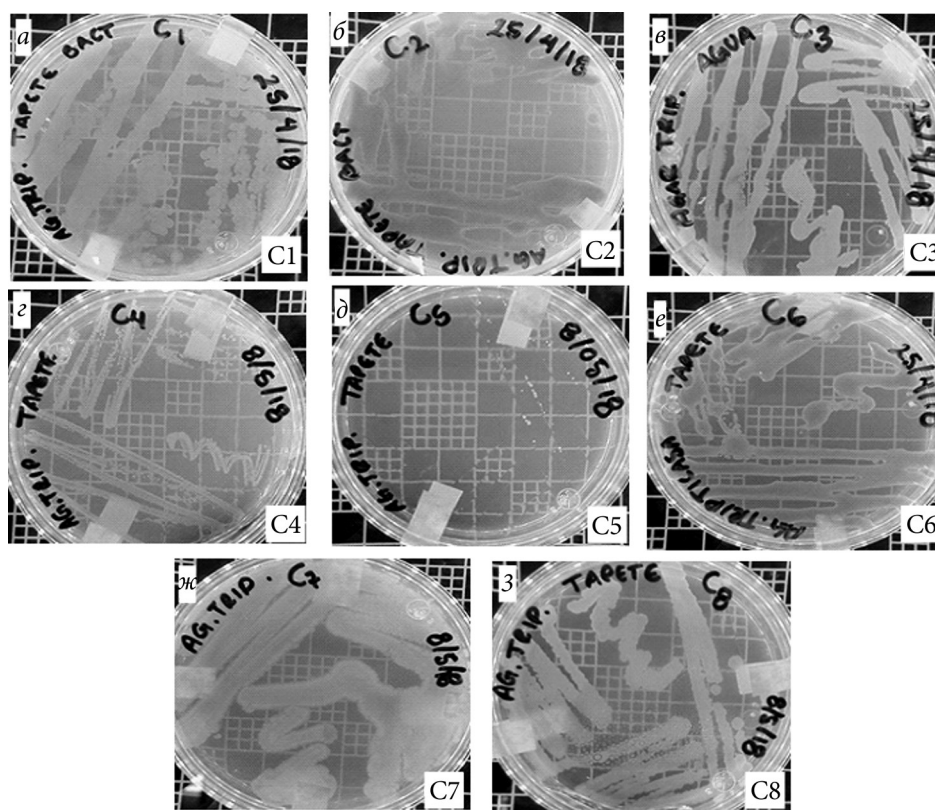


Рис. 1. Зовнішній вигляд колоній ізолятів на триптозному агарі

Молекулярна ідентифікація ізолятів. Секвенування 16S рДНК і філогенетичний аналіз ізолятів C1, C4, і C8, вибраних через їх ферментативну активність, за алгоритмом BLAST, показали подібність між ними на рівні 97—99%. Для встановлення спорідненості трьох бактеріальних ізолятів з геотермальних вод було побудоване філогенетичне дерево. Аналіз 16S рДНК дозволив визначити три штами як *Bacillus licheniformis* з відділу Firmicutes; два бактеріальних ізоляти були визначені як *Brevibacillus agri* (C1 і C8) (рис. 3) і один — як *Paenibacillus* sp. (C4) (рис. 4).

Обговорення результатів досліджень

Води геотермальної зони Команхілья виходять на поверхню з температурою 45—92 °С, тому вважаються термальними. За хімічним складом вони відносяться до H₂S-Na-типу глибокого походження, низької мінералізації з високим вмістом кремнію і низьким — кальцію і магнію. Продукція бактеріальних матів за 15 днів становить 1 тону. Мати складаються з кількох шарів зеленого і помаранчевого забарвлення площею близько 100 см². Хоча геотермальні зони є джерелом цінних бактеріальних матів, біотехнологічному потенціалу термофільних мікроорганізмів зони Команхілья приділяється недостатньо уваги. Термофільні макроорганізми

Таблиця 3
Характеристики колоній бактерій, виділених з мікробіальних магів гарячих джерел геотермальної зони Команхілья

