

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ  
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК»**

На правах рукописи

**РОЗАНОВ АЛЕКСЕЙ СЕРГЕЕВИЧ**

**Биоразнообразие микробиологических геотермальных  
сообществ Прибайкалья и Камчатки - перспективных  
источников бактерий-продуцентов ферментов деструкции  
лигноцеллюлозы**

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук,  
Пельтек Сергей Евгеньевич

Новосибирск 2016

## Глава 1 Оглавление

<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>5</b>
Актуальность исследования .....	5
Научная новизна работы .....	8
Теоретическая и практическая значимость исследования.....	9
Положения, выносимые на защиту .....	9
Вклад автора .....	10
Апробация работы.....	11
Структура и объем работы.....	13
Благодарности .....	14
<b>Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>16</b>
1.1 Исследование биологического разнообразия микробных сообществ. ....	16
1.2 Роль микробиологического разнообразия в биотехнологии.....	23
1.3 Растительная биомасса как возобновляемый источник сахаросодержащего сырья .....	27
1.4 Гидролиз растительной биомассы в природе .....	30
1.5 Технология гидролиза растительной биомассы до сахаров. ....	35
Выводы по обзору литературы. ....	40
<b>Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	<b>41</b>
2.1 Отбор образцов. ....	41
2.2 Цитологическое исследование образцов бактериального мата .....	41
2.3 Выделение ДНК из природных образцов донных отложений и бактериальных матов для метабеномных исследований.....	41
2.4 Амплификация фрагмента гена 16S рРНК для метабеномного анализа бентосного микробного сообщества источника Заварзина (Камчатка). ....	42
2.5 Амплификация фрагмента гена 16S рРНК для метабеномного анализа микробных матов источника Гаргинского (Прибайкалье). ....	43
2.6 Секвенирование на GS Junior System sequencer .....	43
2.7 Обработка данных секвенирования. ....	44
2.8 Выделение термофильных бактерий .....	45
2.9 Выделение геномной ДНК.....	45
2.10 Секвенирование гена 16S рРНК бактериальных штаммов .....	45
2.11 Построение филогенетического древа.....	47
2.12 Геномное секвенирование термофильных бактерий. ....	47
2.13 <i>De novo</i> сборка последовательностей геномов.....	48
2.14 Сборка экспрессирующих конструкций.....	48
2.15 Трансформация клеток <i>E.coli</i> плазмидной ДНК.....	49

2.16 Отбор клонов, содержащих целевые конструкции гликозид гидролаз.....	49
2.17 Скрининг клонов E.coli для определения продукции целевых ферментов при помощи электрофореза в ДСН-ПААГ. ....	50
2.18 Выделение рекомбинантных белков гликозидгидролаз из культуры. ....	52
2.19 Определение оптимума температуры и pH ферментативной реакции гликозид гидролаз. ....	53
2.20 Определения гликозид гидролазной активности ферментов на естественном субстрате. ....	55
<b>Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>56</b>
3.1 Микробные маты геотермальных источников Прибайкалья.....	56
16S рРНК метагеномный анализ микробного мата источника Гаргинского (Прибайкалье). ....	61
3.2 Микробные сообщества геотермальных источников Камчатки.....	75
16S рРНК метагеномный анализ микробного состава бентосного микробного мата источника Заварзина (Камчатка). ....	79
3.3 Выделение термофильных микроорганизмов. Их описание и филогенетический анализ. ....	91
3.4 Клонирование генов ферментов гемицеллюлазного комплекса, найденных в геноме штамма <i>G. stearothermofillus</i> 22.....	99
3.5 Нарботка и очистка рекомбинантных белков.....	106
3.6 Изучение свойств, полученных рекомбинантных карбогидраз.....	113
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>118</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>122</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>124</b>

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

трис-НСl – трис(гидроксиметил)аминометан -НСl

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

ДСН - додецилсульфат натрия

ПААГ-ДСН – полиакриламидный гель с добавлением ДСН

PVPP - поливинилпирролидон

ДАФИ - 4',6-диамино-2-фенилиндол

ОТЕ – операционная таксономическая единица

IPTG - изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид

ИЖ – ионная жидкость

[bmim]Cl – 1 бутил – 3 метил имидазолиум хлорид

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Исследование структуры микробных сообществ высокотемпературных вод геотермальных источников – одна из задач фундаментальной микробиологии. Термофильными считаются организмы, способные выживать при температуре более 62°C. Среди них выделяются гипертермофильные микроорганизмы, способные к активному росту при температуре более 80°C. Наиболее экстремофильным среди микроорганизмов считается *Methanopyrus kandleri*, выживающий при температуре до 122°C и давлении 200 атмосфер [Kurr et al., 1991]. Также интересны микроорганизмы, экстремальные по другим условиям: значению pH и концентрации солей в растворе [Rothschild et al., 2001]. Особый интерес для изучения с экологической и эволюционной точек зрения представляют автотрофные микробные маты. Это кожистые образования, формирующиеся в водах с экстремальными физико-химическими параметрами. Микробные маты имеют малый размер, представляют собой почти замкнутые самоподдерживающиеся бентосные экосистемы, которые включают циклы основных элементов, трофические уровни и пищевые цепи.

Изучение генетического разнообразия микробных сообществ геотермальных мест обитания и поиск термофильных бактерий и их белков интересны как с экологической точки зрения, так и для биотехнологии [Elleuche et al., 2014]. Учитывая общие тенденции изменения требований к условиям технологических процессов, в первую очередь рост их температур, и к повышению стабильности используемых препаратов, вклад термофильных микроорганизмов и их ферментов в осуществление промышленных биотехнологических процессов будет возрастать [Turner et al., 2007, Hasunuma et al., 2013].

Значимым вызовом для биотехнологии в настоящее время является постоянно растущий спрос на первичную субстанцию микробиологического

синтеза - сахара, традиционно получаемые из крахмала и сахарозы. Альтернативным источником сахаров является лигноцеллюлозная биомасса растений [Iqbal et al., 2013]. Но процесс ее переработки оказался сложным. Существующие ферментативные препараты не позволили создать технологию комплексной переработки лигноцеллюлозы, которая могла бы по экономической эффективности конкурировать с методами получения сахаров из крахмало- и сахарозосодержащих частей растений. Это привело к активизации поиска новых методов предобработки лигноцеллюлозы и совместимых с ними ферментов и их комплексов.

Среди прочих выделяется метод предобработки лигноцеллюлозного сырья, основанный на применении ионных жидкостей (ИЖ). Этот метод позволяет разрушать кристаллическую решетку целлюлозы и осуществлять разделение компонентов лигноцеллюлозы. Однако оказалось, что ИЖ могут существенно ингибировать работу ферментов [Zhao et al., 2009, Hong et al., 2012]. Исследования феномена нестабильности ферментов в присутствии ИЖ показали, что устойчивость белков к их воздействию хорошо коррелирует с общей устойчивостью. Имеющаяся в литературе информация свидетельствует о том, что источником высокостабильных белков являются микроорганизмы экстремальных мест обитания, в первую очередь высокотемпературных [Engel et al., 2012].

На территории России располагается большое количество геотермальных мест обитания, не достаточно изученных как с точки зрения микробиологии, так и с точки зрения их биотехнологического потенциала. В первую очередь это геотермальные источники Прибайкалья, Камчатки и Курильских островов. Работы, направленные на изучение микробного разнообразия с использованием современных метагеномных подходов, весьма малочисленны и сосредоточены на изучении микробного разнообразия горячих источников Камчатки [Gumerov et al., 2011, Rozanov et al., 2014, Chernykh et al., 2015]. Работы, посвященные подробному изучению геотермальных источников Прибайкалья с использованием современных

методов, появились совсем недавно, в конце 2015 г. [Gaisin et al., 2015]. Методы метагеномики позволяют проводить микробиологическое и экологическое описание исследуемых объектов без применения методов, основанных на культивировании. Это важно, так как лишь небольшая часть микроорганизмов, обнаруживаемых в сообществе, может быть выделена и адаптирована к условиям культивирования *in vitro* [Amann et al., 1995]. Наиболее современными и эффективными, в настоящее время являются методы, основанные на анализе геномных и амплисек библиотек, полученных для образцов микробных сообществ высокопроизводительными методами секвенирования. Такой подход получил свое название “метагеномика”, этот термин был введен группой Handelsman [Handelsman et al., 1998]. Современный смысл этот термин приобрел в 2004 году, когда для метагеномных исследований начали использовать массовое параллельное секвенирование [Tyson et al., 2004, Venter et al., 2004].

Изучение микробных сообществ уже на протяжении более ста лет дает материал не только для фундаментальной науки, но и для решения прикладных задач. В ходе выполнения работ внимание было сфокусировано как на изучении микробного разнообразия, так и на поиске материалов для биотехнологического применения, в частности на выделении термофильных бактерий и поиске новых вариантов ферментов для гидролиза лигноцеллюлозы.

Таким образом, можно заключить, что создание новых ферментативных препаратов, направленных на деструкцию лигноцеллюлозы, способных работать при высоких температурах и в разных химических условиях, остается актуальной задачей. Одним из вариантов ее решения является поиск и изучение свойств ферментов экстремофильных микроорганизмов.

**Целью данной работы является** изучение биоразнообразия геотермальных микробных сообществ и поиск в них ферментов деструкции лигноцеллюлозы.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить *следующие задачи*:

1. Описать разнообразие микробных сообществ термальных источников Камчатки и Прибайкалья с установлением генетического разнообразия по гену 16S рРНК в препаратах суммарной ДНК микробных сообществ;
2. Выделить штаммы термофильных бактерий из исследуемых микробных сообществ и провести их характеристику;
3. Провести полногеномное секвенирование найденных штаммов термофильных бактерий;
4. Выявить гены ферментов деструкции лигноцеллюлозы в установленной структуре геномов термофильных бактерий и клонировать их в экспрессирующий вектор;
5. Нарботать биомассу рекомбинантных штаммов-продуцентов и произвести очистку клонированных белков;
6. Изучить свойства полученных ферментов, в том числе их активность в присутствии ионных жидкостей.

### **Научная новизна работы**

Впервые с использованием высокопроизводительных методов геномики проведен анализ: микробного мата источника Гаргинского (Прибайкалье). Впервые описана филогенетическая структура бентосного микробного сообщества источника Заварзина, расположенного в кальдере вулкана Узон (Камчатка).

Из образцов микробных сообществ, отобранных во время экспедиционных работ в зоны геотермальной активности Камчатки и Прибайкалья, выделены в чистую культуру и охарактеризованы термофильные аэробные бактерии, принадлежащие к трем родам: *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Thermoactinomyces*. Один из штаммов был идентифицирован как новый вид, которому было присвоено название *Geobacillus icigianus*. Проведено полногеномное секвенирование шести термофильных штаммов, относящихся к родам *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Thermoactinomyces*.



В геноме ранее не изученных *G. stearothermofilus* штаммов 22 VKPM В-11678 и 53 были обнаружены гены ферментов деструкции компонентов лигноцеллюлозы. Гены ферментов: эндо-1,4-β-глюканазы, ксилан-1,4-β-ксилозидазы, эндо-1,4-β-ксиланазы, α-глюкуронидазы, α-L-арабинофуранозидазы были использованы для создания рекомбинантных продуцентов. Впервые проведено исследование влияния ионных жидкостей на свойства эндо-1,4-β-ксиланазы и ксилан-1,4-β-ксилозидазы *G. stearothermofilus* VKPM В-11678.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Анализ генетического разнообразия микробных матов источника Гаргинского (Прибайкалье) и источника Заварзина (Камчатка), будут способствовать лучшему пониманию межвидовых взаимодействий экстремофильных микробных сообществ. Обнаружен новый вид *Geobacillus icigianus*, который был соответствующим образом описан и депонирован в коллекции культур DSMZ и ВКПМ.

Ферменты разрушающие связи лигноцеллюлозы *G. stearothermofilus* 22 VKPM В-11678 продемонстрировали достаточно высокую ферментативную активность и способность функционировать при температурах более 55°C. Было показано, что фермент ксилан-1,4-β-ксилозидаза *G. stearothermofilus* 22 VKPM В-11678 показал высокую стабильность в присутствии 1-бутил-3-метилимидазолий хлорида [bmim]Cl, что свидетельствует о возможности использования этого фермента для создания комплексов белков, направленных на гидролиз лигноцеллюлозы в присутствии ИЖ.

### **Положения, выносимые на защиту**

- Генетическая структура фототрофного микробного мата источника Гаргинского (Прибайкалье) обеспечивает формирование практически замкнутых циклов основных химических элементов углерода, серы и азота, поддерживаемых бактериями типов Planctomicetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes (класса *Clostridia*) и Thermi, а также аноксигенными

фототрофами типов *Chloroflexi* и *Chlorobi*. Основную первичную продукцию обеспечивают цианобактерии рода *Leptolyngbya*.

- Генетическая структура донного микробного мата геотермального источника Заварзина (Камчатка) демонстрирует, что большинство микроорганизмов этого мата способны использовать серу в качестве акцептора электронов. Основу сообщества составляют матрикс образующие бактерии типов *Caldiserica* и *Dictyoglomi*, первичную продукцию и азотфиксацию обеспечивают представители типов *Aquificae* и *Nitrospirae*, соответственно.

- Штамм *Geobacillus* sp. G1W1, тип *Firmicutes*, выделенный из образцов донных отложений геотермальных источников Камчатки, согласно данным филогенетического анализа и полногеномного секвенирования определен как новый вид – *Geobacillus icigianus*.

- Фермент ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидаза, ген которого был обнаружен в ходе геномного секвенирования штамма *G.stearothermofillus* 22 VKPM B-11678, выделенного из геотермальных источников Прибайкалья, обладает свойствами, обеспечивающими возможность его эффективного использования в технологических процессах деструкции лигноцеллюлозы с применением ионных жидкостей.

### **Вклад автора**

Большая часть экспериментальной работы выполнена автором лично. Диссертационная работа выполнялась в период с сентября 2007 г по декабрь 2013г, в соответствии с планом научных исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) по теме проекта VI.58.1.3. “Метаболомно-протеомное профилирование молекулярно-генетических систем и процессов” (координатор проекта к.б.н. С.Е. Пельтек),

а также по теме государственных контрактов ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы»: № 14.512.11.0072 от 19.04.2013 г. «Разработка биокаталитических методов превращения биомассы мискантуса в этанол»; №14.512.11.0057 от «03» апреля 2013 г. «Разработка методов генетической модификации термофильных микроорганизмов с целью создания термоустойчивых штаммов-продуцентов, предназначенных для трансформации сахаров из возобновляемых источников биомассы в биоэтанол». Сбор материалов бентосных отложений в Прибайкальском регионе для выделения термофильных бактерий проводился автором лично в период с 08.09.2007 по 22.09.2007г. Материалы микробных матов Прибайкалья и образцы из геотермальных источников Камчатки были предоставлены сотрудником лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН к.б.н. с.н.с. Брянской А.В., описание нового штамма *G.icigianus* и микробных матов было выполнено совместно с к.б.н., с.н.с., Брянской А.В.

Научные положения диссертационной работы и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

#### **Апробация работы**

По результатам работы опубликовано 6 статей в журналах из списка ВАК. Материалы были представлены на одной российской и трех международных конференциях. По результатам работ получен один патент.

*Список работ, по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых журналах.*

1. **Rozanov, A. S.**, Ivanisenko, T. V., Bryanskaya, A. V., Shekhovtsov, S. V., Logacheva, M. D., Saik, O. V., ... & Peltek, S. E. (2014). Bioinformatics analysis of the genome of *Geobacillus stearothermophilus* 22 Strain isolated from the Garga hot spring, Baikal Region. Russian Journal of Genetics: Applied Research, 4(4), 267-272. IF – 0.41

2. Bryanskaya, A., **Rozanov, A.**, Slynko, N., Shekhovtsov, S., & Peltek, S. (2014). *Geobacillus icigianus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from Valley of Geysers, Kamchatka. Int j syst evol micr, ijs-0. IF – 2.798
3. **Rozanov, A. S.**, Meshcheryakova, I. A., Shekhovtsov, S. V., & Peltek, S. E. (2014). Current state of genetic and metabolic engineering of the genus *Geobacillus* aimed at production of ethanol and organic acids. Russian Journal of Genetics: Applied Research, 4(3), 218-226.
4. **Rozanov Aleksei S.**, Sushentseva Natalya N., Malup Tatiana K., Goryachkovskaya Tatiana N., Demidova Elisaveta V., Meshcheriakova Irina A., Demidov Evgeniy A., Peltek Sergey E. Analysis of enzymes of the hemicellulose complex from *Geobacillus stearothermophilus* 22 VKPM B-11678 isolated from Garga hot spring, Russia (2015) Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, Accepted manuscript (unedited version) available online: 9-APR-2015, DOI information: 10.1016/j.molcatb.2015.04.001, IF – 2.8
5. N.L. Dobretsov, E.V. Lazareva, S.M. Zhmodik, A.V. Bryanskaya, V.V. Morozova, N.V. Tikunova, S.E. Peltek, G.A. Karpov, O.P. Taran, O.L. Ogorodnikova, I.S. Kirichenko, **A.S. Rozanov**, I.V. Babkin, O.V. Shuvaeva, E.P. Chebykin (2015). Geological, hydrogeochemical, and microbiological characteristics of the Oil site of the Uzon caldera (Kamchatka). Russian Geology and Geophysics, 56(1), 39-63. IF – 1.41
6. **Rozanov, A. S.**, Bryanskaya, A. V., Malup, T. K., Meshcheryakova, I. A., Lazareva, E. V., Taran, O. P., ... & Peltek, S. E. (2014). Molecular analysis of the benthos microbial community in Zavarzin thermal spring (Uzon Caldera, Kamchatka, Russia). BMC genomics, 15(Suppl 12), S12. IF – 4.04

**Получен патент** на штамм *Escherichia coli* EX pQE30 - продуцент эндоксилаказы бактерии *Geobacillus st. 22*. (Авторы: **Розанов А.С.**, Демидова Е.В., Малуп Т.К., Пельтек С.Е. № 2542486, Опубл. 20.02.15)

*Тезисы докладов, по теме работы, на всероссийских и международных конференциях.*

1. **Розанов А.С.**, Сушенцева Н.Н., Малуп Т.К., Горячковская Т.Н., Демидова Е.В., Мещерякова И.А., Демидов Е.А., Брянская А.В., Пельтек С.Е. Изучение ксиланолитических ферментов *Geobacillus stearothermophilus* 22 VKРМВ-11678 (Горячий источник Гарга, Россия) 2015 [VIII Московский международный конгресс "БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ"] Москва: 2015. - Ч.2. - С.ххх-ххх
2. A.V. Bryanskaya, **A. S. Rozanov**, T. K. Malup, E. V. Lasareva, O. P. Taran, T. V. Ivanisenko, V. A. Ivanisenko, N. A. Kolchanov, S. E. Peltek Microbial Communities of the Thermal Springs of the Geyser Valley and Uzon Caldera (Kamchatka) Using Pyrosequencing 2014 [10th International Congress on Extremophiles]
3. Брянская А.В., **Розанов А.С.**, Малуп Т.К., Старостин К.В., Демидов Е.А., Шеховцов С.В., Мещерякова И.А., Горячковская Т.Н., Банникова С.В., Сушенцева Н.Н., Демидова Е.А., Голубева Е.С., Уварова Ю.Е., Пельтек С.Е. Характеризация коллекции экстремофильных микроорганизмов ИЦИГ СО РАН 2014 [VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы]
4. **Розанов А.С.**, Брянская А.В., Малуп Т.К., Лазарева Е.В., Таран О.П., Иванисенко Т.В., Иванисенко В.А., Жмодик С.М., Колчанов Н.А., Пельтек С.Е. Сравнительный анализ состава микробного сообщества воды и бентоса термального источника Заварзина, кальдера Узон, Камчатка. - 2013 [международная научная конференция «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных мест обитаний»]

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы. В главе 1 содержится обзор литературы по современным методам изучения микробиологического разнообразия микробных сообществ,

состоянию биотехнологических подходов к деструкции лигноцеллюлозы, а также по современному состоянию в области изучения ферментов деструкции лигноцеллюлозы. В главе 2 описываются методы, использованные в работе. Глава 3 содержит: описание микробных сообществ геотермальных источников Прибайкалья и Камчатки, описание филогенетического состава цианобактериального мата источника Гаргинского (Прибайкалье) и бентосного микробного сообщества источника Заварзина (Камчатка). Описано выделение термофильных микроорганизмов, из образцов, отобранных в геотермальных источниках Прибайкалья и Камчатки, секвенирование их генома. Также описано клонирование генов ферментов гемицеллюлазного комплекса, обнаруженных в геноме бактерии *G. stearothermophilus* штамм 22, выделенной из проб, отобранных в горячих источниках Прибайкалья, их наработка и исследование свойств. В заключении обсуждаются и обобщаются основные результаты исследования.