Ізоляти	Характеристики колоній							Бактерії	
	Колір	Консистенція	Висота	Кромка	Форма	Прозорість	Гемоліз	Форма	Грам-
C1	Кремовий, білий	Липка	Пласка	Хвиляста	Правильна	Непрозора	α	Бацilli	+
C2	Помаранчевий	В'язка	Опукла	Хвиляста	Неправильна	Прозора	γ	Коки	+
C3	Кремовий, білий	Липка	Опукла	Хвиляста	Неправильна	Прозора	γ	Бацilli	+
C4	Кремовий, білий	Липка	Опукла	Цільна	Правильна	Прозора	α	Бацilli	+
C5	Білий	Липка	Опукла	Цільна	Правильна	Непрозора	α	Бацilli	+
C6	Помаранчевий	Однорідна	Опукла	Хвиляста	Правильна	Непрозора	γ	Коки	+
C7	Кремовий, білий	Однорідна	Пласка	Хвиляста	Правильна	Прозора	β	Бацilli	+
C8	Кремовий, білий	Однорідна	Пласка	Хвиляста	Неправильна	Непрозора	α	Бацilli	+

здатні пристосовуватись до існування в екстремальних умовах, ймовірно завдяки молекулярним модифікаціям на клітинному і субклітинному рівні і здатні продукувати різноманітні термостабільні ферменти [1, 16].

Результати цього дослідження показали присутність у матах бактерій, здатних рости при високій температурі і продукувати деякі термостабільні ферменти, такі, як амілаза, лецитиназа, ліпаза і протеаза. В цих матах домінували бактерії р. *Bacillus*, зокрема *Brevibacillus agri* і *Paenibacillus* sp., визначені за морфологічними і молекулярними показниками. У низці робіт згадується термофільність *Bacillus* [7], в інших встановлена амілазна, ліпазна і протеїназна активність термофільних видів роду [5, 16, 22]. Амілази здатні гідролізувати крохмаль до глюкози, мальтози, суміші мальто-олігосахаридів, різних α -limit декстринів, що містять α (1-6) зв'язки [27], завдяки чому вони широко застосовуються у виробництві продуктів харчування, косметичній і фармацевтичній промисловості. Амілаза сприяє стійкості продуктів, прискорює швидкість реакції, знижує можливість забруднення, зменшує в'язкість середовища і таким чином сприяє переробці крохма-

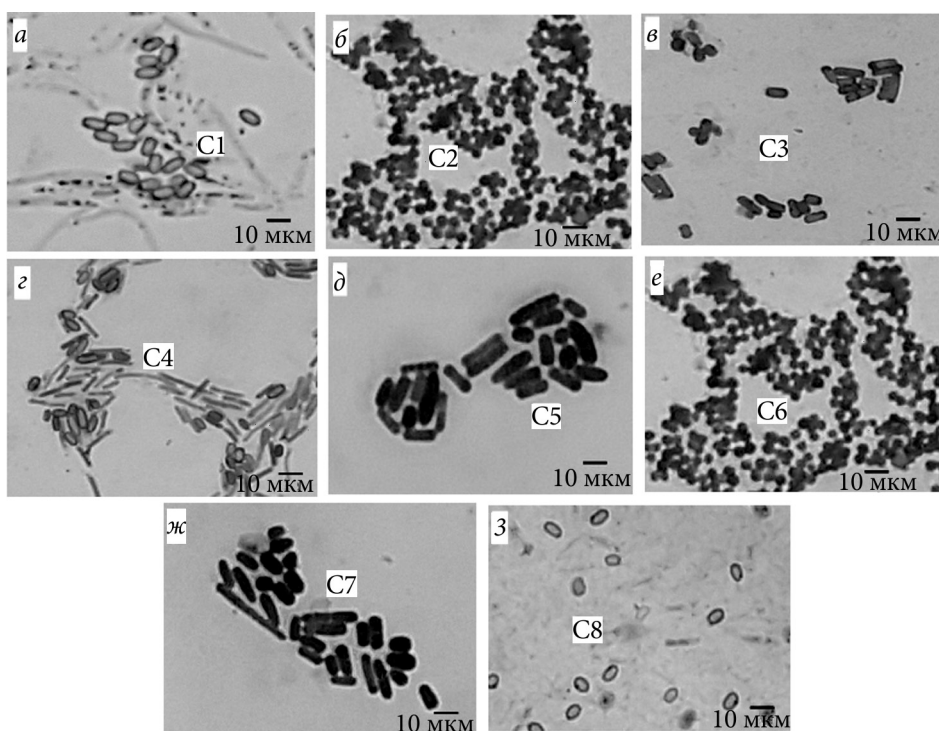


Рис. 2. Мікрофотографія мікроорганізмів з мікробіального мату геотермальної зони Команхілья: а, в, г, д, ж, з — *Bacilli*; б, е — *Cocobacilli* (фарбування за Грамом; збільшення×1000)

Таблиця 4
Біохімічна активність бактерій, виділених з мікробіальних матів гарячих джерел геотермальної зони Команхілья

Показники	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Каталаза	+	+	+	+	—	+	+	+
Оксидаза	+	—	—	+	+	—	—	+
Амілаза	+	—	+	+	—	—	+	+
Лецитиназа	+	—	+	+	—	—	—	+
Ліпаза	+	—	—	+	—	—	+	+
Протеаза	+	—	—	—	—	—	—	+
Розрідження желатину	—	—	—	—	—	—	—	—
Нітрат редукція	+	—	—	+	+	—	—	+
Мегил червоний	—	—	—	—	—	—	—	—
Реакція Ф-П	—	—	—	—	—	—	—	—
Ферментація цукрів								
Манітол	—	—	+	—	—	—	+	—
Лактоза	—	—	—	—	—	—	—	—

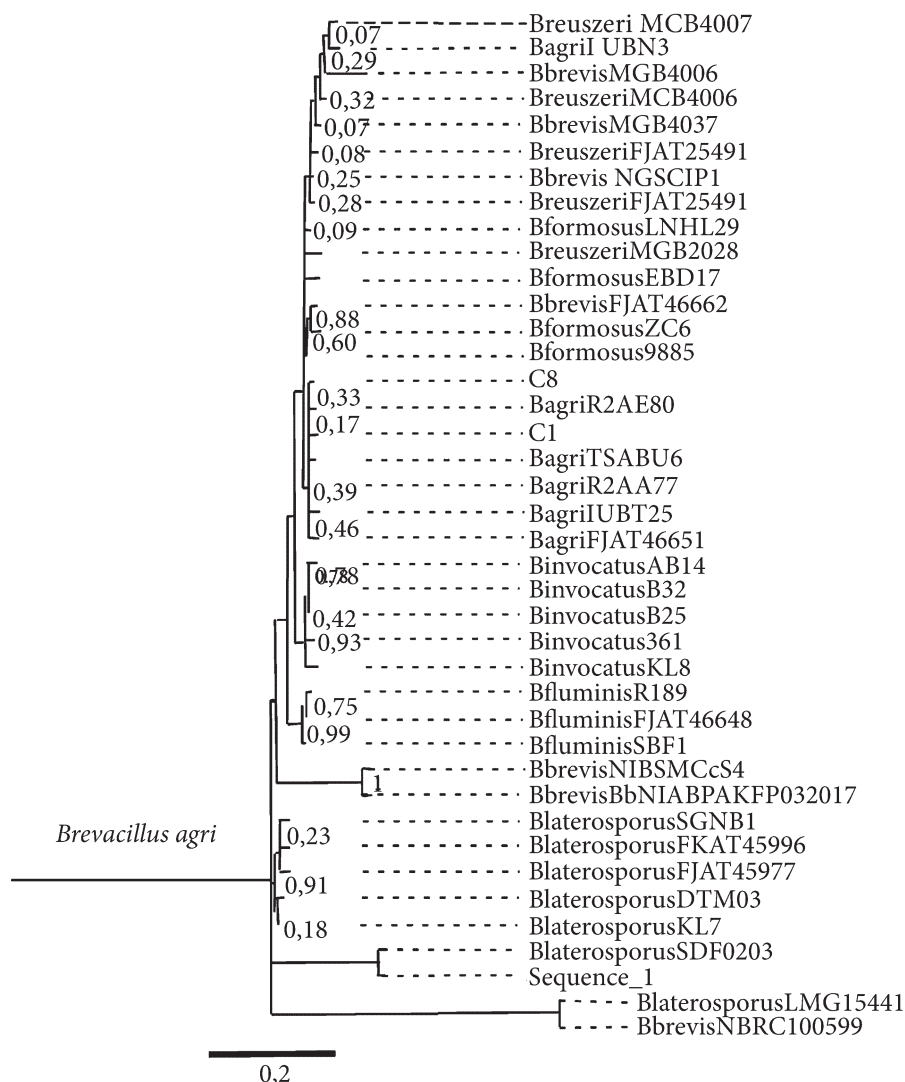


Рис. 3. Філогенетичне дерево ізолятів C1 і C8 (*Breviacillus agri*)