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 27 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 188 ссылок.

### **Благодарности**

Автор выражает благодарность: к.б.н. А.В.Кудрявцевой, руководителю ЦКП “Геном” Института Молекулярной Биологии РАН им. В.А.Энгельгардта, к.б.н. М.Д.Логачевой, с.н.с. лаборатории эволюционной геномики факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, к.б.н. Г. В. Васильеву, сотруднику ИЦиГ СО РАН, – за помощь в выполнении высокопроизводительного параллельного секвенирования. Д.б.н. Е.В. Дейнеко, зав. лаборатории биоинженерии растений, – за помощь в обсуждении результатов. М.н.с. Лаборатории компьютерной протеомики Иванисенко Тимофею В., за помощь в биоинформационной обработке данных 16S рРНК метагеномного секвенирования. К.б.н. С.Е Пельтеку зав., лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН, за организацию поддержку

работы. Сотрудникам лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН за помощь в выполнении работы.

## Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Исследование биологического разнообразия микробных сообществ.

Живые организмы колонизировали практически все возможные экологические ниши на Земле. Те микроорганизмы, которые метаболически активны в условиях, отличных от нормальных, называются экстремофильными. Изучение этой группы микроорганизмов вызывает интерес как с точки зрения экологии микробных сообществ и их физиологии, так и с точки зрения возможности применения микроорганизмов или их белков в биотехнологии. Наибольший интерес вызывают микробные сообщества высокотемпературных мест обитания, способные выживать при температуре более 62°C. Среди них выделяются гипертермофильные микроорганизмы, способные к активному росту при температуре более 80°C. Наиболее экстремальным среди микроорганизмов считается *Methanopyrus kandleri*, выживающий при температуре до 122°C и давлении 200 атмосфер [Kurt et al., 1991]. Большой интерес представляют и микробные сообщества других экстремальных мест обитания, например, с экстремальными значениями pH и концентрациями солей [Rothschild et al., 2001].

Отдельно стоит рассмотреть такие биологические объекты, как микробные маты, вертикально разделенные сообщества микроорганизмов различных функциональных групп. [Stal L.J., 2012]. Микробные маты – это обычно бентосные сообщества, растущие на твердых субстратах, в большинстве случаев автотрофные, использующие CO<sub>2</sub> в качестве источника углерода. Микробные маты рассматривают как аналоги строматолитов, окаменевшие остатки которых находят в геологических слоях, образованных 3.5 миллиарда лет назад и, соответственно, считающихся старейшими экосистемами на Земле. [Заварзин Г. А., 2003; Dupraz et al., 2009]. Докембрийские строматолиты – это слоистые камни, сформированные микробными матами в условиях мелководных морей. Микробные маты также были важны для формирования пород путем защиты осадочных пород от



эрозии. Аналогичные примеры можно наблюдать в некоторых современных морях [Yallop et al., 1994].

Фототрофные микробные маты являются хорошей модельной системой для экологического и эволюционного анализа микробных сообществ. Микробные маты имеют малый размер и представляют собой почти замкнутые самоподдерживающиеся бентосные экосистемы, которые включают циклы основных элементов, трофические уровни и пищевые цепи. Резкий и постоянно смещающийся градиент физико-химических условий создает большое число экологических ниш, формируя крайне неоднородную среду. Типичная слоистая структура микробного мата возникает ввиду градиента физико-химических условий, поддерживаемых активностью составляющих его микроорганизмов [van Gemerden H., 1993; Visscher & Stolz, 2005]. Например, в фототрофных микробных матах фотосинтезирующие микроорганизмы выполняют функцию фиксации световой энергии и  $\text{CO}_2$  для создания органического материала, в том числе и внеклеточных полимеров [De Philippis & Vincenzini, 1998]. Внеклеточные полимеры формируют матрикс, обеспечивающий повышение стабильности донных отложений и формирующий структуру мата, в которой живут микроорганизмы [Grant & Gust, 1987]. Органический материал, сформированный в результате первичной продукции, – это основа пищевых цепей сообщества. Этот органический материал становится доступным для других микроорганизмов в ходе разнообразных процессов [Pomeroy et al., 2007].

В темноте фототрофы и другие микроорганизмы используют внутренние запасы сахара, истощая запасы кислорода в мате. После чего они продолжают использовать накопленные сахара, преобразуя их в низкомолекулярную органику, органические кислоты и спирты [Stal & Moezelaar, 1997; Visscher & Stolz, 2005]. Эти продукты ферментации далее окисляются метаногенными и сульфатвосстанавливающими бактериями. Сульфатвосстанавливающие бактерии вытесняют метаногенов в микробных матах морей и сильносоленых водах из-за высокой концентрации сульфата в

морской воде и водах соленых озер. Сульфатвосстанавливающие бактерии продуцируют сульфид, который окисляется обратно до сульфата сероокисляющими бактериями. Хемоавтотрофные бактерии окисляют сульфид аэробно, тогда как анаэробные фототрофные бактерии окисляют его анаэробно на свету [van Gemerden H., 1993; Visscher & Stolz, 2005]. Последние могут образовывать пурпурный слой под слоем цианобактерий. Бесцветные сероокисляющие бактерии не образуют отдельных слоев, возможно ввиду своей подвижности и необходимости перемещаться за градиентом кислорода [Visscher, Prins & van Gemerden, 1992].

Исследование биологического разнообразия микробных сообществ началось с зарождением микробиологии. Развитие системы знаний об этих сообществах происходило волнообразно с развитием общебиологических методов. Существенные прорывы в этом направлении связаны с разработкой методов ПЦР и секвенирования по Сэнгеру, а позднее с использованием методов массового параллельного секвенирования [Elleuche et al., 2014].

#### **Микробиологические методы анализа биологического разнообразия.**

Число колоний, которые формируются на агаризованной среде, значительно ниже количества клеток, наблюдаемых при микроскопии. Более того, легко культивируемые микроорганизмы при таком анализе на самом деле могут не входить в число наиболее представленных видов. Тем не менее, традиционные методы культивирования микроорганизмов важны для характеристики биохимических и физиологических свойств чистых культур и для поиска применения микроорганизмов в качестве клеточных катализаторов.

Микробиологические методы анализа биологического разнообразия в настоящий момент времени актуальны и продолжают совершенствоваться. В частности, идут поиски замены агара на другие желирующие агенты, такие как Gelrite и нанофибровая целлюлоза, которые потенциально увеличивают разнообразие выделяемых видов, особенно термофильных микроорганизмов

[Tsudome et al., 2009]. Для повышения разнообразия культивируемых микроорганизмов применяются: различные источники питательных веществ и энергии, различный окислительно восстановительный потенциал, смеси газов, широкие диапазоны pH и температуры. При этом большое число видов микроорганизмов, по-прежнему остается в числе не культивируемых [Chistoserdova L., 2010]. Причины неспособности некоторых видов микроорганизмов к культивированию *in vitro* подробно рассмотрены в обзорах [Pham & Kim, 2012, Stewart E.J., 2012].

**Традиционные молекулярно-биологические методы анализа.** По сравнению с «культура-зависимыми» методами традиционной микробиологии, «культура-независимые» методы, включающие анализ с использованием секвенирования 16S и 18S rRNA генов, дают более всеобъемлющую оценку микробиологического разнообразия. В «культура-независимых» методах амплифицируют при помощи ПЦР гены 16S или 18S rRNA, клонируют их в векторные конструкции и поддерживают в клетках *E.coli*. Полученные библиотеки анализируют различными методами, включая секвенирование и рестрикционный анализ (RFLP) [Schütte et al., 2008]. Основным недостатком классических «культура-независимых» методов является большое количество лабораторных процедур и цена секвенирования по Сэнгеру. Кроме того, получить последовательности генов некультивируемых микроорганизмов при таком подходе очень тяжело.

**Массовое параллельное секвенирование для анализа микробиологического разнообразия.** Применение методов массового параллельного секвенирования позволило значительно сократить время анализа образцов и стоимость секвенирования. Так как длина прочтения большинства NGS платформ относительно невелика, в анализе используется неполная последовательность гена 16S рНК. Ген 16S рНК содержит 9 переменных (V1-V9) и девять консервативных регионов (C1-C9). Считается, что использование коротких прочтений может влиять на оценку разнообразия

в сравнении с полногеномным прочтением. После того как был проведен анализ ряда метагеномных исследований, было обнаружено, что использование в работе последовательности региона V1-V2 приводит к недооценке биологического разнообразия, наилучшее качество получается при использовании региона V3-V4 [Cai et al., 2013].

В настоящее время анализ микробиологического разнообразия с использованием частичного секвенирования гена 16S rRNA при помощи массового параллельного секвенирования вошел в постоянную практику исследователей, занимающихся микробиомом в клинических, экологических и технологических целях [Debroas et al., 2009, Vogel et al., 2009].

С развитием технологии массового параллельного секвенирования, метагеномные исследования проводятся не только по отдельным генам, но и при масштабном секвенировании всей ДНК образца. Подход, основанный на использовании массового параллельного секвенирования, получил серьезное развитие и практически эволюционировал в отдельное направление биологии [Chistoserdova L., 2010].

**Метагеномика** - это быстроразвивающееся направление в биологии, направленное на изучение микробных сообществ, без использования культивирования *in vitro*. Методы метагеномики оказывают огромное влияние на микробиологию и биотехнологию, так как позволяют использовать генетический и метаболический потенциал некультивируемых организмов.

Начало истории метагеномики условно можно отсчитывать с момента выхода публикации группы исследователей под руководством Pace в 1991 году [Schmidt et al., 1991]. Авторы этого исследования впервые использовали ген 16S рРНК для филогенетического профилирования микробного сообщества. Термин “метагеномика” был введен позже группой Handelsman [Handelsman et al., 1998]. Современный смысл этот термин приобрел в 2004 году, когда для метагеномных исследований начали использовать массовое

параллельное секвенирование для определения последовательностей тотальной ДНК, выделенной из образца [Tyson et al., 2004, Venter et al., 2004].

Описание микробиологического сообщества становилось все более полным, а получение данных со временем все упрощалось. Использование секвенирования тотальной ДНК позволило определять последовательности генов в конкретном образце микроорганизмов и использовать их для решения биотехнологических задач. Также появилась возможность использовать данные о микробиологическом разнообразии сообществ для решения экологических, сельскохозяйственных и медицинских задач [Schmeisser et al., 2007].

Наиболее изученными с применением современных методов в настоящее время являются геотермальные источники национального парка Yellowstone (США). В водах именно этих источников был найден *Thermus aquaticus*, знаковый микроорганизм для молекулярной биологии, который стал источником первой термофильной полимеразы [Chien et al., 1976], позволившей в 1988 году разработать полимеразноцепную реакцию в том виде, в котором она сейчас используется [Saiki et al., 1988]. Необходимо отметить, что, несмотря на значительную глубину исследования микробиологического разнообразия этих источников, в настоящее время осуществляется масштабный проект по изучению их микробных сообществ с помощью современных методов метагеномного анализа [Inskip et al., 2013].

С распространением технологических основ биологии и знаний о термофильных микроорганизмах были описаны и другие геотермальные источники, расположенные в самых разных частях Земли, на всех континентах. В Южной Америке [Bohorquez et al., 2012], Африке [Tekere et al., 2013], Азии [Pagaling et al., 2012; Portillo et al., 2009;], Австралии [Holmes et al., 2001] и Европе [López-López et al., 2015]

В России существует большое количество малоизученных с точки зрения генетического разнообразия состава микробных сообществ геотермальных источников, расположенных в Прибайкалье, на Камчатке и

Курильских островах. Работы, направленные на изучение микробиологического разнообразия с использованием современных метагеномных подходов, весьма малочисленны и выполнены на микробных сообществах горячих источников кальдеры камчатского вулкана Узон [Gumerov et al., 2011, Rozanov et al., 2014, Chernyh et al., 2015]. На территории Прибайкалья проводились отдельные работы, но в настоящее время опубликованы работы, включающие метагеномный подход, основанные на классических молекулярно-биологических методах [Gaisinet al., 2015]. Такое состояние дел подчеркивает актуальность, важность и перспективность изучения микробных сообществ геотермальных источников, расположенных на территории России.

Изучение микробиологического разнообразия микробных сообществ геотермальных мест обитания позволяет накапливать знания и материал, которые могут быть успешно использованы для новых научных работ, направленных на поиск бактерий и их ферментов, актуальных для современной биотехнологии [Leis et al., 2013].

## **1.2 Роль микробиологического разнообразия в биотехнологии.**

Биотехнология находит все большее применение в современном мире, в том числе в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, производстве топлива и энергии, химической промышленности, медицине и т.д. [Singleton P., 2004]. В основе многих биотехнологических разработок лежат прототипы, взятые из природы. В первую очередь это относится к прокариотам, составляющим основу микробных сообществ различных обитаемых экологических ниш и являющихся источниками огромного разнообразия представляющих интерес белков.

Белки и катализаторы на основе живых клеток широко применяются во многих технологических процессах. Наибольшие объемы производства в настоящее время имеют ферменты, входящие в состав детергентов: протеазы, липазы, целлюлазы, амилазы и др. Следующие по объему использования ферментов - пищевая и текстильная промышленности, также значительны объемы использования ферментов в животноводстве и сельском хозяйстве [Jegannathan & Nielsen, 2013]. В больших объемах ферменты используются при гидролизе продуктов растениеводства до сахаров. В настоящее время это в основном крахмал, однако, в ближайшем будущем предполагается использование и лигноцеллюлозной биомассы.

Основным источником белков, которые можно было бы использовать для всего спектра вышеперечисленных направлений биотехнологии, являются микробные сообщества [Fogarty & Kelly, 2012]. Особый интерес для биотехнологии представляют микробные сообщества экстремальных мест обитания [Elleuche et al., 2014]. Именно ферменты экстремофилов, в основном термофилов, в настоящее время используются во многих биотехнологических процессах, таких как ожижение крахмала, переэтерификация жиров, отбеливание и т.д. Из экстремофильных микробных сообществ выделены эффективные варианты белков - липазы [López-López et al., 2014], амилазы [Sharma & Satyanarayana 2013], протеазы [Toplak et al., 2013] и многие другие.

Кроме получения ферментативных препаратов, все более широкое применение находит использование бактерий и других микроорганизмов в различных биотехнологических процессах в качестве живых катализаторов. Одним из путей получения более совершенных белков и микроорганизмов для биотехнологии являются методы генетической инженерии. Но, несмотря на то, что современные методы генетической инженерии применительно к бактериям достигли очень высокого уровня и позволяют значительно изменять характеристики микроорганизмов [Esvelt & Wang, 2013], по-прежнему большое значение имеют свойства самих исходных штаммов. Важность этих свойств можно продемонстрировать примером производства аминокислот с использованием бактериальных штаммов-продуцентов. Известно, что практически все генноинженерные штаммы, используемые для получения аминокислот, получены на основе бактерии *Corynebacterium glutamicum*. По простоте разработки с ними конкурируют штаммы на основе *E.coli*, и, по мере получения соответствующих более эффективных продуцентов, успешно вытесняют [Ikeda & Takeno 2013]. В растениеводстве для повышения урожайности и для улучшения сохранности урожая также широко применяются культуры бактерий [Bhattacharyya & Jha 2012]. Производство антибиотиков в настоящее время в значительной мере основано на использовании микроорганизмов из природных микробных сообществ или их генноинженерных производных [Raaijmakers et al., 2002]. Большое количество сложных органических соединений, например, витаминов, также производятся с использованием микроорганизмов [Burgess et al., 2009].

Источником новых видов и штаммов бактерий являются микробные сообщества, в том числе обитающие в экстремальных условиях. И именно последние в настоящее время становятся наиболее исследуемыми объектами с точки зрения возможности использования их обитателей в качестве живых катализаторов и источников новых ферментов с уникальными свойствами. Например, получение этанола из лигноцеллюлозы при помощи термофильных микроорганизмов может привести к повышению эффективности процесса за



счет расширения спектра используемых сахаров и снижению затрат за счет уменьшения объемов используемой воды, в сравнении с преобладающими в настоящее время процессами [Svetlitchnyi et al., 2013]. Большая скорость протекания химических реакций при более высоких температурах и возможность рекуперации выделяемой в ходе жизнедеятельности термофильных бактерий энергии делает их использование весьма перспективным в микробиологических процессах в биотехнологии [Frock & Kelly, 2012, F Vosma et al., 2013].

Развитие биотехнологии сопряжено с постоянным ростом потребления исходных субстанций. Такими субстанциями для большинства биотехнологических процессов являются сахара растительного происхождения, в первую очередь крахмал и сахароза. Эти субстанции — продукты сельского хозяйства, и их производство ограничено разными факторами. С ростом населения Земли и увеличением уровня его благосостояния возрастает потребность в продукции сельского хозяйства. Большое количество посевных площадей в настоящее время уже распаханно, а рост населения и повышение уровня жизни их сокращает. Рано или поздно такая ситуация может привести к катастрофическим последствиям, связанным с нехваткой продуктов питания. В связи с надвигающимся дефицитом исходных субстанций для биотехнологии, перед научным сообществом ставятся задачи поиска новых, более эффективных источников исходного сырья. Задача увеличения продукции сельского хозяйства в настоящее время решается разными путями – за счет мелиорации земель и введения ранее непригодных земель в оборот, повышения эффективности используемых культур, использования мало пригодных земель для выращивания энергетических культур, более полного использования продуктов растениеводства, в первую очередь лигноцеллюлозной биомассы.

Именно лигноцеллюлозная биомасса в настоящее время, считается наиболее перспективным источником сахаров [Sun et al., 2002]. Преимущества использования лигноцеллюлозной биомассы состоят в том, что она является

побочным продуктом сельского хозяйства, ее продуктивность с единицы площади посевов может быть очень высока, и для ее получения можно использовать растения, приспособленные к росту на малопригодных для традиционных сельскохозяйственных культур землях. Следует особо подчеркнуть, что лигноцеллюлозная биомасса разлагается до сахаров достаточно сложно, и этот процесс находится в стадии активной проработки в биотехнологическом и научном сообществе. С большой долей вероятности можно сказать, что решение вопроса переработки лигноцеллюлозного сырья будет найдено в процессе изучения микробных сообществ экстремальных экосистем.

### 1.3 Растительная биомасса как возобновляемый источник сахаросодержащего сырья

Лигноцеллюлозная биомасса растений в основном формируется за счет стеблей и листьев, в ее состав входят полимеры, выполняющие структурную и защитную функции. Именно для выполнения этих функций и сформировалась столь сложная композитная структура лигноцеллюлозной биомассы. Схематически строение клеточной стенки растения представлено на рисунке 1. Структурная часть растительной клетки представлена микрофибриллами, которые состоят из скомпонованной до кристаллической структуры целлюлозы, тяжи которой покрыты сверху гемицеллюлозными и лигниновыми полимерами, обеспечивающими связывание целлюлозных волокон, прочность на сжатие и устойчивость к воздействию живых организмов и ферментов.

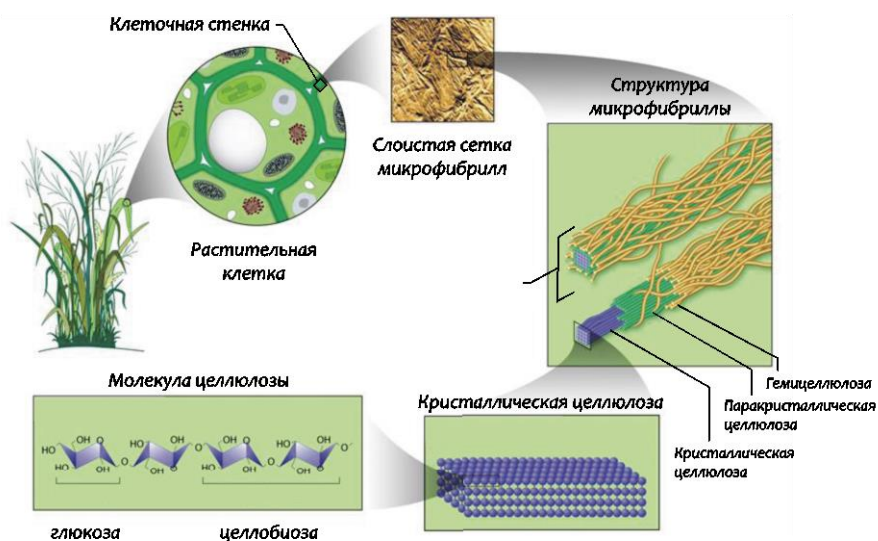


Рис. 1. Структура стенки растительной клетки.

Лигноцеллюлозная биомасса практически любого растения представляет собой композицию одних и тех же составных частей – экстрагируемых веществ, целлюлозы, гемицеллюлозы, крахмала, пектинов, лигнина, белка и золы. Разные виды растений различаются лишь по их соотношению (рис. 2). Целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал и пектины являются углеводами и представляют собой различные полимеры пента- и гексасахаров. Крахмал – полимер глюкозы, молекулы которой соединены  $\alpha$ -гликозидными связями.

Крахмал содержится в запасующих органах растений – клубнях, корнеплодах и семенах. Основным полисахаридом стеблей и листьев растений является целлюлоза. Это также полимер глюкозы, однако молекулы глюкозы в целлюлозном волокне соединяются  $\beta$ -гликозидными связями. Гемицеллюлозы – разветвленные полимеры стеблей и листьев растений, состоящие из различных комбинаций как пента-, так и гекса- сахаров. Пектины – разветвленные полисахариды, состоящие главным образом из молекул галактуроновой кислоты и её метилового эфира, наиболее распространены во фруктах и молодых тканях растений.

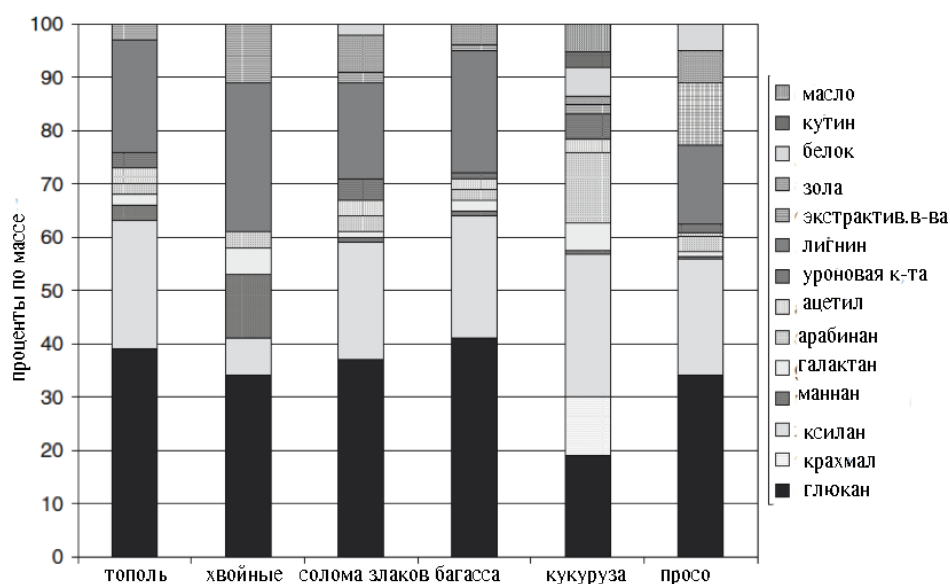


Рис. 2. Композиционный состав биомассы различных видов растений [Names B.R., 2009].

Целлюлоза – это гомополимер, включающий молекулы глюкозы, соединенные между собой  $\beta$ -1,4-связью (рис.1). Количество звеньев глюкозы в молекуле целлюлозы во вторичной клеточной стенке растений, как правило, варьирует от 7000 до 14000, в первичной клеточной стенке молекулы целлюлозы состоят примерно из 500 звеньев глюкозы. Между отдельными молекулами целлюлозы образуются ван-дер-ваальсовы и водородные связи, формирующие микрофибриллы и волокна целлюлозы. Внутри микрофибрилл все молекулы целлюлозы имеют одинаковую ориентацию,

восстанавливающие концы соседних сахарных цепей расположены на одном конце микрофибриллы, невосстанавливающие – на другом. Упорядоченные в микрофибриллы молекулы формируют кристаллическую решетку волокна. Степень кристаллизации целлюлозы в растительной ткани составляет 60-90%.

Содержание золы в растительной биомассе фактически характеризует неорганические компоненты. В зависимости от состава полисахаридов клеточной стенки, те или иные виды растений более предпочтительны для пищевых целей, для использования в качестве кормов для животноводства или для биоэнергетики [Henry R.J., 2010].

Как было упомянуто выше, в настоящее время активно исследуются возможности биотехнологии, направленные на использование растительной биомассы для получения из нее сахаросодержащей субстанции. Развитие в этом направлении ставит новые цели и для растениеводства. В первую очередь это получение новых технологичных культур, дающих максимальный выход биомассы, а не частей, запасующих легкодоступные сахара.

Использование растительной биомассы требует не только новых методов ее получения, но и технологий по ее преобразованию до легко используемой микроорганизмами субстанции. В отличие от простых путей получения сахаров из крахмала и сахарозы, получение сахаров из лигноцеллюлозной биомассы сопряжено с рядом трудностей. Основным препятствием на пути использования растительной биомассы в качестве источника сахаров для биотехнологических процессов является сложность гидролиза лигноцеллюлозной биомассы до сахаров. Над решением этой проблемы в настоящее время работает значительное количество лабораторий и коммерческих фирм по всему миру. Как и в большинстве случаев в биотехнологии, прототипы и исходные компоненты для этого процесса были найдены в природе.

#### **1.4 Гидролиз растительной биомассы в природе**

Развитие технологий переработки лигноцеллюлозной биомассы растений связано с преодолением тех биохимических особенностей, которые сформировались за миллионы лет эволюции и направлены на выполнение структурной и защитной функций растительной клетки. Первая особенность, существенно затрудняющая разложение лигноцеллюлозной биомассы, обусловлена строением композитного материала, состоящего из трех различных по физико-химическим свойствам компонентов: целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. Эти компоненты формируют переплетенную структуру и таким образом стерически и химически защищают друг друга от ферментативных, химических и физических воздействий. Вторая важная особенность, препятствующая осахариванию растительной биомассы, состоит в том, что целлюлоза как основной структурный элемент лигноцеллюлозной биомассы, представляет собой собранные в виде вытянутых нитей кристаллы. Кристаллическая решетка затрудняет доступ ферментов к молекуле целлюлозы и делает ее химически инертной. Именно эти свойства компонентов лигноцеллюлозной биомассы и определяют структуру технологических процессов, направленных на преобразование лигноцеллюлозной биомассы до сахаров [Teeri T.T., 1997].

Эволюция гидролиза растительной биомассы в природе шла параллельно с эволюцией растений. И именно благодаря наличию в природе этого процесса, в настоящее время научное сообщество имеет компоненты, в виде ферментов и микроорганизмов, разрушающих лигноцеллюлозу, для развития технологии ее переработки ферментативным способом.

Разрушение растительной биомассы микроорганизмами – один из ключевых моментов круговорота углерода в природе. Этот процесс осуществляется секретлируемыми микроорганизмами комплексами ферментов. Наиболее эффективными свободноживущими деструкторами растительного материала являются грибы, как высшие, так и низшие. Внеклеточная локализация ферментативного комплекса грибов и бактерий

привела к формированию повышенной стабильности белков, входящих в его состав. Это позволило широко применять лигноцеллюлозолитические ферменты, выделенные из простейших грибов в технологических процессах [Ljungdahl & Eriksson, 1985, Brown R.M., 2013].

История изучения ферментативных комплексов для разрушения лигноцеллюлозы или ее компонентов началась с того, что во время второй мировой войны американские военные столкнулись с проблемой гниения брезентовых палаток в тропиках, после чего были развернуты исследования по изучению биологических агентов, отвечающих за этот процесс [Reese E., 1976]. В результате этой работы был выделен плесневый гриб *Trichoderma viride* (или *T.reesei*, переклассифицированной в дальнейшем как *Hypocrea jecorina*). В настоящее время этот плесневый гриб представляет собой один из самых изученных продуцентов целлюлаз в мире [Martinez et al., 2008]. Его открытие стимулировало интенсивные исследования механизмов, при помощи которых происходит ферментативное разрушение растительной биомассы [Rouvinen et al., 1990, Linder et al., 1995, Divne et al., 1998, Harrison et al., 1998, Adney et al., 2009, Heinzelman et al., 2009].

Необходимо отметить, что сходные и в некоторой степени даже более эффективные комплексы ферментов были обнаружены у многих простейших грибов [Mukherjee et al., 2012, Dashtban et al., 2011]. Однако основная особенность целлюлозоразрушающего комплекса *Trichoderma reesei*, обеспечивающая именно его широкое использование, связана с максимально зафиксированной продуктивностью суммарного белка (более 100 г.) на литр культуральной среды [Cherry, & Fidantsef, 2003].

В настоящий момент среди препаратов, используемых для комплексного разрушения лигноцеллюлозы, преобладают полученные на основе белков грибного происхождения. Такая ситуация сложилась по причине того, что мезофильные бактерии и грибы обладают очень высокой продуктивностью и достаточно высокой стабильностью своих ферментативных систем, что удовлетворяло потребностям технологических

процессов на начальных этапах развития биотехнологии. Современные требования к условиям протекания биотехнологических процессов все чаще выходят за рамки возможностей этих белков. Это делает актуальным поиск более стабильных вариантов ферментов. Такие ферменты могут быть получены либо путем молекулярнобиологических модификаций их последовательностей, либо поиском в местах обитания с экстремальными условиями. Ферменты термофильных микроорганизмов обладают как высокой стойкостью к температуре, так и общей высокой стабильностью. К термофильным микроорганизмам относят те, которые живут при температуре более 62°C, а для поиска наиболее стабильных ферментов интересны более термостабильные микроорганизмы, к сожалению грибы в таких условиях не были обнаружены, что говорит о необходимости поиска необходимых генов в прокариотических микроорганизмах, в первую очередь в геноме бактерий.

В отличие от простейших грибов, бактерии обычно обладают значительно более бедными комплексами, направленными на деструкцию лигноцеллюлозы. Исследованные лигноцеллюлозоразрушающие комплексы, специализирующиеся на разложении лигноцеллюлозы бактерий, условно можно разделить на две группы - аэробные и анаэробные. Аэробные комплексы схожи по принципу организации с лигноцеллюлозоразрушающими комплексами грибов. Ферменты этих комплексов попадают во внешнюю среду и находятся в свободном состоянии. Целлюлозолитические системы анаэробных бактерий имеют принципиальные отличия. Ферменты этих бактерий приобрели способность направленно агрегировать в супрамолекулы и прикрепляться к клеточной стенке. Такие структуры получили название целлюлосом. Впервые целлюлосома была описана для *Clostridium thermocellum*. Целлюлосомы содержат от 15 до 25 различных целлюлаз и гемицеллюлаз, объединённых некаталитическим белком – скаффолдином в одну супрамолекулу, молекулярный вес которой составляет от 2 до  $6,5 \times 10^6$  кДа [Pinheiro et al., 2009]. Связывание со скаффолдином обеспечивают консервативные гидрофобные повторы,



называемые докеринами, и комплементарные им домены скаффолдина - кохезины. На поверхности одной клетки *Clostridium thermocellum* располагается несколько целлюлосом. Имобилизация ферментов в супрамолекулу повышает локальную концентрацию ферментативных доменов в одном месте, что повышает эффект от синергии совместной работы разных ферментативных доменов. Локализация микроорганизма в непосредственной близости к месту появления сахаров обеспечивает преимущества в доступе к образующимся в процессе гидролиза питательным веществам [Mohand-Oussaid et al., 1999].

Наличие полных ферментативных комплексов можно наблюдать в природе только у специализирующихся на разрушении лигноцеллюлозной биомассы микроорганизмов. Следует подчеркнуть, что отдельные ферменты, а в некоторых случаях практически полные комплексы ферментов, можно выявить практически у всех микроорганизмов.

Свободноживущие микробные сообщества способны эффективно разрушать растительную биомассу, однако этот процесс осуществляется ими достаточно медленно. В ходе эволюции экосистем возникли симбиотические связи микробных сообществ и многоклеточных организмов, которые многократно ускоряют этот процесс. К наиболее ярким примерам такого симбиоза относятся насекомые и млекопитающие, употребляющие в пищу растения. Благодаря измельчению и последующей химической обработке в желудочно-кишечном тракте доступность компонентов лигноцеллюлозы значительно повышается, что обеспечивает более высокую скорость работы ферментативных систем симбиотических микроорганизмов, и, соответственно, скорость извлечения питательных веществ. Известно, что наиболее эффективными разрушителями растительной биомассы являются термиты. [Watanabe et al., 1998]

Бактерии-деструкторы лигноцеллюлозы встречаются во многих микробных сообществах, как свободно живущих, так и симбиотических. Физико-химические условия существования таких бактерий находятся в очень

широком диапазоне: от холодных почв заполярного круга до гейзеров и подводных горячих источников с температурой более 100°C; при этом pH может варьировать от 1 до 12. Такое разнообразие условий обитания способствовало формированию комплексов ферментов, среди которых можно найти те, свойства которых подойдут для условий конкретного технологического процесса.

### **1.5 Технология гидролиза растительной биомассы до сахаров.**

Принципиальная схема процесса преобразования лигноцеллюлозной биомассы в сахара включает три стадии: подготовку растительной биомассы и ее измельчение (1); химическую или физико-химическую предобработку (2) и ферментативный гидролиз до моносахаридов (3).

В природе проблема разделения этих стадий успешно реализуется за счет симбиоза микроорганизмов с насекомыми, такими как кузнечики, жуки древоточцы или термиты, а также растительными млекопитающими. В древесине, в процессе физического измельчения при жевании, происходит структурная и композиционная модификация лигнина и частичная деградация углеводов, которые важны для эффективного разложения полимеров лигноцеллюлозы микроорганизмами-симбионтами. При дальнейшем продвижении по пищеварительному тракту происходит химическая обработка измельченного материала в основном при помощи кислот, тогда как ферментация полученного субстрата протекает при помощи ферментативных систем хозяина и симбиотической микрофлоры [Ljungdahl & Eriksson, 1985, Ke et al., 2012,]. Реализация такой схемы в промышленных масштабах ставит перед технологами и исследователями большое количество вопросов и, прежде всего, по причине больших объемов производства.

**Подготовка растительной биомассы и ее измельчение.** К механическим методам предобработки биомассы относят различные способы измельчения, такие как резка, дробление или помол. Степень измельчения варьирует от 10,0 – 30,0 мм при резке и до 0,2 – 2,0 мм при помоле [Sun & Cheng, 2002]. Самым простым производственным методом разрушения кристаллической структуры целлюлозного волокна является измельчение биомассы на мельнице [Inoue et al., 2008]. Предел измельчения (тонина помола) при этом составляет, как правило, 0,5 мм. Показано, что достаточно интенсивные способы измельчения, такие как помол, на шаровых и молотковых мельницах, улучшают ферментативный гидролиз растительной биомассы [Taherzadeh & Karimi, 2008]. В частности, для биомассы мискантуса

показано, что выход глюкозы и ксилозы в процессе ферментативного гидролиза различается более чем в два раза при использовании фракций биомассы 300 мкм и 60 мкм в пользу фракции 60 мкм [Yoshida et al., 2008].

Принципиально другим подходом предобработки растительной биомассы является экструзия. Процесс заключается в продавливании гранул полимера под высоким давлением через фильтры. При продавливании экструдером растительной биомассы нарушается структура целлюлозного волокна, повышается доступность углеводов для ферментов [Alvira et al., 2010].

**Химическая или физико-химическая предобработка.** После измельчения растительная масса подвергается физико-химическим методам предобработки. В виду того, что ферментативное разрушение лигнина крайне затруднено, первостепенная задача физико-химической обработки связана с делигнификацией целлюлозы. Второй важной задачей предобработки является нарушение кристаллической структуры целлюлозы. [Alvira et al., 2010] Кроме того, современные методы, используемые в промышленных масштабах, должны обладать достаточной эффективностью, чтобы быть экономически пригодными, а также быть экологически безопасными. Именно необходимость замены длительного время используемого, экологически небезопасного, кислотного гидролиза стимулировала развитие идеи ферментативного гидролиза.

Такое состояние дел привело к интенсивным исследованиям в направлении поиска эффективных и экологически безопасных методов предобработки растительного сырья. Основные эффекты различных современных методов предобработки на компоненты лигноцеллюлозной биомассы представлены в таблице 1.

Обозначения: X – слабый эффект; XX – сильный эффект; <sup>1</sup> – меняет структуру лигнина; <sup>2</sup> – увеличивает кристалличность. [найти и вставить ссылку на статью в которой приведена эта таблица]

Как было написано выше, эффективные методы предобработки должны характеризоваться двумя основными свойствами: разрушать кристаллическую структуру целлюлозы, разрушать или отделять лигнин. Одним из перспективных методов, удовлетворяющих этим условиям, оказался метод с применением ионных жидкостей (ИЖ). Особый интерес этот метод вызывает в виду возможности повторного использования химических реагентов, а также возможности интеграции стадий переработки. Это хорошо согласуется с современным трендом повышения эффективности и экологичности производств.

Таблица 1. Сравнение различных способов предобработки биомассы.

Метод предобработки лигноцеллюлозной биомассы	Декристаллизация целлюлозы	Увеличение площади доступной поверхности	Удаление гемицеллюлозы	Удаление лигнина	Образование ингибиторов
Слабые и разбавленные кислоты <sup>1</sup>		XX	XX		XX
Щелочи <sup>1</sup>		XX	X	XX	XX
Органические растворители(ПОР)			XX	XX	
Озонолиз <sup>1</sup>	X		X	XX	
Ионные жидкости	XX		X	XX	
Механическая	XX	XX	X	XX	
Паровой взрыв <sup>1,2</sup>		XX	XX		XX
Аммиачный взрыв (AFEX) <sup>1</sup>	XX	XX	X		
Рециклическая аммиачная перколяция <sup>1</sup>	XX	XX	X		
Углекислотный взрыв	XX	XX	XX		
Влажное окисление <sup>1</sup>	X	XX	X	XX	X
Влажное окисление и паровой взрыв	XX		XX	XX	X
Микроволновая/ Ультразвуковая	X	X			

Восстановление целлюлозы в присутствии ИЖ продемонстрировало высокую эффективность данного метода предобработки лигноцеллюлозной биомассы [Dadi et al., 2006]. Этот факт стимулировал рост научных публикаций, направленных на изучение этого метода. Однако оказалось, что полученный после обработки ИЖ материал нуждается в тщательной промывке, поскольку даже незначительные концентрации ИЖ в среде могут

существенно ингибировать работу ферментов [Zhao et al., 2009, Hong et al., 2012]. Увеличение уровня разбавления в результате промывки субстрата приводит к увеличению энергетических затрат при восстановлении ИЖ, что делает процесс экономически не выгодным [Park et al., 2012]. Решение этой проблемы может быть найдено в поиске новых вариантов ферментов способных работать в присутствии ИЖ.

Особенно большое значение стабильность ферментативных комплексов приобрела после того, как была предложена процедура предобработки при помощи ИЖ и ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного материала в одном реакторе, а перед регенерацией ИЖ находились в более концентрированных растворах. Эта процедура позволяет снизить количество используемой воды, что будет способствовать снижению энергозатрат [Kamiya et al., 2008].

Большинство коммерчески доступных ферментативных препаратов, предназначенных для полного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы, продемонстрировали крайне низкую устойчивость к воздействию ИЖ. Однако, в виду перспективности данного направления, некоторые группы исследователей инициировали работы по формированию новых ферментативных комплексов, способных достаточно эффективно функционировать в присутствии высоких концентраций ИЖ. Такие исследования продемонстрировали принципиальную возможность создания ферментативных лигноцеллюлозоразрушающих комплексов, устойчивых к воздействию ИЖ. Ферментативный препарат “JTherm”, собранный из термофильных ферментов бактерий, продемонстрировал сохранение 50% активности в присутствии 20% [EMIM]AcO при 70°C по сравнению с обычными условиями [Park et al., 2012]. Engel с соавторами оптимизировали ферментативный препарат для гидролиза восстановленной из ИЖ целлюлозы, способный функционировать в присутствии 10% (объемных) [DMIM]DMP, основываясь на данных об инактивации ферментов *T. reesei* Cel7A и Cel7B и *A. niger* β-глюкозидазы в присутствии этой ИЖ [Engel et al., 2012]. Некоторые

исследователи акцентировали свои работы на поиске ферментов у микроорганизмов, способных жить в присутствии ИЖ в среде на субстрате, полученном при помощи предобработки лигноцеллюлозы ИЖ [Simmons et al., 2014, Xu et al., 2015]. В частности, было показано, что устойчивость белков к воздействию ИЖ хорошо коррелирует с общей устойчивостью и их устойчивостью к химическим воздействиям. Имеющаяся в литературе информация и примеры, свидетельствуют о том, что одним из источников белков обладающих повышенной химической стойкостью, являются микроорганизмы экстремальных мест обитания, в первую очередь термальных [Engel et al., 2012].