лю при високих температурах [5]. Протеази є неодмінним компонентом всіх форм живого, вони широко застосовуються у харчовій, шкірообробній промисловості, виробництві мийних і фармацевтичних засобів, діагностиці, обробці стоків і відновленні срібла [15]. Розглядається можливість застосування мікробіальних ліпаз для виробництва мийних засобів, трансетерифікації, синтезу хіральних сполук [10]. Ліпази термофільних мікроорганізмів важливі у промислових процесах, оскільки вони стійкі термічної і хімічної денатурації. Для ферментативної обробки промислових стоків, багатих жирами і оліями, необхідні ліпази термофільних штамів бактерій, також ці штами можуть бути використані для

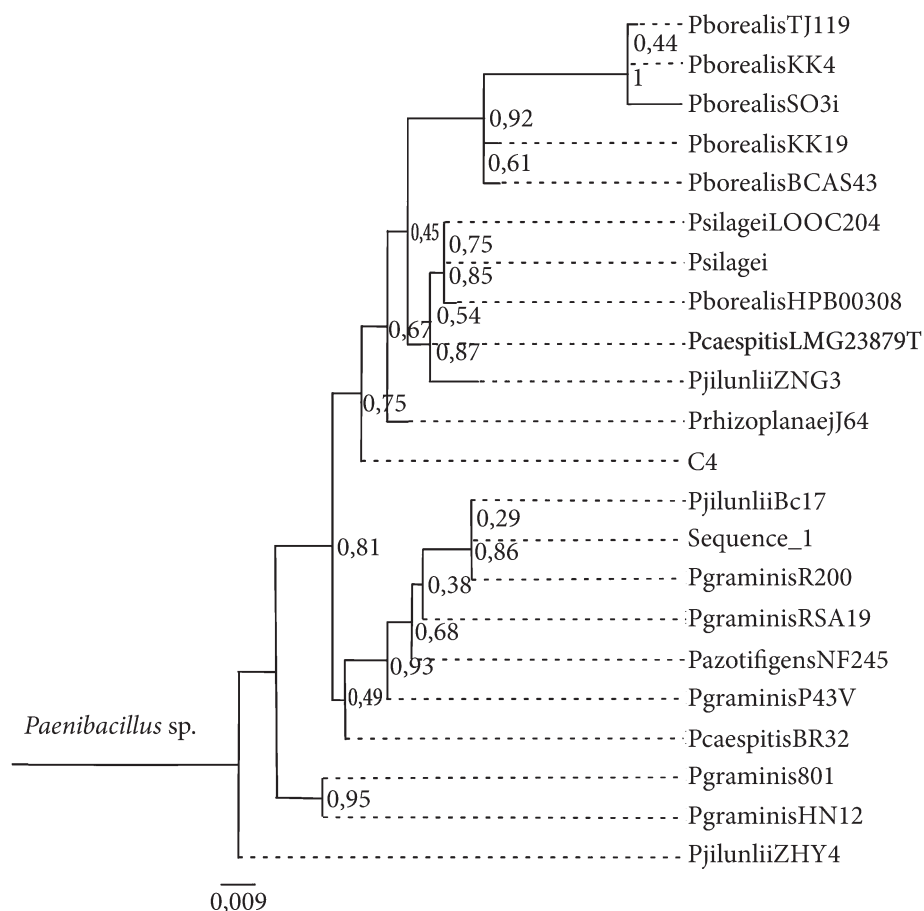


Рис. 4. Філогенетичне дерево ізоляту C4 (*Paenibacillus* sp.)

гідролізу ліпідів. Нещодавно кілька ліпаз було виділено і описано з термофільних ізолятів, переважно р. *Bacillus* [18].