Так как лигноцеллюлоза – это сложный многокомпонентный материал, для его разложения необходимо использовать значительное количество разных ферментативных активностей. В работе Barr с соавторами [Barr et al., 2012] был проведен анализ активностей, которые необходимы для успешного гидролиза целлюлозы и ксиланов после обработки ионными жидкостями. И было показано, что наибольшую активность демонстрируют наиболее полные комплексы, включающие как ферменты разрушающие целлюлозу, так и ферменты, разрушающие связи гемицеллюлозы. Это говорит об актуальности поиска широкого спектра ферментов, участвующих в разрушении лигноцеллюлозы.

**Выводы по обзору литературы.**

Изучение биологического разнообразия микробных мест обитания это не только данные для системы знаний в экологии, но и широкое поле для поиска новых предпосылок для биотехнологических производств. В представляемой диссертации мы осуществляли изучение биоразнообразия микробных сообществ геотермальных мест обитания. Но кроме обще-микробиологической и экологической точек зрения, нас не в меньшей степени интересовал поиск в изучаемых нами сообществах новых вариантов ферментов деструкции лигноцеллюлозы.

В ходе анализа имеющихся в литературе данных о современном состоянии дел в разработке методов гидролиза растительной биомассы было выбрано актуальное для развития исследований направление работы по поиску новых вариантов ферментов деструкции компонентов лигноцеллюлозы, способных работать при высоких температурах и сохраняющих свою активность при высоких концентрациях ионных жидкостей.



## **Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.**

### **2.1 Отбор образцов.**

Отбор проб донных отложений осуществляли стерильным пробоотборником. Пробы отбирали в 50 мл пробирки типа фалькон. Пробирки хранили при температуре окружающей среды до момента доставки в Институт. После доставки пробы в течение 3 дней были использованы для выделения термофильных бактерий. Далее образцы хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Пробы, предназначенные для выделения ДНК, фиксировали 50% этанолом.

Образцы микробных сообществ отбирали с использованием стерильного пробоотборника в 50 мл пробирки типа фалькон, образцы фиксировались 4% формалином.

### **2.2 Цитологическое исследование образцов бактериального мата**

Цитологическое исследование образцов бактериального мата проводили при помощи флюорисцентного микроскопа Axioskop A1, (Carl Zeiss, Germany) с использованием фильтра № 02 (G365, FT 395, LP420) окрашивание проводили ДАФИ (8 мкг/мл), а также в проходящем свете. Увеличение  $\times 1000$ . Микроскопирование проводили в центре микроскопии ИЦиГ СО РАН, Новосибирск.

### **2.3 Выделение ДНК из природных образцов донных отложений и бактериальных матов для метагеномных исследований.**

В пробирку (2 мл) вносили суспензию образца, при необходимости образец предварительно растирался в стерильной керамической ступке, чтобы осадок после центрифугирования составлял примерно 300 мкл. Центрифугировали при  $8000\times g$  10 минут. Осадок ресуспендировали пипетированием в 500 мкл буфера (100мМоль трис-НСl, рН 8, 100мМоль EDTA, рН – 8.0). Добавляли 30 мкл хлороформа, 200 мкл раствора лизоцима (50 мг/мл). Инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа с периодическим встряхиванием. Добавляли 100 мкл 10% ДСН, 100 мкл 10% саркозил (Sigma).

3 цикла: заморозка в жидком азоте – 2 мин, оттаивание при 65°C – 5 мин. Добавляли 100 мкл 10% поливинилпирролидон (Sigma) – замораживали в жидком азоте 2 мин, размораживали при 65°C. Добавляли 50 мкл 2.439 М CaCl<sub>2</sub> и инкубировали при 65°C с периодическим перемешиванием. Центрифугировали при 8000×g 20 мин. Супернатант переносили в чистую пробирку. Добавляли равный объем фенол/хлороформа – 1/1, встряхивали на вортексе в течение 2 мин, центрифугировали при 13000×g 10 мин. Супернатант переносили в свежую пробирку, опять встряхивали на вортексе 2 мин, центрифугировали при 13000 об/мин 10 минут. К супернатанту (на 400 мкл) добавляли 100 мкл 10М NH<sub>4</sub>Ac и 1 мл 96% этанола. Инкубировали в течении ночи при -20°C, затем, центрифугировали при 16000×g 20 минут. Промывали 70% этанолом, подсушивали при комнатной температуре и растворяли в воде.

#### **2.4 Амплификация фрагмента гена 16S рРНК для метагеномного анализа бентосного микробного сообщества источника Заварзина (Камчатка).**

Амплификацию проводили, используя универсальные праймеры: U341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3', где R – А или G, S - G или C) и U515R (5'-TTTCCGCGGCKGCTGVCAC-3', где K - G или R, V – А или S), разработанные на основе данных, представленных в работах Baker и Wang [Baker et al. 2003, Wang & Qian, 2009.]. 50 мкл смеси ПЦР содержали 1× буфер для фермента Herculase (Stratagene, США), 200 мкМ каждого dNTPs, 10 пикоМ каждого праймера, 100 нг ДНК, и 2.5 единицы фермента Herculase (Stratagene). Температурный профиль, использованный для проведения реакции: 3 мин при 95°C; 6 циклов (15 с при 95°C, 15 с при 50°C, 30 с при 72°C); 35 циклов (10 с при 95°C, 10 с при 55°C, и 30 с при 72°C). Низкая температура отжига в первые 6 циклов была взята для того, чтобы уменьшить преимущество последовательностей с разным уровнем совпадения. Продукты амплификации были очищены при помощи PCR purification KIT (Fermentas, Lithuania) и

использованы для следующей ПЦР с праймерами, содержащими технические последовательности и баркоды для “One-Way Reads” секвенирования. Праймеры разработаны согласно инструкции производителя (Roche, Switzerland). Полученный ПЦР-фрагмент был очищен при помощи геля электрофореза в 1,5% агарозном геле.

## **2.5 Амплификация фрагмента гена 16S рРНК для метагеномного анализа микробных матов источника Гаргинского (Прибайкалье).**

Амплификацию проводили, используя универсальные праймеры: U341F (5'- CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3', где R – А или G, S - G или C) и U806R (5'- GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3', где V - C или R, W – А или T), разработанные на основе данных, представленных в работах Baker и Wang [Baker et al. 2003, Wang & Qian, 2009.]. 50 мкл смеси ПЦР содержали 1× буфер для фермента Herculase (Stratagene, США), 200 мкМ каждого dNTPs, 10 пикоМ каждого праймера, 100 нг ДНК, и 2.5 единицы фермента Herculase (Stratagene). Температурный профиль, использованный для проведения реакции: 3 мин при 95°C; 6 циклов (15 с при 95°C, 15 с при 50°C, 30 с при 72°C); 35 циклов (10 с при 95°C, 10 с при 55°C, и 30 с при 72°C). Низкая температура отжига в первые шесть циклов была взята для того, чтобы уменьшить преимущество последовательностей с разным уровнем совпадения. Продукты амплификации были очищены при помощи PCR purification KIT (Fermentas, Lithuania) и использованы для следующей ПЦР с праймерами, содержащими технические последовательности и баркоды для “One-Way Reads” секвенирования. Праймеры с техническими последовательностями были разработаны согласно инструкции производителя (Illumina, USA). Полученный ПЦР-фрагмент был очищен при помощи геля электрофореза в 1,5% агарозном геле.

## **2.6 Секвенирование на GS Junior System sequencer**

Массовое параллельное секвенирование переменного V3-региона гена 16S рРНК было выполнено на приборе GS Junior System sequencer (Roche) с

использованием “ONE-WAY READS AMPLICON SEQUENCING” протокола в Институте Молекулярной Биологии РАН имени В.А. Энгельгардта, под руководством к.б.н. А.В.Кудрявцевой, зав. ЦКП “Геном”.

## **2.7 Обработка данных секвенирования.**

Предварительный отбор ридов по качеству осуществлялся при помощи пакета программ PRINSEQ [Schmieder & Edwards, 2011]. Далее, последовательности гена 16S рРНК со средней длиной около 187 оснований были отфильтрованы и обработаны при помощи пакета программ QIIME 1.8.0 [Caporaso et al., 2010] встроенной вспомогательной программой USEARCH [Edgar R.C., 2010]. Процесс обработки включает 11 последовательных шагов. На первом шаге последовательности сортируются по длине. На втором шаге последовательности дуплицируются, в итоге создается файл, который содержит только уникальные последовательности, и количество ридов, им соответствующее. На третьем шаге дуплицированные последовательности кластеризуются с порогом идентичности 97%. На четвертом шаге отсекаются химерные последовательности при помощи вспомогательной программы UCHIME [Edgar et al., 2011]. На пятом шаге в каждом кластере была выбрана репрезентативная последовательность, соответствующая центру кластера (создание операционных таксономических единиц (ОТЕ)). Типичная последовательность для каждого ОТЕ была сравнена с базой GREENGENES [DeSantis et al., 2006] при помощи make\_otu\_table.py, вспомогательной программы в пакете программ QIIME. Последующие шаги составляли последовательность действий, позволяющих представить конечный результат в виде таблицы в формате Excel, содержащей идентификатор ОТЕ, таксономическое положение каждого кластера, количество последовательностей, отнесенных к каждому кластеру.

## 2.8 Выделение термофильных бактерий

Для выделения штаммов термофильных бактерий образцы проб высевались на агаризованную среду, содержащую: триптон 10 г/л дрожжевой экстракт 5г/л, NaCl 10 г/л. Для этого 100 мкл суспензии донных отложений растирали при помощи шпателя Тригальского по поверхности агаризованной среды. Далее проводили культивирование в течение ночи при разных температурах.

Образцы высевали на чашки с 3 значениями pH - 8.0, 9.0, и 10.0, культивирование проводили при 55 и 65°C.

## 2.9 Выделение геномной ДНК.

Для выделения геномной ДНК термофильных бактерий 500 мкл культуры переносили в новые пробирки типа erpendorf, центрифугировали 1 мин. при 14000 об/мин, ресуспендировали полученный осадок в 1 мл бидистиллированной воды и снова центрифугировали 1 мин. при 14000 об/мин. После этого осадок ресуспендировали в 200 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 8.0), 1 мМ EDTA, 0.1% тритон X-100 и 20 мкг/мл лизоцима, и инкубировали 1 час при 37°C. Затем пробирку кипятили 5 мин на водяной бане. К полученной суспензии добавляли 400 мкл 6М гуанидинизотиоцианата и проводили очистку на колонках фирмы BioSilica (Новосибирск) в соответствии с рекомендациями производителя.

## 2.10 Секвенирование гена 16S рРНК бактериальных штаммов

Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили при помощи универсальных бактериальных праймеров 16S-8-f-B (5'-AGRGTTTGATCCTGGCTCA-3') и 16S-1350-r-B (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3') [Lane et al., 1985] Амплификацию проводили в объеме 30 мкл на приборе MyCycler<sup>tm</sup> (BioRad) с использованием TaqSE ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Новосибирск) согласно инструкции производителя. Использован следующий профиль реакции: стадия

денатурации, 2 мин при 95°C; 30 циклов: 95°C, 20 с, 52°C, 20 с, 72°C, 2 мин. Размер и количество получившегося продукта проверяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Очистку полученных ампликонов проводили путем добавления равного объема буфера, содержащего 20% PEG 6000 и 2.5M NaCl. После перемешивания смесь инкубировали 15 мин при 37°C и центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин. Осадок промывали 70% спиртом.

Секвенирование проводили в объеме 30 мкл на амплификаторе MyCycler<sup>tm</sup> (BioRad), для секвенирования использовали BigDye терминатор 3.1 (Applied Biosystems, США) 1 мкл на реакцию, 5×буфер 6 мкл, 1 мкл 10мкМ праймера, ДНК 100 нг, доводили водой до конечного объема. Использован следующий профиль реакции: стадия денатурации, 2 мин при 98°C; 30 циклов: 98°C, 5 с, 54°C, 30 с, 60°C, 4 мин; финальная элонгация, 10 мин при 60°C. Продукты секвенирования очищали при помощи центрифужных микроколонок, заполненных сорбентом Sephadex G75 (GE Healthcare, Великобритания). Для подготовки колонки суспензию Sephadex G75 (GE Healthcare) в дистиллированной воде прогревали при 60°C в течение двух часов. После чего суспензию охлаждали до комнатной температуры и инкубировали в течение ночи. На колонки наносили по 800 мкл осевшей суспензии под слоем жидкости. Центрифугировали при 800 об/мин в течение 3,5 минут. На поверхность полученной колонки наносили 25 мкл реакционной смеси после реакции секвенирования. Колонки помещали в 1,5 мл пробирки типа эппендорф и центрифугировали при 800 об/мин, в течение 3,5 минуты. Полученный раствор высушивали на вакуумном испарителе Concentrator plus (Eppendorf). Последующие секвенограммы образцов получали в ЦКП “Геномика”, далее их анализировали при помощи программы Chromas Lite 2.0 (Technelysium Pty Ltd., 2004).

## 2.11 Построение филогенетического дерева

Выравнивание последовательностей выполняли при помощи программы ClustalW реализованной на сайте (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Построение филогенетического дерева осуществляли при помощи алгоритма минимума эволюции, реализованного в программе Mega v. 6.0 [Tamura et al., 2013]. Последовательности генов 16S рРНК типовых штаммов брали из базы данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide)). Поиск идентификаторов последовательностей гена 16S рРНК типовых штаммов проводили в базе данных StrainInfo ([www.straininfo.net](http://www.straininfo.net)).

## 2.12 Геномное секвенирование термофильных бактерий.

Препараты ДНК для полногеномного секвенирования были получены с использованием набора genjet DNA purification kit (Fermentas) в соответствии с инструкцией производителя. NGS секвенирование проводили на двух платформах: MiSeq (Illumina, США), и PGM IonTrrent (Applied Biosystems)

**Секвенирование на платформе MiSeq.** Приготовление библиотеки проводили с помощью набора Nextera DNA sample prep (Illumina). Секвенирование проводили при помощи прибора MiSeq фирмы Illumina с использованием набора реагентов MiSeq reagent kit v.2 в лаборатории эволюционной геномики факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Секвенирование выполнено с.н.с. лаборатории, к.б.н. Логачевой Марией Дмитриевной.

**Секвенирование на платформе PGM IonTrrent.** Приготовление библиотеки проводили с помощью наборов Ion PGM™ Template OT2 400 и Ion PGM™ Template OT2 400 (Applied Biosystems). Секвенирование проводили при помощи прибора PGM IonTrrent (Applied Biosystems) с использованием набора реагентов Ion PGM™ Sequencing 400 Kit. Секвенирование выполнено к.б.н. Васильевым Г. В. в ИЦиГ СО РАН.

### **2.13 De novo сборка последовательностей геномов.**

*De novo* сборку последовательностей, полученных на приборе MiSeq (Illumina) проводили с использованием пакета программ SPAdes v. 3.1.0 [Bankevich et al., 2012]. Последовательности, полученные в результате секвенирования на приборе PGM IonTorrent (Applied Biosystems) собирали в контиги при помощи пакета программ Mira 4.0 [Chevreux et al., 2004].

Контиги длиной менее 1000 пар оснований были удалены. Поиск открытых рамок считывания и автоматическую аннотацию проводили с использованием пакета программ NCBI PGAAP ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok)). Результаты были депонированы в базы данных DDBJ/EMBL/GenBank.

### **2.14 Сборка экспрессирующих конструкций**

Для сборки векторных конструкций была использована методика, основанная на лигировании фрагментов, полученных с использованием урацил-содержащих праймеров и комплекса ферментов USER<sup>tm</sup> (New England Biolabs, США) [Geu-Flores et al., 2007]. Сборку конструкции осуществляли при помощи лигирования ампликона целевого гена и фрагмента вектора pQE30. ПЦР с использованием урацил-содержащих праймеров осуществляли с использованием фермента pfu turbo<sup>ox</sup> (Stratagene). Амплификацию фрагмента pQE30 осуществляли в объеме 50 мкл по следующей программе: 95°C – 2 минуты, далее 25 циклов (95°C -20 секунд, 55°C – 30 секунд, 68°C – 3 минуты 30 секунд). Амплификацию целевых генов осуществляли в объеме 50 мкл по следующей программе: 95°C – 2 минуты, далее 30 циклов (95°C -20 секунд, 55°C – 30 секунд, 68°C – 2 минуты). Фрагменты ДНК очищали на колонке PCR purification KIT (Fermentas), ДНК с колонки элюировали 40 мкл буфера для элюции. Для формирования “липких” одноцепочечных концов очищенные фрагменты ДНК обрабатывали комплексом ферментов USER<sup>tm</sup> (New England Biolabs), и ферментом MspI (СибЭнзим, Новосибирск) в однократном буфере для Taq полимеразы (СибЭнзим) при 37°C в течение 30 минут. Фермент MspI



(СибЭнзим) использовали для разрушения плазмиды, взятой в ПЦР. 5 мкл ампликона, содержащего векторную конструкцию, и 15 мкл ампликона, полученного с целевой последовательности клонируемого гена, смешивали и прогревали в амплификаторе до 43°C. Для лигирования 20 мкл однократного лигазного буфера, прогретого до 43°C, содержащего лигазу и АТФ, добавляли к смеси ампликонов, прогретой до 43°C. Лигирование осуществляли по следующей программе прогрева: 43°C 2 минуты, далее 30 циклов (43°C – 10 сек, 37°C – 5 сек, 32°C – 10 сек, 27°C – 15 сек, 22°C – 20 сек), хранение при 22°C в течение ночи. Инкубирование проводили в амплификаторе iCycler (BioRad). Лигазную смесь осаждали изопропиловым спиртом, промывали 70% этиловым спиртом, подсушивали и растворяли в 8 мкл ТЕ (10 ммоль Tris-HCl, 1 ммоль ЭДТА).

### **2.15 Трансформация клеток *E.coli* плазмидной ДНК**

Трансформацию клеток *E.coli* плазмидной ДНК проводили при помощи электропоратора Gene Pulser Xcell™ «BioRad» в соответствии с руководством фирмы-производителя. Компетентные клетки *E.coli* были предварительно приготовлены по стандартной методике [Sambrook et al., 1989] и хранились при -70°C. После электропорации клетки переносили в стеклянную пробирку с 1 мл среды LB без антибиотика. Пробирки с культурой помещали в суховоздушный термостат, инкубировали при 37°C в течение часа, после чего отбирали аликвоту и высевали на чашку с агаризованной средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Культивировали в течение ночи при 37°C.

### **2.16 Отбор клонов, содержащих целевые конструкции гликозид гидролаз.**

Для селекции клонов, содержащих целевые конструкции, выросшие колонии перекалывали параллельно на две чашки с агаризованной средой LB с ампициллином 100 мкг/мл. Культивировали в течение ночи при 37°C.

Колонии с одной из чашек переносили в 100 мкл TE-буфера и суспендировали. Суспензию клеток кипятили 5 мин на водяной бане и затем центрифугировали 1 мин при  $10000\times g$ . Супернатант анализировали на наличие вставок целевых генов в составе экспрессирующей конструкции методом ПЦР, с использованием праймеров pQE\_chek\_>f и pQE\_chek\_<r, представленных в таблице 2. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Выявление на геле после электрофореза продукта ПЦР, соответствующего по размеру расчетной длине, свидетельствовало о присутствии в анализируемой колонии плазмиды со вставкой целевого гена.