Це дослідження показало можливість знахідок р. *Bacillus* у середовищі з екстремальними температурами (бактеріальні ізоляти C1, C4, і C8), що підтверджує дані попередніх досліджень, у яких встановлено присутність і високу рясність представників порядку Firmicutes в екстремальних умовах [24, 27]. Представники відділу Firmicutes (переважно з родин *Bacillaceae* і *Paenibacillaceae*) широко застосовуються у виробництві, зокрема у сільському господарстві, біотехнології, медицині як важливе джерело ферментів [26].

Висновки

Мікробіальні мати з геотермальної зони Команхілья є важливим джерелом мікроорганізмів, що можуть бути використані для виробництва термостабільних ферментів, необхідних для біотехнологічних і про-

мислових потреб. Дослідженню біотехнологічного потенціалу термофільних мікроорганізмів цих зон приділяється недостатньо уваги. Виділено два види термофільних бактерій — *Brevibacillus agri* і *Paenibacillus* sp. і попередньо досліджено їх ферментативний потенціал. Отримані результати дають підстави припустити значний потенціал цих штамів і зумовлюють необхідність продовжити дослідження.

Список використаної літератури

1. Adiguzel A., Ozkan H., Baris O. et al. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *J. Microbiol Methods*. 2009. Vol. 79, N 3. P. 321—328.
2. Bae S.S., Lee J.H., Kim S.J. *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. Vol. 55. P. 1211—1215.
3. Boomer S.M., Noll K.L., Geesey G.G., Dutton, B.E. Formation of multilayered photosynthetic biofilms in an alkaline thermal spring in Yellowstone National Park, Wyoming, USA. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, N 8. P. 2464—2475.
4. Case C.L., Johnson T.R. Laboratory experiments in Microbiology. Melopark : The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1984. 414 p.
5. Das S., Singh S., Sharma V., Soni M.L. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 2011. N 2. P. 486—496.
6. Dereková A., Mandeva R., Kambourova M. Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading *Bacilli* from Bulgarian hot springs. *World J. Microbiol Biotechnol.* 2008. Vol. 24, N 9. P. 1697—1702.
7. El-Gayar K.E., Abboud M.A., Essa A.M. Characterization of thermophilic bacteria isolated from two hot springs in Jazan, Saudi Arabia. *J. Pure App. Microbiol.* 2017. Vol. 11, N 2. P. 743—752.
8. Harley J.P., Prescott L.M. Laboratory exercises in Microbiology. Fifth ed. New York : The McGraw-Hill Companies, 2002. P. 125—135.
9. Harrigan W.F. Biochemical tests for identification of microorganisms. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3rd ed. San Diego : Academic Press, 1998. P.100—118.
10. Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., et al. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 1994. N 15. P. 29—63.
11. Lau M.C., Aitchison J.C., Pointing S.B. Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles*. 2009. Vol. 13, N 1. P. 139 —149.
12. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 8th Edition. New York: Prentice Hall International, 1997. Pp. 234 —354.
13. Marteinsson V.T., Hauksdottir S., Hobel C.F.V. et al. Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. P. 4242—4248.
14. Miquel P. Monographie d'un bacille vivant au-dela de 70° centigrades. *Ann. Micrographie*. 1888. N 1. P. 3—10.
15. Naidu K.S.B., Devi K.L. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *African J. Biotech.* 2005. Vol. 4, N 7. P. 724—726.
16. Panda M.K., Sahu M.K., Tayung K. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iran. J. Microbiol.* 2013 Vol. 5, N 2. P. 159—165.
17. Pandey A., Nigam P., Soccol C.R. et al. Advances in microbial amylases. *Biotech. Appl. Biochem.* 2000. N 31. P.135—152.
18. Rúa L., M., Schmidt-Dannert C., Wahl S. et al. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus* Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *J. Biotechnol.* 1997. Vol. 56. P. 89—102.