### **2.17 Скрининг клонов *E.coli* для определения продукции целевых ферментов при помощи электрофореза в ДСН-ПААГ.**

Отобранные клоны, содержащие подтверждённые при помощи ПЦР правильные плазмидные конструкции, пересевали в 50мл пробирки, содержащие 10 мл среды LB со 100 мкг/мл ампициллина и инкубировали в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$  и постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с интенсивностью 200 об/мин. Утром ночную культуру пересевали в свежую среду, для чего в 50мл пробирки, содержащие 10 мл среды LB со 100 мкг/мл ампициллина, вносили 200 мкл ночной культуры. Культивировали до достижения оптической плотности  $\text{OD}_{600}=0.6$  при  $37^{\circ}\text{C}$  и постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с интенсивностью 200 об/мин. По достижении нужной оптической плотности в среду добавляли ампициллин 100 мкг/мл и IPTG (Sigma) до концентрации 1 ммоль/л. Культивировали при  $32^{\circ}\text{C}$  и постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с интенсивностью 200 об/мин в течение 6 часов. Об индуцируемой экспрессии целевого гена в составе рекомбинантных плазмид судили по результатам электрофореза белков лизата анализируемых клонов в ДСН-ПААГ. Для этого 150 мкл клеточной культуры клонов *E.coli*, несущих экспрессирующие вектора pQE30 со встроенными последовательностями целевых генов, осаждали центрифугированием на  $16100\times g$  в течение 2 мин. К осадку добавляли 30 мкл

лизирующего ДСН-буфера для нанесения (0,05 М Трис-НСl рН 6,8; 2%-ный ДСН; 0,002%-ный бромфеноловый синий; 10%-ный глицерин; 5%-ный меркаптоэтанол), ресуспендировали и обрабатывали на ультразвуковой бане в течение 15 мин. Полученный лизат центрифугировали 2 мин на 16100×g, супернатант кипятили 5 мин при 95<sup>0</sup>С и наносили на полиакриламидный ДСН-гель для проведения электрофореза по методу Лэммли в мини-геле (8×10 см, толщиной 0,75 мм). На дорожку наносили по 20 мкл каждого образца, белки концентрировали в 4%-ном ДСН-ПААГ (акриламид/бисакриламид в соотношении 37,5:1, 0,1% ДСН, 0,125 мМ Трис-НСl рН 6,8, 0,1% ТЕМЕД, 0,05% ПСА) при силе тока 10 мА на гель и разделяли в 12%-ном ДСН-ПААГ (акриламид/бисакриламид в соотношении 37,5:1, 0,1% ДСН, 0,375 мМ Трис-НСl рН 8,8, 0,05% ТЕМЕД, 0,05% ПСА) при силе тока 15 мА на гель в электрофоретической камере Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad, США). Гели окрашивали Coomassie Brilliant Blue G-250 и фотографировали при помощи гелей документирующей системы VersaDoc MP4000 (BioRad, США).

Идентификацию экспрессируемых рекомбинантных белков проводили с помощью масс-спектрометрического анализа. Для этого белковые фракции вырезали из геля с помощью роботизированной системы EXQuest Spot Cutter (BioRad). Вырезанные кусочки геля переносили в пробирки и отмывали от красителя, инкубируя при 37<sup>0</sup>С в 200 мкл раствора 0.2М бикарбоната аммония в 50% ацетонитриле до исчезновения окраски. Раствор удаляли, гели высушивали в 100% ацетонитриле. Добавляли 150 мкл 0.2М бикарбоната аммония, 20 мкл 45мМ дитиотрейтола и инкубировали в течение 30 мин при 60<sup>0</sup>С. Снова высушивали гели и затем инкубировали в растворе 100 мМ йодацетамида в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации гели опять высушивали и проводили триптический гидролиз белка путем регидратации геля раствором модифицированного трипсина свиньи (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США) с концентрацией 15

мкг/мл в буфере, содержащем 40 мМ бикарбоната аммония и 10% ацетонитрила. Гидролиз проводили в течение 16-ти часов при 37°C.

Для экстракции пептидов в каждую пробирку добавляли по 20 мкл 5% трифторуксусной кислоты (ТФУ), (Sigma) в воде. Инкубировали 45 минут на шейкере при 36°C. Выделение и очистка триптических пептидов проводились при помощи Millipore ZIPTIP C18 (Millipore, USA). Очищенные пептиды смешивались с насыщенным раствором матрицы -  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Bruker, Germany) в 70% ацетонитриле (Merck), 0.1% ТФУ (Sigma). Аликвоту (1 мкл) полученной смеси наносили на металлическую мишень масс-спектрометра и высушивали на воздухе. Анализ проводили на приборе Ultraflex III (Bruker, Germany) с использованием следующих параметров: ускоряющее напряжение - 25 кВ, напряжение рефлектрона - 26.3 кВ, диапазон масс 500 - 3500 Да, задержка экстракции - 200 нс. Калибровку прибора производили с использованием стандартного триптического гидролизата бычьего сывороточного альбумина (Bruker, Germany) по следующим массам: 937.48 Да, 1163.63 Да, 1283.71 Да, 1305.71 Да, 1399.69 Да, 1439.81 Да, 1479.79 Да, 1567.7 Да, 1639.93 Да, 1724.84 Да, 1880.92 Да, 1907.92 Да, 2045.02 Да. Белки были идентифицированы по их триптической карте масс с использованием поискового алгоритма Mascot (<http://matrixscience.com/home.html>). Параметры поиска выставляли следующим образом: ошибка масс -  $\pm 0.05$  Да, число сайтов недорезки трипсином - 1, возможные модификации - окисление метионинов и карбамидометилирование цистеинов, база данных- NCBI.

## **2.18 Выделение рекомбинантных белков гликозидгидролаз из культуры.**

Клетки из всего объема культуры концентрировали в объеме 400 мл с помощью системы тангенциальной микрофльтрации с насосом SartoJet (Sartorius), после чего осаждали центрифугированием. Осадки ресуспендировали в 0,01М фосфатно-солевом буфере, pH 7.3-7.5 (Биолот, Россия). Клетки в суспензии лизировали с помощью ультразвукового

дезинтегратора CV 18 (Cole Parmer, 80 ватт, 20 кГц) в течение 15 минут пятисекундными импульсами с десятисекундными паузами при постоянном охлаждении во льду. Полученный клеточный лизат отделяли от нерастворимого осадка на центрифуге Eppendorf 5810 R в течение 25 минут при  $10000 \times g$  и температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Белок из супернатанта осаждали добавлением сульфата аммония. Ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидаза и  $\alpha$ -глюкуронидаза преципитировались при достижении 2М концентрации, эндо-1,4- $\beta$ -ксилаза и  $\alpha$ -L-арабинофуранозидаза - 3М. После добавления сульфата аммония смесь инкубировали 30 минут при  $4^{\circ}\text{C}$ , преципитат осаждали центрифугированием, супернатант удаляли. Полученные осадки хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  под слоем насыщенного раствора сульфата аммония.

Для приготовления белковых препаратов 50 мкл белкового осадка растворяли с помощью кратковременного воздействия ультразвука (100 ватт, 20 кГц) в 0,01М фосфатно-солевом буфере, затем центрифугировали для осаждения нерастворимых компонентов. Супернатант отбирали и использовали для дальнейшей работы.

## **2.19 Определение оптимума температуры и pH ферментативной реакции гликозид гидролаз.**

Определение оптимумов pH и температуры для проявления  $\beta$ -ксилозидазной активности ферментов эндо-1,4- $\beta$ -ксилазы и ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы проводили с использованием синтетического субстрата 4-нитрофенил- $\beta$ -D-ксилопиранозида, одним из продуктов ферментативного расщепления которого является п-нитрофенол. Для построения калибровочного графика использовали растворы, содержащие 80 мкл водного раствора п-нитрофенола с концентрациями от 1мМ до 5нМ, 10 мкл 0,01М фосфатно-солевого буфера, 10 мкл 0,5М раствора цитрата натрия и 200 мкл 1М раствора карбоната натрия. На основании оптической плотности стандартных растворов п-нитрофенола на длине волны 420 нм была получена

калибровочная кривая, представленная на рисунке 3. Полученный график демонстрирует, что калибровка на всем диапазоне измерения линейная.

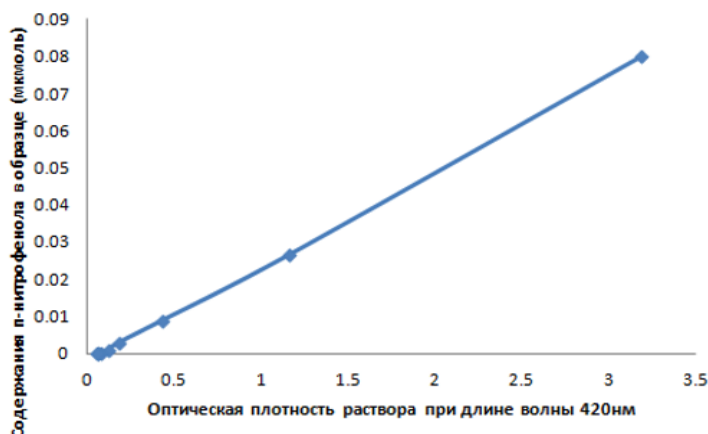


Рис. 3. Калибровочная кривая, оптическая плотность при длине волны 420 нм, в зависимости от содержания паранитрофенола в водном растворе.

Для определения активности полученных рекомбинантных ферментов эндо-1,4- $\beta$ -ксилазы и ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы при различных значениях pH и температуры были приготовлены реакционные смеси, содержащие по 8 мкл 10 мМ водного раствора 4-нитрофенил- $\beta$ -D-ксилопиранозида и по 72 мкл 0,02 М фосфатного буфера со значениями pH от 4 до 8 с шагом в 0,5. Все реакционные смеси готовили в охлаждаемых во льду ячейках 96-ти луночного планшета для ПЦР, всего было выполнено по 6 повторов для каждой точки из выбранного диапазона значений pH. Затем в каждую ячейку добавляли 10 мкл раствора фермента в 0,01 М фосфатно-солевом буфере. Планшет инкубировали в течение 15 мин в амплификаторе iCycler (BioRad) в режиме стабильного поддержания температурного градиента 45-70°C, затем реакцию останавливали добавлением 200 мкл 1 М водного раствора карбоната натрия и 10 мкл 0,5 М водного раствора цитрата натрия в каждую ячейку.

Для исследования активности  $\alpha$ -глюкуронидазы использовали « $\alpha$ -Glucuronidase kit» (Megazyme) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Реакцию проводили в 96-ти луночном ПЦР-планшете. Исследовали свойства фермента в том же диапазоне значений pH и температуры, что и для ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы и эндо-1,4- $\beta$ -ксилазы.

Для контроля был использован белковый препарат, полученный при культивировании штамма *E.coli* XL-blue, несущего исходную конструкцию pQE30.

## **2.20 Определения гликозид гидролазной активности ферментов на естественном субстрате.**

Для определения способности ферментов к расщеплению естественного субстрата были приготовлены следующие буферные растворы: 100 мкл 20 мМ фосфатного буфера pH=5.5 и 100 мкл раствора ксилан-1,4-β-ксилозидазы; 100 мкл 20 мМ фосфатного буфера pH=6.5 и 100 мкл раствора эндо-1,4-β-ксиланазы; 100 мкл 20 мМ фосфатного буфера pH=6.5 и по 50 мкл растворов эндо-1,4-β-ксиланазы и ксилан-1,4-β-ксилозидазы; 100 мкл 20 мМ фосфатного буфера pH=5.5 и по 50 мкл растворов эндо-1,4-β-ксиланазы и ксилан-1,4-β-ксилозидазы; 200 мкл 20 мМ фосфатного буфера pH=6.5. Затем каждую из смесей соединили в стеклянных виалах объемом 1,5 мл с 200 мкл водного коллоидного раствора гемицеллюлозы мискантуса с концентрацией 100 г/л, pH=6.0.

Ферментативный гидролиз субстрата проводили в течение 18 часов при 55°C в термостатированном шейкере при скорости перемешивания 200 об/мин. Затем суспензию из стеклянных виал перенесли в центрифужные пробирки, центрифугировали для осаждения нерастворимых компонентов и определяли количество восстанавливающих сахаров по стандартной методике [Miller G.L., 1959].

### Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Геотермальные источники, расположенные в рифтовой зоне Прибайкалья и на Камчатке, мало изучены при помощи современных высокопроизводительных методов молекулярной биологии. Воды источников, расположенных на этих территориях, имеют большое разнообразие по pH. В долине реки Баргузин (Прибайкалье) располагаются выходы источников, обладающих показателем pH-больше 8.0 и температурой на изливе до 75°C. В отличие от источников Прибайкалья источники кальдеры вулкана Узон (Камчатка) имеют более низкий показатель pH, от 2.5 до 7.0. Температура вод источника на изливе достигает 100°C. Характерной особенностью геотермальных источников является наличие макрообразований, сформированных микроорганизмами (микробных матов).

#### 3.1 Микробные маты геотермальных источников Прибайкалья.

Образцы донных отложений и микробных сообществ геотермальных источников долины реки Баргузин (Прибайкалье) были отобраны сотрудниками лаборатории молекулярных биотехнологий в ходе комплексных экспедиций 2007 и 2010 годов, образцы микробных матов геотермальных источников Прибайкалья и Камчатки, а также донные отложения геотермальных источников Камчатки были отобраны с.н.с., к.б.н., А.В. Брянской, выполненных в рамках интеграционного междисциплинарного проекта СО РАН № 114 «Организация живых систем и геохимическая эволюция гидротерм в зонах современной вулканической деятельности».

На рисунке 4 представлены места, в которых производилось взятие проб в долине реки Баргузин (Прибайкалье). *Источник Змеиный* (рис.4, №1) расположен в непосредственной близости от берега Байкала, на берегу бухты Змеиная, и имеет 2 выхода. Температура воды в точке излива во время отбора проб составила 44°C, pH - 9,3. *Источник Умхей* (рис.4, №2) имеет несколько выходов с температурой 46°C и pH 9,8. *Источник Кучигер* (рис.4, №3)



расположен у подножия сопки, воды источника выходят в заболоченной местности. Температура воды в районе выхода в месте отбора проб составила 46°C, рН 9,6. **Источник Аллинский** (рис.4, №4) расположен в долине реки Алла, притока реки Баргузин, между скалистыми сопками и имеет множественные выходы (около 70-ти), расположенные в потоке реки или в непосредственной близости от нее. Температура воды в районах выхода составляла от 40 до 75°C, рН воды - 9,5. **Гаргинский источник** (рис.4, №5) выходит одним потоком из небольшой пещеры в сопке, по ходу потока образует кремниевые отложения.

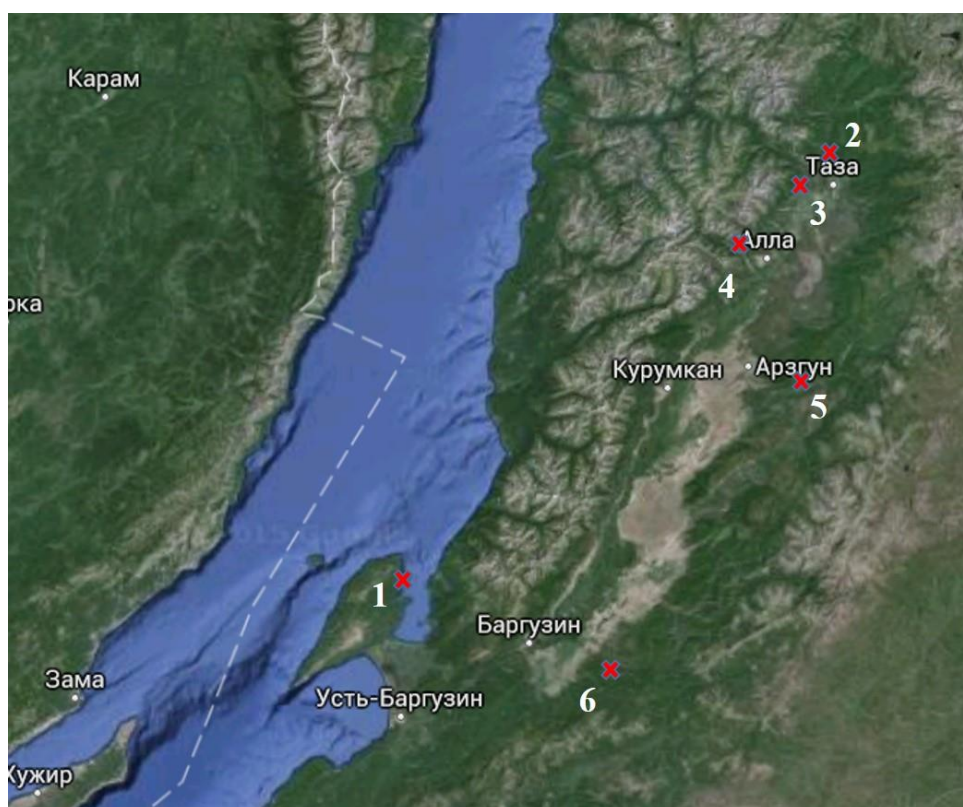


Рис. 4. Долина реки Баргузин. Красными крестиками отмечены места отбора проб.

Температура выхода 74°C, рН 8,1. **Уринский источник** (рис.4, №6) расположен на берегу реки Уро в кулуаре склона горы и включает около 20 выходов с максимальной температурой воды 72°C и рН 9,2.

В целом геотермальные источники, из которых производился отбор проб, представляют собой выходы щелочных гидротерм с максимальной температурой до 75°C и pH от 8.1 до 10.0. Во всех исследованных гидротермах наблюдалось образование сложноорганизованных слоистых микробных сообществ, называемых микробными матами. Сложность устройства этих образований была выше в водах более высокотемпературных источников. Предполагается, что эти образования могли эволюционно сформироваться на ранних этапах развития Земли, когда значения температуры на поверхности были выше современных [Заварзин Г. А., 2003].

Наиболее разнообразные маты наблюдались в трех источниках, температура вод которых на изливе достигала 75°C. Это источники Гаргинский, Аллинский и Уринский.

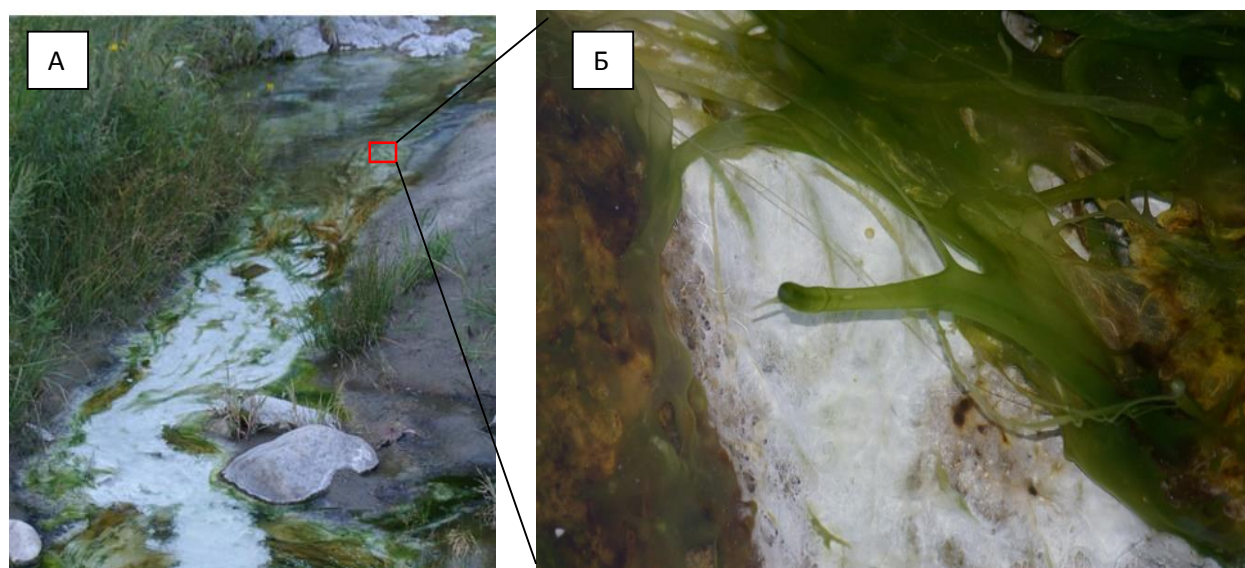


Рис. 5. Микробные образования источника Аллинского. А – общий вид; Б – микробные сообщества, образованные скоплениями цианобактерий (зеленый цвет) и скоплениями тиобактерий (белый цвет).

В связи с тем, что воды Уринского и Аллинского источников смешиваются с поверхностными потоками и образуют большое число зон, имеющих различные физико-химические свойства, разнообразие микробных образований, оцениваемое визуально, было значительно шире по сравнению с

источником Гаргинским. В водах источника Аллинского обнаружены микробные сообщества, имеющие зеленый, белый или коричневый цвет. На рисунке 5 (А) представлен общий вид микробного сообщества, характерный для данного источника, в котором выделяются белые участки, образованные тиобактериями, и зеленые – образованные цианобактериями (рис.5, Б).

Так как поток поверхностных вод в источнике Уринском был значительно меньше в сравнении с источником Аллинским, микробные сообщества на всем протяжении потока от самых верхних его выходов и до впадения в реку Уро представляли собой сплошной покров, толщина которого доходила до 10 сантиметров. Представленные на рисунке 6(А и Б) микробные сообщества характеризовались преимущественно зелено-бурым окрашиванием с вкраплениями белых и розовых фрагментов, образованных

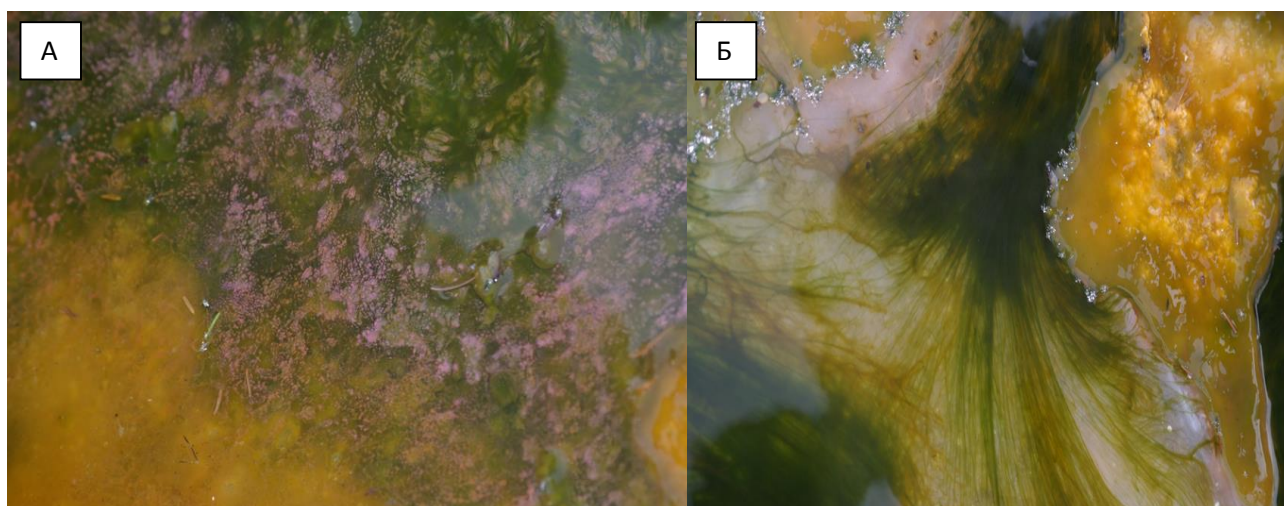


Рис. 6. Микробные образования источника Уринского. А – общий вид поверхности микробного мата; Б – нитчатые цианобактериальные образования в каналах поверхности мата.

соответственно серными бактериями, цианобактериями и пурпурными бактериями.

Необходимо отметить, что в источниках с более низкой температурой воды уменьшалось и разнообразие обнаруживаемых в них микробных

сообществ. В источнике Умхей на поверхности донных отложений выявлены небольшие скопления цианобактерий, тогда как сложноорганизованные сообщества в виде матов отсутствовали. На рисунке 7 представлен общий вид бактериального сообщества источника Змеиный, в котором также отсутствуют сложноорганизованные сообщества. Сообщество имеет яркую бриллиантово-зеленую окраску, свидетельствующую о присутствии фототрофов, но у него нет сложной структуры.



Рис. 7. Цианобактериальные сообщества источника Змеиный.

Геотермальный источник Гаргинский несколько отличается от других источников рифтовой зоны Прибайкалья. Эти отличия выражены в том, что воды этого источника выходят на поверхность одним мощным потоком, а не как группа мелких источников, что можно наблюдать в остальных гидротермах долины реки Баргузин. Кроме того, рН источника немного меньше в сравнении с другими источниками, расположенными в районе исследования, и составляет 8.1. Максимальная температура выхода в момент отбора проб составила 74°C. Формирование микробных матов наблюдается практически по всему течению ручья от выхода на поверхность до впадения в реку Гарга, приток реки Баргузин.

### **16S рРНК метагеномный анализ микробного мата источника Гаргинского (Прибайкалье).**

Для анализа состава микробного мата источника Гаргинского был использован метод метагеномного секвенирования гена 16S рРНК. Пробы микробных матов были отобраны в ходе экспедиции в долину реки Баргузин в сентябре 2010 года. Образцы микробных образований были отобраны в 4 точках от излива до температуры 45°C. Фотографии цианобактериального мата представлены на рисунке 10.

Точка Га1 – расположена вблизи выхода термальных вод на поверхность, температура воды в момент отбора проб составила 74°C. Микробные сообщества представлены немногочисленными обрастаниями на камнях (образец Га-1).

Точка Га2 (Рис. 8,А.) – термальный ручей, температура 70°C. По краю ручья развиваются желтые желеобразные микробные маты. Мат толстый (до 4 см), очень плотный, слоистый. Верхний слой мата (образец Га2 верх) представляет собой тонкую (до 2 мм) пленку, прочно сцепленную с нижележащим слоем. Средний слой менее плотный, состоит из двух частей: верхняя – белесая, нижняя, примыкающая к нижнему слою, – зеленая. Толщина данного слоя – до 2 см. Нижний слой – белесый, студенистый, прикрепленный к субстрату. Толщина слоя – около 1 см.

Точка Га3 (Рис. 8,Б.) – продолжение термального ручья, температура 55°C. По ручью развиваются плотные маты желтого и зеленого цвета толщиной 2-3 см. Верхний слой (образец Га3 верх) – желто-зеленая пленка толщиной около 2 мм, плохо отделимая от среднего слоя. Средний слой (образец Га3 сред) пленчато-студенистый белесовато-зеленый. Верхние два слоя сходны по структуре с микробным матом точки Га-2, но имеют более зеленую окраску. Нижний слой мата (образец Га3-низ) белесый, прикрепленный к субстрату, толщиной около 1 см.

Точка Га4 – продолжение термального ручья, температура 46-43°C. Первые два слоя (образцы Га4-верх и Га4-сред) сходны с микробным матом точки Га3. Нижний слой мата данной точки, очевидно, представляет собой отмерший и высохший мат предыдущего сезона. Внешне это относительно плотная «пленка» телесного цвета, толщиной 0,3-0,5 см. Кроме структурированных микробных матов в данной точке также развивались рыхлые ярко-зеленые пленки (проба Га4 зел).

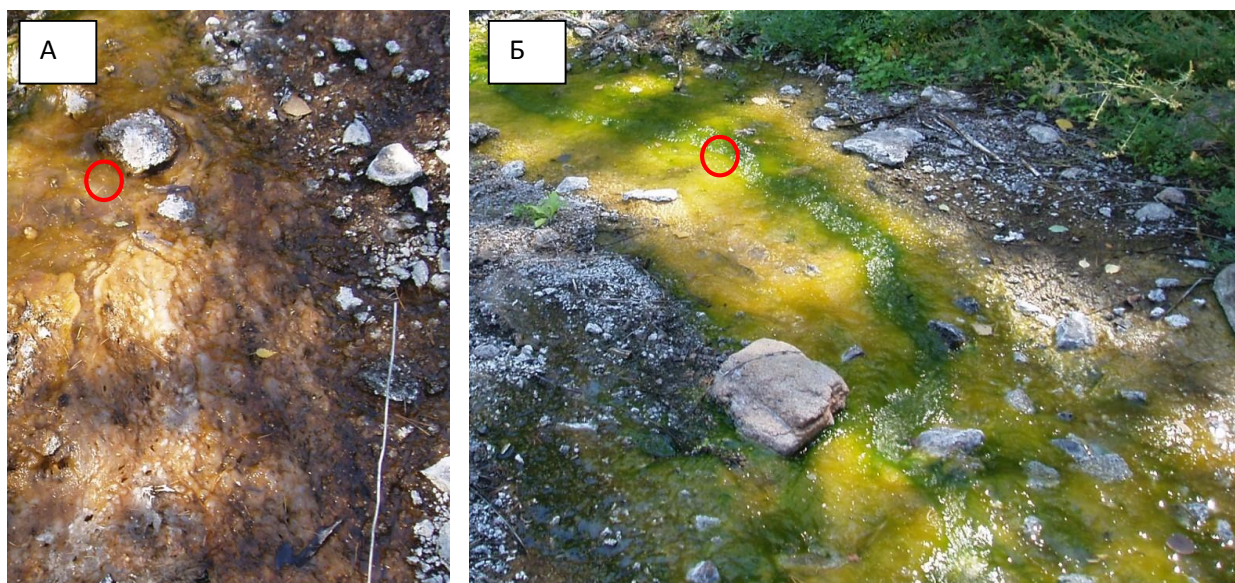


Рис. 8. Цианобактериальный мат источника Гаргинского. А – микробный мат в верхней части потока, красным кругом отмечено место отбора пробы точка Га2; Б – микробный мат в средней части потока, красным кругом отмечено место отбора пробы точка Га3.

Из образцов, описанных выше, была выделена ДНК и получены амплисек библиотеки гена 16S рРНК согласно протоколам, представленным в Главе 2. Секвенирование на приборе MiSeq было выполнено в лаборатории эволюционной геномики факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Секвенирование выполнено с.н.с. лаборатории, к.б.н. Логачевой Марией Дмитриевной. После биоинформатической обработки полученных последовательностей, для каждого из восьми исследованных образцов были

получены более 13 тысяч последовательностей, прошедших фильтрацию по качеству. Полученные последовательности были разделены на кластеры (оперативные таксономические единицы - ОТЕ), по уровню гетерогенности соответствующие одному виду. Репрезентативные последовательности ОТЕ сравнивали с базой данных GREENGENES [DeSantis et al., 2006] с использованием скрипта QIIME make\_otu\_table.py. Доля «репрезентативных» последовательностей, филогенетическое положение которых не было определено даже до типа, составила от 5 до 14% для каждой образца.

Представленность различных типов микроорганизмов в исследованных образцах согласно 16S рРНК метагеномному анализу приведена на рисунке 9 в виде накопительных столбчатых диаграмм.

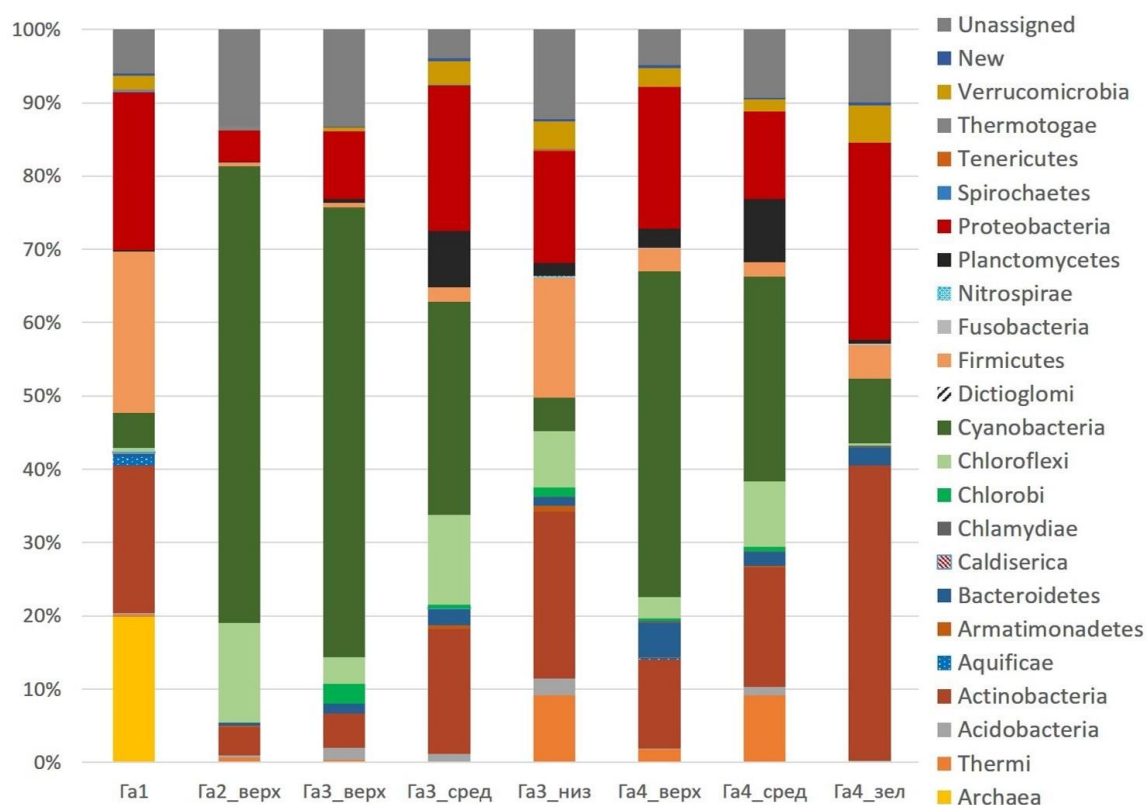


Рис. 9. Представленность различных типов микроорганизмов в исследуемых образцах согласно 16S рРНК метагеномному анализу.

В самой высокотемпературной точке развитие микробных образований наблюдается только на границе с воздухом, где можно наблюдать резкий градиент температур за счет охлаждения от воздуха и близлежащих пород. Представленность различных типов микроорганизмов в этой точке приведена

в виде столбчатой диаграммы на рисунке 9 Га1. Содержание фототрофных микроорганизмов в образце было не значительное, ~6%. Наиболее широко представленными микроорганизмами в данной точке являются бактерии типов Firmicutes (*Bacilli*) (21,9%) и Proteobacteria (21,4%), а также Archaea (19,8%).

Последовательности представителей домена Firmicutes, обнаруженные в этой точке, в основном принадлежали мезофильному виду, *Bacillus pumilus* [Kunst et al., 1997]. Второй по численности была последовательность, на одну букву отличающаяся от группы видов, относящихся к роду *Staphylococcus* (NCBI/refseq\_rna).

Домен Archaea был выявлен значительно позже в сравнении с бактериями, но его изучение развивалось очень интенсивно. В этой точки последовательности архей занимали 19.8% от всех последовательностей. В других точках последовательностей, относящихся к домену Archaea, не было обнаружено, за исключением образца Га3-сред, где они присутствовали в количестве 0.04% от общего числа последовательностей.

**Сообщество архейных микроорганизмов.** Большинство ОТЕ типа Archaea, полученных в ходе анализа, не имели близкого родства с известным представителям типа. С использованием последовательностей, полученных ОТЕ, было построено филогенетическое древо, представленное на рисунке 10. Последовательности гена 16S рРНК известных микроорганизмов были взяты из базы данных NCBI(refseq\_rna). В процессе отбора, при помощи алгоритмов BLAST выбирали последовательности, наиболее сходные с последовательностями, полученными в работе. Как можно видеть, близкое родство к культивируемым археям демонстрируют некоторые представители Crenarchaeota (ОТЕ-1, ОТЕ-34, ОТЕ-72), остальные последовательности архей не имеют близкого родства к известным микроорганизмам. В большинстве случаев, для них не было обнаружено последовательностей с высоким уровнем схожести и среди некультивируемых микроорганизмов. Это говорит о высокой эндемичности описываемого архейного сообщества.



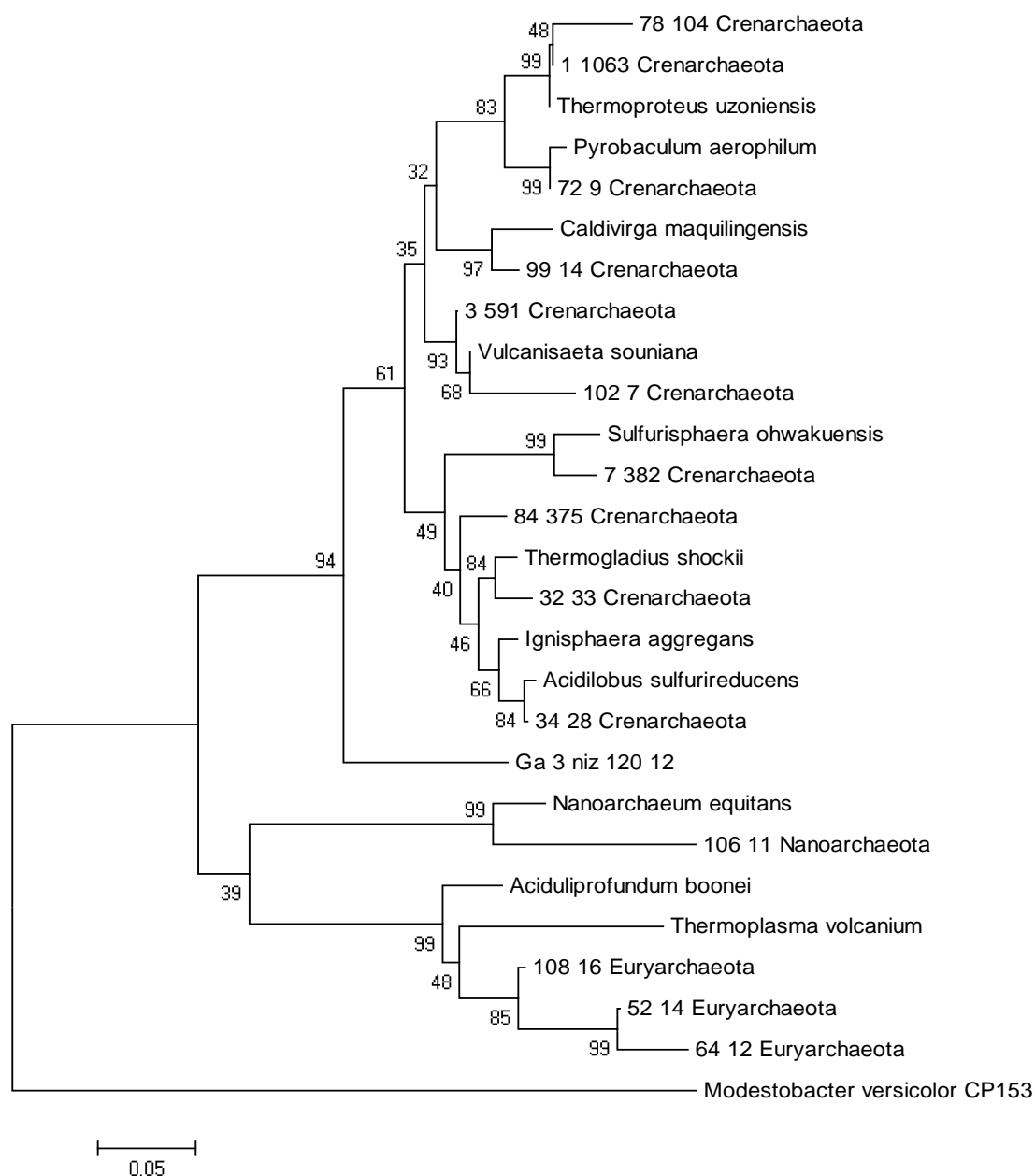


Рис. 10. Филогенетическое дерево, построенное с использованием последовательностей, обнаруженных в пробе Га-1 и последовательностями гена 16S рРНК наиболее близкородственных, микроорганизмов. Филогенетическое дерево было построено с использованием алгоритма минимума эволюции, реализованного в пакете программ MEGA6. Внизу слева - масштаб в количестве замен на сайт. Цифрами около разветвлений отмечена бутстреп поддержка. Названия обнаруженных нами ОТЕ

содержат: № ОТЕ, количество последовательностей и принадлежность к соответствующему типу архей.

Наиболее представленным типом архей оказались Crenarchaeota. ОТЕ–1, составляющая 7.9% от всех последовательностей и почти половину всех последовательностей архей, очень близка к *Thermoproteus uzonensis* [Mardanov et al., 2011]. Эта архея была выделена из проб, отобранных в кальдере вулкана Узон на Камчатке. Согласно данным, представленным в статье, ее оптимум роста наблюдается при pH 5.5. В источнике Гаргинском она активно развивается при более высоком pH. Еще один ОТЕ–3, 4.4% от общего числа последовательностей, имеет уровень схожести 99% к штамму типа Crenarchaeata *Vulcanisaeta souniana*, выделенному из горячих источников Японских островов [Itoh et al., 2002]. Эта архея также относится к ацидофильным и анаэробным. Для других ОТЕ–7 и ОТЕ–84, имеющих долю от общего числа последовательностей по 2.8%, не было выявлено близкого сходства последовательности фрагмента гена 16S рРНК к последовательностям известных видов. Для ОТЕ–7 последовательности со степенью сходства 96% были обнаружены в геотермальных источниках Японии [Kimura et al., 2010] и Таиланда (NCBI/nr). Для последовательности ОТЕ – 84 последовательности со степенью сходства 97% были обнаружены в геотермальных источниках Исландии [Mirete et al., 2011], со степенью сходства 96% к последовательности, обнаруженной в горячих источниках Тенгчонг (Китай). ОТЕ–78, занимающие долю ~0.7% от общего числа последовательностей, имели уровень сходства с последовательностями некультивируемых микроорганизмов менее 92%. Другие последовательности были представлены менее значительно, а уровень их сходства с известными микроорганизмами, в большинстве случаев, был менее 95%.