19. Schiano Moriello V., Lama L., Poli A. et al. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean ares. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003. Vol. 30, N 2. P. 95—101.
20. Shahinyan G., Margaryan A., Panosyan H., Trchounian A. Identification and sequence analyses of novel lipase encoding novel thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs. *BMC Microbiol.* 2017. Vol. 17. P. 103.
21. Sharma A., Pandey A., Shouche Y.S., et al. Characterization and identification of *Geobacillus* sp. Isolated from Soldhar hot spring site of Garhwal Himalaya, India. *J. Basic Microbiol.* 2009. Vol. 48, N 2. P. 1—8.
22. Shilpi K., Abha S., Chander P., et al. Isolation and characterization of thermostable amylase producing bacteria from hot springs of Bihar, India. *Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci.* 2018. Vol. 7, N 2. P. 28—34.
23. Sievert S.M., Ziebis W., Kuever J., Sahm K. Relative abundance of Archaea and Bacteria along a thermal gradient of a shallow water hydrothermal vent quantified by rRNA slot-blot hybridization. *Microbiology.* 2000. Vol. 146, Pt. 6. P.1287—1293.
24. Verma P., Yadav A.N., Khannam K.S. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. *J. Basic Microbiol.* 2016. Vol. 56. P. 44—58
25. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr. Protocols in Mol Biol.* 20015. Vol. 6, N 1. P. 241—245.
26. Yadav A.N., Sachan S.G., Verma P., Saxena A.K. Bioprospecting of plant growth promoting psychrotrophic Bacilli from cold desert of north western Indian Himalayas. *Ind. J. Exp. Biol.* 2016. Vol. 54. P.142—150
27. Yang C.H., Liu W.H. Purification and properties of a maltotriose producing α -amylase from *Thermobifida fusca*. *Enzym. Microb. Technol.* 2004. Vol. 35, N 2. P. 254—260.

Надійшла 02.11.20

B. Noriega-Luna

Department of Civil and Environmental Ingeniering, Campus Guanajuato,
University of Guanajuato, Guanajuato, México
berenice.noriega@ugto.mx

M. J. Puy-Alquiza

Department of Mining, Metalurgy and Geology, Campus Guanajuato,
University of Guanajuato, Guanajuato, México

A. Y. Vázquez-Lara

Department of Civil and Environmental Ingeniering, Campus Guanajuato,
University of Guanajuato, Guanajuato, México.

M. M. Salazar-Hernández

Department of Mining, Metalurgy and Geology, Campus Guanajuato,
University of Guanajuato, Guanajuato, México

A. H. Serafín-Muñoz

Department of Civil and Environmental Ingeniering, Campus Guanajuato,
University of Guanajuato, Guanajuato, México.

R. Miranda-Aviles

Department of Mining, Metalurgy and Geology, Campus Guanajuato,
University of Guanajuato, Guanajuato, México

G. Carreño-Aguilera

Department of Geomátix and Hydraulics, Campus Guanajuato,
University of Guanajuato, Guanajuato, México.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THERMOPHILIC BACTERIA FROM MICROBIAL MATS PRESENT CARPET COMANJILLA, MÉXICO, GEOTHERMAL HOT SPRING

In the present study, the phenotypic and genotypic characterization of bacteria isolated from the geothermal zone of Comanjilla, Guanajuato, Mexico, was performed. The thermal water studied is classified as hyperthermal water, of deep origin, and with low mineralization. The production of microbial mats in the thermal water is 1 ton in fifteen days in an area of 40 m². It consists of several stratified layers of green and orange color of 100 cm², each of which is dominated by specific types of microorganisms such as diatoms, cyanobacteria, but mainly bacteria. Eight isolates by morphological, microscopic, biochemical, molecular, and physiological characteristics were identified. Sequencing of the 16S rDNA of the isolates revealed that two isolates could be identified as *Bacillus licheniformis*. BLAST search analysis of the sequence showed maximum identity with *Bacillus* (97 to 99% similarity). The results revealed the apparent domination of the genus *Bacillus* represented by *Brevibacillus agri* and *Paenibacillus* sp. The isolates showed the ability to produce some thermostable enzymes such as amylase, lipase, and protease, which have a wide range of applications in the agricultural, food, and pharmaceutical sectors. This diversity of thermophilic bacteria present in the microbial mats of the geothermal zone of Comanjilla is representative of Mexico's central zone. It is the first study of these microorganisms in the area, which makes it a place of great interest from the biotechnological and industrial point of view, since, in addition to being an essential taxon in terms of diversity and technology. At the same time, studying thermophilic bacteria as a functional unit will help to understand better how these complex and integrated communities adapt to the life around the thermal waters.

Keywords: *thermophile bacteria, Comanjilla geothermal zone, thermostable enzymes*