**Цианобактерии микробного мата источника Гаргинского.** Основа сообщества микробного мата источника Гаргинского (точки Га2, Га3, Га4) - цианобактерии, они являются продуцентами основной части органического

вещества и формируют структуру микробного мата. Во всех исследуемых образцах микробного мата наибольшую долю от всех цианобактерий занимали представители филогенетически ближе всего расположенные к *Leptolyngbya* sp. O-77, выделенному из горячих источников Японии (NCBI/nr) [Nakamori et al., 2014]. Схожесть всех наиболее представленных ОТЕ с последовательностью этого штамма составила более 99%. Доминирование *Leptolyngbya* наблюдается в микробных матах нейтральных и щелочных геотермальных источников. *Leptolyngbya* были выявлены в горячих источниках Румынии [Coman et al., 2013], Тенгчонг (Китай) [Pagaling et al., 2012], Neoquen (Аргентина) [Urbieto et al., 2015], Йеллоустон (США) [Lau et al., 2005], доминировали в микробных матах щелочных гидротерм северо-востока Австралии [McGregor et al., 2008], Гренландии [Roeselers et al., 2007]. Доминирование цианобактерий, наиболее близко относящихся к *Leptolyngbya*, наблюдается и в других источниках Прибайкалья согласно данным Gaisin с соавторами [Gaisin et al., 2015].

Кроме *Leptolyngbya* в отдельных образцах значительную представленность имеет род *Synechococcus*, ОТЕ-1 в образце Га2-верх, и представители *Nostocaceae*, ОТЕ-4 в образце Га3-сред. ОТЕ-1 Га2-верх, 17.5% от общего числа последовательностей образца Га2-верх, имеет наибольшее сходство >99% к последовательностям, обнаруженным в горячих источниках Аллинском и Уринском (NCBI/nr). ОТЕ-4 Га3-сред, 9.0% от общего числа последовательностей Га3-сред, имеет наибольшее сходство 96% к цианобактериям, выделенным из микробного мата, обнаруженного на цементном заводе в Индии (NCBI/nr KF746950, KF746951). Представители *Synechococcus* и *Nostocaceae* широко распространены в микробных матах геотермальных источников и встречаются повсеместно.

**Аноксигенные фототрофные бактерии микробного мата источника Гаргинского.** Несмотря на то, что в микробном сообществе не было обнаружено слоев с доминированием аноксигенных фототрофов, последовательности, относящиеся к ним, были выявлены во всех образцах. В

некоторых образцах они занимали долю более 10% от общего числа последовательностей. Анализ аноксигенных фототрофов выявил наличие трех групп микроорганизмов, две из которых относятся к типу *Chloroflexi*, это ОТЕ порядка *Chloroflexus* и *Anaerolineae* [Yamada et al., 2006], еще одна группа, это микроорганизмы, относящиеся к типу *Chlorobi* [Bryant et al., 2012]. Филогенетическое дерево, построенное с использованием наиболее многочисленных ОТЕ, отнесенных к соответствующим группам, представлено на рисунке 11. Близкое родство к известным микроорганизмам имеют представители класса *Chloroflexia* [Pierson & Castenholz, 1974; Tang et al., 2011]. ОТЕ, отнесенные к двум другим группам, имеют последовательности, сходные с ближайшими известными микроорганизмами менее чем на 83% (NCBI/refseq\_rna).

Метаболически представители типа *Chloroflexi* являются факультативными анаэробами, аноксигенными фототрофами [Collins et al., 2009; Pierson & Castenholz 1974]. Представители типа *Chlorobi* известны как анаэробные, аноксигенные фототрофы, способные использовать в качестве акцепторов электронов сульфид и тиосульфат [Frigaard et al., 2003]. Наиболее близкие последовательности гена 16S рРНК к ОТЕ, полученным в работе были обнаружены в гидротермах, расположенных в пределах одной рифтовой зоны Прибайкалья, источниках Аллинском и Уринском (NCBI/nr) [Gaisin et al., 2015].

Представители аноксигенных фототрофных бактерий широко распространены в микробных матах геотермальных источников: Японии [Everroad et al., 2012], Йеллоустона (США) [Boomer et al., 2009], Камчатки [Akimov et al., 2013], Таиланда [Portillo et al., 2009], Тибета [Lau et al., 2009] и Анд [Engel et al., 2013].

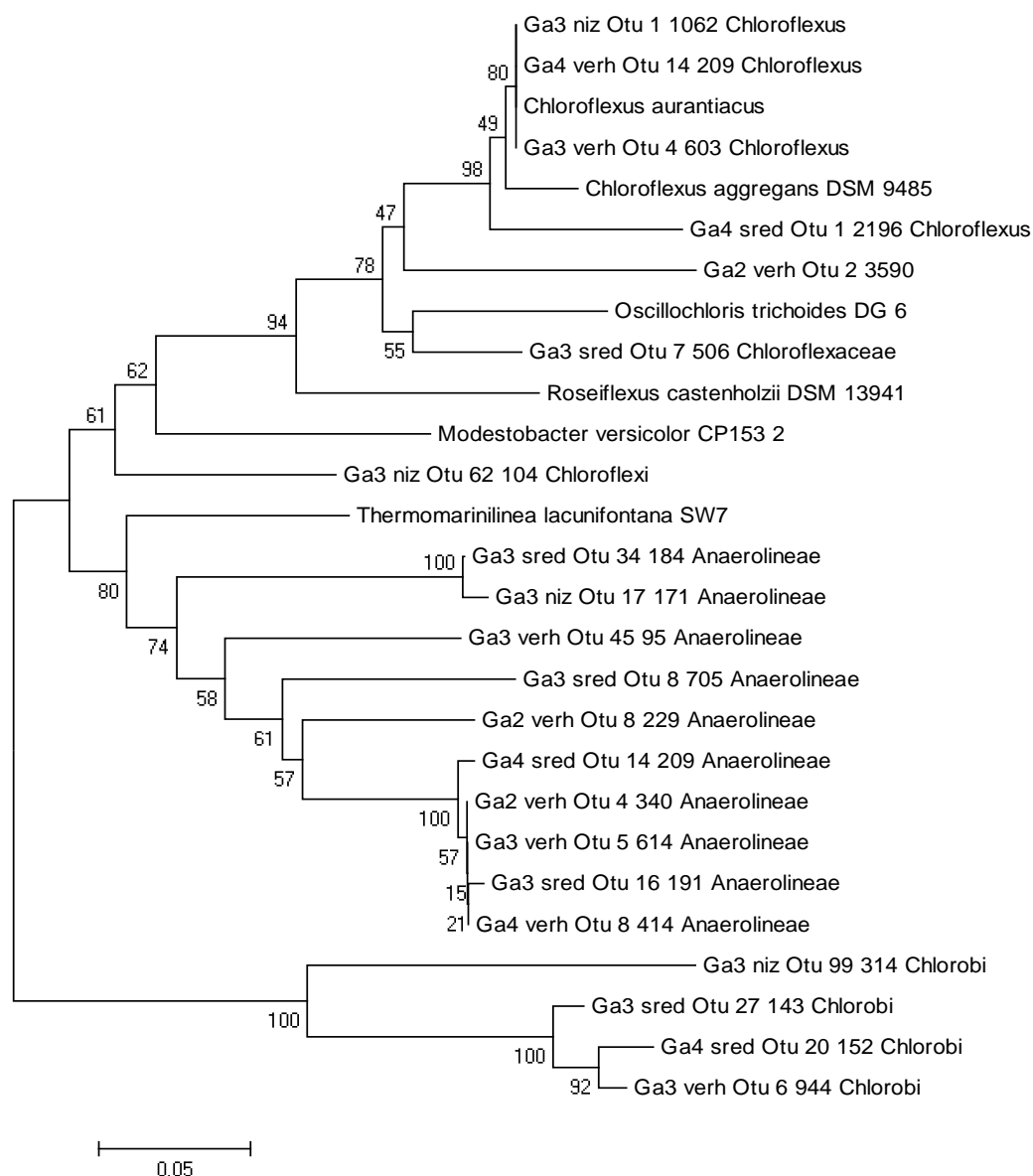


Рис. 11. Филогенетическое дерево, построенное с использованием последовательностей, обнаруженных в образцах микробного мата источника Гаргинского и последовательностями гена 16S рРНК наиболее близкородственных, среди известных, микроорганизмов. Филогенетическое дерево было построено с использованием алгоритма минимума эволюции, реализованного в пакете программ MEGA6. Внизу слева масштаб в количестве замен на сайт. Цифрами около разветвлений отмечена бутстреп поддержка. Названия обнаруженных нами ОТЕ содержат: название образца, № ОТЕ, количество последовательностей и принадлежность к соответствующей группе микроорганизмов.

**Гетеротрофные микроорганизмы микробного мата геотермального источника Гаргинского.** Во всех образцах микробного мата источника Гаргинского представители типов *Proteobacteria* и *Actinobacteria* доминировали среди гетеротрофных микроорганизмов. В сравнении с ранее описанными микроорганизмами для этих двух типов наблюдалось значительное разнообразие видов. Отсутствовали представители, которые бы занимали большую часть последовательностей, занимаемых типом. Тип *Actinobacteria* в основном был представлен двумя порядками: *Acidimicrobiales* и *Actinomycetales*. Разнообразие протеобактерий было выше, чем у актинобактерий, в основном они были представлены порядками: *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodospirillales*, *Sphingomonadales*, *Burkholderiales*, *Pseudomonadales* и *Xanthomonadales*.

Присутствие представителей типа *Proteobacteria* в значительном количестве описано для микробных сообществ, в том числе и микробных матов практически всех геотермальных источников: Анды, Колумбия [Jiménez et al., 2012], Южная Африка [Tekere et al., 2013], Камчатка (Мутновский, кальдера вулкана Узон) [Bernd Wemheuer et al., 2013], Малазия [Chan et al., 2015], Тенгчонг (Китай) [Pagaling et al., 2012], Румыния [Coman et al. 2013] Испания [López-López et al., 2015], Йеллоустон (США) [Meyer-Dombard et al., 2005].

Представители же типа *Actinobacteria* не описываются как доминирующие в микробных сообществах геотермальных источников. Однако их присутствие показано для многих источников: Камчатка (Россия), Тенгчонг (Китай), Невада (США) [Song et al., 2009], Бор-Кхлуенг (Тайланд) [Kanokratana et al., 2004], Япония [Iino et al., 2010] и во многих других.

Необходимо отметить, что с точки зрения распространения в нормальных условиях *Actinobacteria* являются интересной для биотехнологии группой микроорганизмов. Актинобактерии – это наиболее распространённые

микроорганизмы почвенных и водных экосистем [Daniel R. 2004; Holmfeldt et al., 2009], они выступают в роли симбионтов в кишечнике [Gill et al., 2006] и как патогены животных [Trujillo & Goodfellow 2003], играют существенную роль в геохимических циклах. Актинобактерии интересны с точки зрения биотехнологии как деструкторы растительных остатков [Cheng et al., 2016] и продуценты большого числа вторичных метаболитов [Lewis et al., 2010]. Самым известным микроорганизмом среди термофильных представителей типа Actinobacteria является *Thermobifida fusca* и *Acidothermus cellulolyticus* IIB благодаря наличию комплекса лигноцеллюлозоразрушающих ферментов в геноме микроорганизма [Lykidis et al., 2007]. При этом знания о биоразнообразии и роли представителей типа Actinobacteria, встречающихся в геотермальных местах обитания, весьма скудны. [Valverde et al., 2012; Shivilata & Satyanarayana., 2015].

В среднем и нижнем слоях микробного мата источника Гаргинского появляются в значительных количествах представители других типов. Так в среднем слое мата в образцах Га3-сред и Га2-сред, выявлено наличие представителей типа Planctomicetes, они занимают 7-9% от общего числа последовательностей. Представители типа Verrucomicrobia наблюдались в количестве до 5% в образцах, отобранных из точек Га3 (кроме Га3 верх) и Га4. Наличие представителей типа Planctomicetes и Verrucomicrobia описано для многих геотермальных источников (рис. 13.).

В анаэробном слое точки Га3 (55°C), образец Га3-низ (рис. 13.), были выявлены представители типа Firmicutes в количестве 14.6%, в основном класс *Clostridia*. В других образцах последовательностей представителей этого класса не было обнаружено. Термофильные клостридии более всего известны благодаря способности к деструкции лигноцеллюлозы. В том числе их представители образуют целлюлосомы, объединённые в макромолекулы ферменты, за счет взаимодействия специальных доменов, обеспечивающих прочное связывание (кохезины и доккерины) [Lamed & Bayer 1988].

Еще один тип бактерий имеет значительную представленность в образцах микробного мата источника Гаргинского, Thermi (Образцы Га3-низ и Га4-сред). Представители этого типа известны как термофилы и распространены в горячих источниках повсеместно [Hugenholtz et al 1998].

***Метаболизм микробного мата источника Гаргинского.***

Метаболические преобразования цианобактериального мата источника Гаргинского основаны на взаимодействии автотрофных и гетеротрофных микроорганизмов. Схема преобразований вещества в толще микробного мата представлена на рисунке 12. Условно, исследуемый микробный мат можно разделить на три слоя, в зависимости от фотосинтетической активности цианобактерий. В верхнем слое она наиболее высока, так как здесь есть постоянная подпитка необходимым неорганическим материалом из вод источника, а также наиболее высока энергия падающего света. Основу пула гетеротрофных микроорганизмов в этом слое составляют представители типов *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. В среднем слое освещенность снижается от верхней его части к нижней, кроме того происходит снижение притока неорганической субстанции из потока и скорости удаления метаболитов. При этом интенсивность фотосинтеза снижается, цианобактерии растут и метаболизируют, разнообразие и представленность гетеротрофных микроорганизмов увеличивается. В этом слое возрастает доля представителей типа *Chloroflexi*. Цианобактерии, наблюдаемые в этом слое, живут за счет энергии, которую они накопили, пока находились в верхнем слое, а также за счет остаточной энергии света и гетеротрофного питания. По мере погружения слои мата переходят во все более анаэробные условия, формирующиеся за счет жизнедеятельности гетеротрофных микроорганизмов. Цианобактерии активно отмирают и постепенно разлагаются гетеротрофными бактериями. Нижний слой это зона деструкции. Кислород сюда практически не проникает и не образуется в результате фотосинтеза, о чем говорит наличие в нижнем слое, проба Га3-низ, ОТЕ отнесенных к облигатным анаэробам, таким как *Clostridia*. В этом слое происходит отмирание фототрофных



микроорганизмов, а также аэробных бактерий, плохо приспособленных к жизни в анаэробных условиях, и в конечном счете разрушение органических остатков.

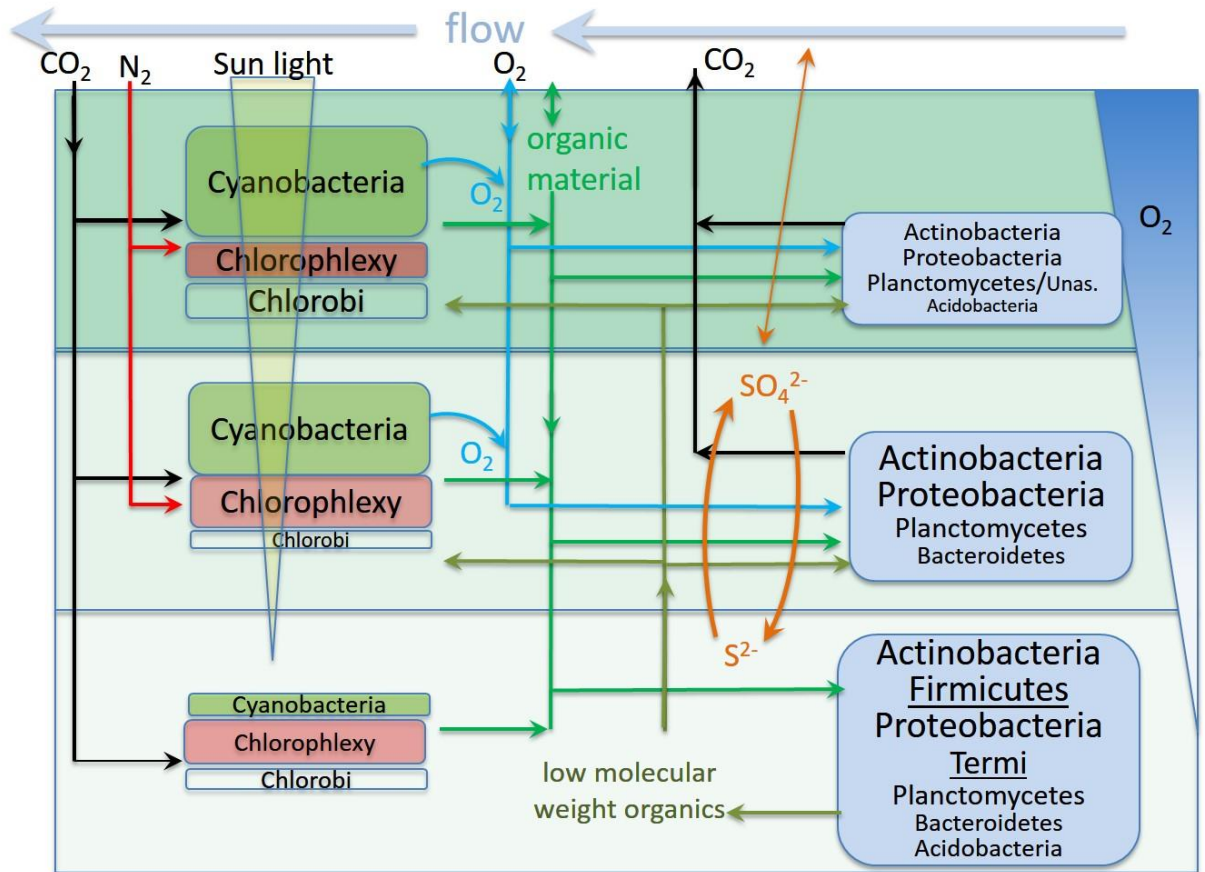


Рис. 12. Схематическое представление распространения основных групп микроорганизмов и потоков вещества и энергии в слоях микробного мата источника Гаргинского (Прибайкалье).

Основным механизмом переработки органической субстанции в анаэробных условиях нижнего слоя микробного мата является сбраживание. При этом низкомолекулярные продукты, образующиеся в ходе брожения, попадают в верхние слои, где аэробно окисляются и дают дополнительное питание населяющим их аэробными микроорганизмам. Вероятность того, что литотрофные пути преобразования энергии и вещества будут занимать центральное место в метаболизме микробного мата источника Гаргинского достаточно низка, ввиду малой концентрации субстрата в водах источника, в

первую очередь восстановленных соединений серы [Лазарева и др., 2012]. Однако надо отметить, сера может находиться в разных окислительно-восстановительных формах в зависимости от окислительно-восстановительного состояния конкретного слоя микробного мата. В результате этих реакций в микробном мате может быть сформирован полноценный цикл соединений серы. Катализировать окислительно-восстановительные преобразования серы могут представители типа *Proteobacteria*, *Firmicutes* [Pagaling et al., 2012] и аноксигенные фототрофы [Gregersen et al., 2011; Bryant et al., 2012].

Согласно данным геохимического анализа вод источника [Лазарева et al., 2012] в них отсутствуют соединения азота, в связи с чем единственно возможный источник азота в сообществе это азотфиксация. К азотфиксации в исследуемом сообществе способны большое число видов: все обнаруженные фототрофные микроорганизмы как оксигенные, так и аноксигенные, некоторые представители типов *Proteobacteria* и *Actinobacteria*.

### 3.2 Микробные сообщества геотермальных источников Камчатки.

В районе Кроноцкого заповедника, в кальдере вулкана Узон на Камчатке были отобраны пробы из источников Термофильный, Заварзина (рис.13, А-В) и других мест геотермальных проявлений. Образцы были предоставлены к.б.н., А.В. Брянской, сотрудником лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН. В качестве образцов отбирали воду, донные отложения, микробные маты и биопленки из мест геотермальных проявлений, расположенных в кальдере вулкана Узон. *Источник Термофильный* (рис.13, Б; №1) характеризуется как хлоридно-гидрокарбонатно-натриевый, слабокислый (рН 4,0-6,5), температура воды  $>70^{\circ}\text{C}$ . *Источник Заварзина* (рис.13, Б; №2) характеризуется температурой воды  $56-58^{\circ}\text{C}$ , рН - 6,0, что соответствует границе между нейтральными и кислыми источниками. Общее содержание соли в воде источника составляет 410 мг/л. Минеральный состав вод источника очень сложный: преобладают гидрокарбонатные ионы и ионы натрия, при этом содержание ионов кальция, магния и сульфатов так же очень высоко, как и содержание кремнезема. В высоких концентрациях воды источника содержат следующие элементы: Li (47 ppb), B (980 ppb), Mn (610 ppb), As (22 ppb), Br (47 ppb), I (6 ppb), Cs (2.4 ppb), Ba (98 ppb), Al (33 ppb), P (160 ppb) и Fe (16 ppb). Как и в других источниках кальдеры Узон, высока концентрация Ag (0.8 ppb) [Rozanov et al., 2014]. Общий вид источника Заварзина с образцом взятой из него пробы для дальнейшего анализа микробного сообщества представлен на рисунке 13(В).

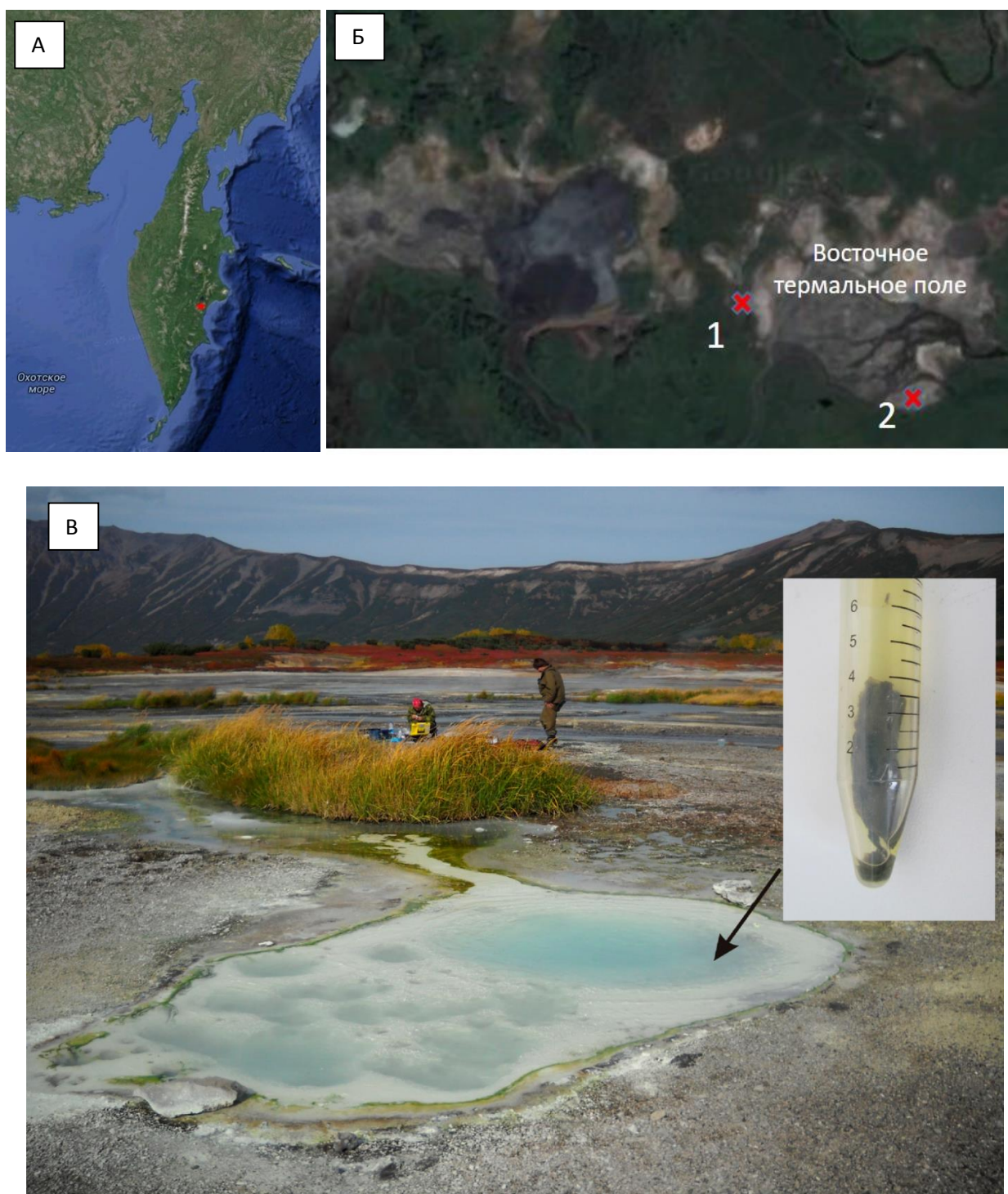


Рис. 13. Геотермальные источники Камчатки, из которых были отобраны образцы. Обозначения: А - карта полуострова Камчатка, красной звездочкой отмечено место расположения кальдеры вулкана Узон; Б – расположение источников Термофильный (1) и Заварзина (2) на карте термальных площадок кальдеры Узон; В – источник Заварзина. Стрелкой показано место отбора исследуемого бентосного сообщества [Rozanov et al., 2014].

Геотермальные воды источников кальдеры вулкана Узон (рис.13, А) в основном кислые и нейтральные. Общий вид микробных матов, характерных

для термальных источников кальдеры вулкана Узон представлен на рисунке 14 (А), сообщества серных бактерий представлены на рисунке 14 (Б). Фото выходной воронки источника Заварзина приведено на рисунке 13 (В).

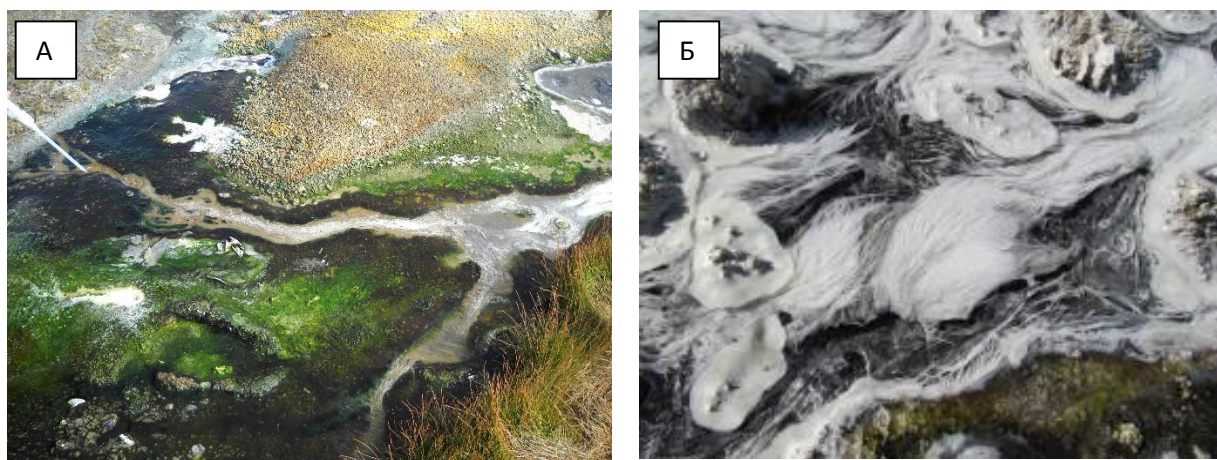


Рис. 14. Микробные образования геотермальных источников кальдеры вулкана Узон. Обозначения: А – общий вид микробных образований, характерных для щелочных и нейтральных термальных источников; Б – микробные сообщества, представленные нитями серных бактерий.

Микробные сообщества геотермальных вод кальдеры Узон на примере источника Заварзина представлены зелеными однослойными плавающими пленками, в которых доминируют нитчатые цианобактерии, встречающиеся по краю источника и в нескольких других воронковидных выходах. По краю термальной воронки источника Заварзина при температуре 49-45°C развивалась тонкая зеленая цианобактериальная пленка. По мере понижения температуры вытекающей из источника воды, сообщество цианобактерий сменялось сообществом нитчатых зеленых водорослей. Далее по изливу ручья при температуре 30-42°C развивается зеленое, легко разрушающееся микробное сообщество, представленное тонкими пленками (до 0,5 см). При температуре 22°C развивалось темно-серо-зеленое, «кустистое» сообщество бактерий, состоящее из тонких пленок. По мере понижения температуры от 22 до 17°C изменений в облике сообществ не происходило. Рядом с источником,

на мелко каменистом субстрате в углублениях от следов зверей и человека, заполненных водой (13°C), развивались колонии зеленых почвенных водорослей. В жерле источника Заварзина были выявлены накипные донные органоминеральные матоподобные структуры оранжево-бурого цвета, толщиной около 0,3 см, (бентосное микробное сообщество источника Заварзина) (рис. 15(В).) Повсеместно в водах источника Заварзина были выявлены нитчатые серные бактерии типа *Thermothrix*, развивающиеся при температуре от 40 до 60-70°C (рис.14, Б).

На рисунке 15 представлены результаты микроскопического анализа доминантов бентосного сообщества источника Заварзина в проходящем свете (рис.15, А) и с использованием флюоресценции (рис.15, Б). Результаты

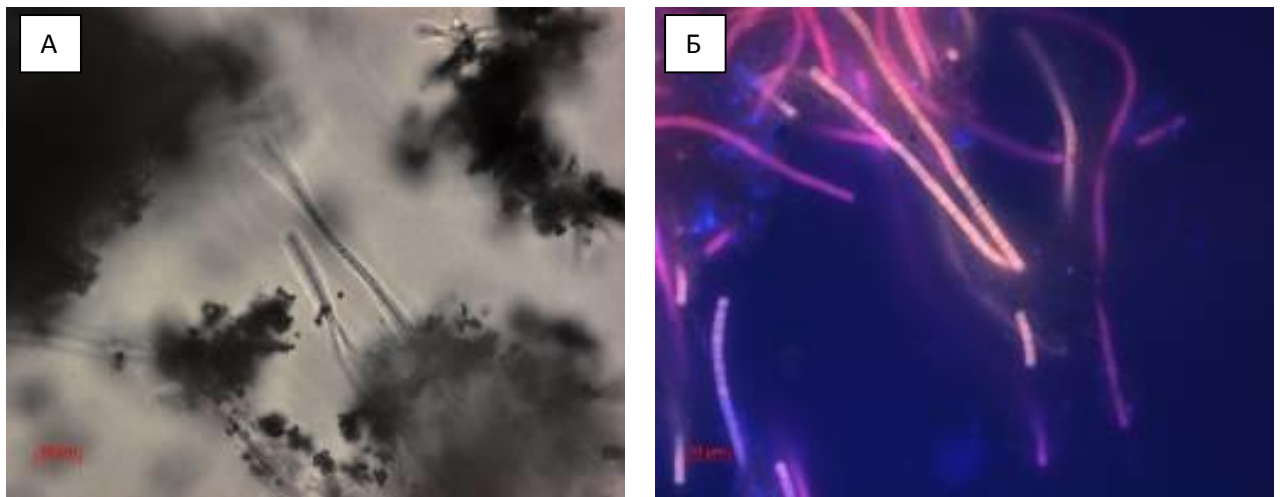


Рис. 15. Доминанты бентосного микробного сообщества источника Заварзина. А – микроскопия в проходящем свете, микроскоп Axioskop A1, 1000× увеличение; Б – флуоресцентная микроскопия. Препарат бентосного микробного сообщества был обработан DAPI (8 мкг/мл), микроскоп Axioskop A1, 1000× увеличение.

микроскопического анализа свидетельствуют о том, что доминирующая часть исследуемого бентосного сообщества представлена нитями бактерий, образующих матрикс сообщества.

**16S рРНК метагеномный анализ микробного состава бентосного микробного мата источника Заварзина (Камчатка).**

Для подробного анализа состава микробного сообщества бентосного микробного мата источника Заварзина был применен метод метагеномного секвенирования гена 16S рРНК. Для этого была создана библиотека с V3 переменного региона гена 16S рРНК. Секвенирование библиотеки было выполнено на GS Junior System sequencer (Roche). После биоинформатической обработки полученных последовательностей всего было получено 834 последовательности, прошедших фильтрацию по качеству. После деления на кластеры (оперативные таксономические единицы - ОТЕ) всего было получено 144 кластера. Репрезентативные последовательности сравнивали с базой данных GREENGENES [DeSantis et al.,2006] с использованием скрипта QIIME make\_otu\_table.py. Те репрезентативные последовательности, которые не были определены по результатам машинного анализа, идентифицировались вручную по базе данных GeneBank (NCBI\nr). В таблице 2 представлены данные о численности представителей бентосного микробного сообщества исследуемого геотермального источника.

Таблица 2. Видовой состав бентосного микробного сообщества источника Заварзина.

Тип	Доля (%)	Наиболее сходные по 16S рРНК, известные бактерии	Идентичность %
Бактерии			
Caldiserica	33.4	<i>Caldisericum exile</i> AZM16c01	98
	1.0	Uncultured bacterium clone ZB_P11_J22	99
	0.4	Uncultured bacterium clone OPB14	98
Dictyoglomi	25.5	<i>Dictyoglomus turgidum</i> DSM 6724	99
Aquificae	11.3	<i>Sulfurihydrogenibium yellowstonense</i> strain SS5	99
	1.3	<i>Thermosulfidibacter takaii</i> strain ABI70S6	98
	0.8	Uncultured <i>Aquificales</i> bacterium clone YNP_SBC_QL1_B3	89
Deltaproteobacteria	6.0	<i>Desulfurella kamchatkensis</i> K-119	100
	1.3	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> UI	96
Nitrospirae	1.2	<i>Thermodesulfobacterium yellowstonii</i> DSM 11347	100
	2.0	Uncultured <i>Nitrospirae</i> bacterium clone OTU74	96
Thermotogae	2.0	<i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1	99
Bacteroidetes/Chlorobi	0.1	<i>Chitinophagaceae</i> bacterium enrichment culture clone NB-10	97
	0.4		97

	0.7	<i>Chlorobi</i> bacterium enrichment culture clone phylotype P1 Uncultured <i>Chlorobium</i> sp. clone OPPB063	94
Thermodesulfobacteria	1.2	<i>Caldimicrobium rimae</i> strain DS 16S	99
Actinobacteria	1.0	<i>Gaiella occulta</i> F2-233	94
Firmicutes	0.6	<i>Clostridium cellulosi</i> NR_044624.1	94
	0.4	<i>Eubacterium</i> sp. (OS type K)	93
	0.3	<i>Clostridium symbiosum</i> strain 1851189	98
	0.2	<i>Desulfotomaculum geothermicum</i> strain DSM 3669	95
Candidate divisions	1.0	Candidate division OP10 clone OPB80	99
	0.4	OP1 Candidate division OP1 clone OPB14	98
	0.1	OP4 Candidate division OP4 clone OPB40	93
	0.7	OP7 Uncultured candidate division OP7 bacterium clone TP133	100
	0.3	AC1 Uncultured candidate division AC1 bacterium clone OTU9	94
Deferribacteres	0.8	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i> DSM 19672	99
Chloroflexi	1.0	<i>Chloroflexus aurantiacus</i> J-10-fl	99
	0.4	<i>Thermanaerotherix daxensis</i> strain GNS-1	98
	0.3	Uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium clone SHOFM-B-Oil-2	99
	0.2	Uncultured bacterium clone OTU-B5-3 16S	99
Археи			
Crenarchaeota	0.4	Uncultured Crenarchaeota 16S rRNA gene, clone C10	95
		Uncultured crenarchaeote clone A14-32	
	0.3	Uncultured crenarchaeote clone A14-45	95
	0.2		96
Thaumarchaeota	1.6	Uncultured thaumarchaeote clone 8_Kam37	96
Euryarchaeota	0.1	Uncultured archaeon clone ZA_P5_B12	97
		Uncultured archaeon 16S rRNA gene, clone N8-H5	93

На основании данных, представленных в таблице 2, очевидно, что наиболее многочисленным типом бактерий в микробном сообществе источника Заварзина является тип *Caldiserica*, представители которого также обнаружены в геотермальных источниках Японии и США (Йеллоустон) [Mori et al., 2009]. Большинство последовательностей этого типа со степенью сходства более 99% относились к *Caldisericum exile* AZM16c01. Представители этого типа являются термофилами, обладают оптимумом роста при температуре 60-75°C и pH 5,5-7,5, являются хемогетеротрофами и имеют нитчатое строение [Mori et al., 2009].

Следующим по количеству обнаруженных последовательностей был тип *Dictyoglomi*. Представители этого типа широко распространены в



термальных местообитаниях [Saiki et al., 1985]. Практически все выявленные последовательности были идентичными и наиболее близкими к штамму *Dictyoglomus turgidum* DSM 6724, выделенному из источников Камчатки [Svetlichny, Svetlichnya, 1988]. Бактерии этого вида имеют нитчатую структуру, являются строгими анаэробами, хемоорганотрофами, имеют температурный оптимум развития около 70°C, оптимум pH – 6,0-9,0 [Garrity et al., 2012 Bergey's Manual].

Представители типа *Aquificae* обычно доминируют в водах высокотемпературных источников с нейтральным pH, могут быть гетеротрофами или хемолитотрофами, микроаэрофилами или строгими анаэробами [Spear et al., 2005]. Наибольшее число последовательностей данного типа относились к роду *Sulfurihydrogenibium*, один из представителей которого - *Sulfurihydrogenibium rodmanii* - был обнаружен ранее в гидротермах Камчатки [O'Neill et al., 2008]. Выявленные нами последовательности имели более 99% сходства с *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* SS5 [Nakagawa et al., 2005]. Эти бактерии являются хемолитоавтотрофами и обладают способностью к окислению серы в микроаэрофильных условиях. Значительно меньшее число последовательностей принадлежали представителям рода *Thermosulfidibacter* и имели более 98% сходства с *Thermosulfidibacter takaii* ABI70S6, который является облигатным анаэробом, водородокисляющим хемолитоавтотрофом и сульфатредуктором с оптимумом роста при температуре 70°C и pH 5,0-7,5 [Nunoura et al., 2008].

Тип *Proteobacteria* в исследуемом сообществе представлен классом *Deltaproteobacteria*, последовательности которого составляют 7.3% от всех обнаруженных. 6.0% последовательностей принадлежат роду *Desulfurella*, штамму *Desulfurella kamchatkensis* K-119 (сходство 100%), выделенному ранее из источников Камчатки. Представители этого рода являются облигатными анаэробами, сульфатредукторами, могут жить на среде с водородом и серой, могут расти гетеротрофно, перерабатывая органические кислоты до CO<sub>2</sub> и воды. Диапазон температур для роста 50 - 70°C и pH 6,0-8,0 [Miroshnichenko et

al., 1998]. 1.3% последовательностей, которые можно отнести к классу *Deltaproteobacteria*, имеют 96% сходство со строгим анаэробом, способным к окислению фенола, и имеющим оптимум роста при 37°C и pH 6,0-7,0 - *Syntrophorhabdus aromaticivorans* UI [Qiu et al., 2008].

Последовательности типа Nitrospirae составляют 3.2%, из них 1.2% имеют 100% сходства с *Thermodesulfobacterium yellowstonii* DSM 11347 [Sonne-Hansen & Ahring, 1999]. 2% обнаруженных последовательностей имеют 96% сходство с последовательностью, выделенной из геотермальных источников Таиланда [GenBank: HQ416834.1]. Однако эта последовательность имеет всего 80% сходства с наиболее сходной, отнесенной к типу Nitrospirae, и 89% сходство с некультивируемым *Dehalococcoides (Chlorophlexy)*. Поэтому филогенетическое положение обнаруженных нами последовательностей требует дальнейшего уточнения. Отнесение ее к тому или другому таксону весьма затруднительно в виду низкого сходства с последовательностями хорошо изученных микроорганизмов.

Тип Thermotogae представлен 2% последовательностей, имеющих 99% сходство с *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1, выделенному из геотермальных источников Новой Зеландии [Patel et al., 1985; Andrews, Patel, 1996]. Данный микроорганизм является облигатным анаэробом, хемогетеротрофом, активно растущим в диапазоне температур 50 - 80°C и pH 6,0-8,0.

Последовательности типа Thermodesulfobacteria составили 1.2% и имели 99% сходства с последовательностью облигатного анаэроба, факультативного хемоавтолитотрофа, способного жить в присутствии водорода и тиосульфата, используя в качестве источника углерода CO<sub>2</sub> и имеющего диапазон роста при pH 6,8-7,5 и температуре 52-82°C - *Caldimicrobium rimae* DS 16S [Miroshnichenko et al., 2009].

Типу Actinobacteria соответствовал 1% исследованных последовательностей, однако они не имели близкое сходство к известным последовательностям термофильных микроорганизмов. 94% сходство

установлено к некультивируемым ризосферным бактериям *Gaiella occulta* F2-233 [Albuquerque et al., 2011].

К типу Firmicutes было отнесено 1.5% последовательностей. Со сходством от 93 до 98% они были близки к представителям класса *Clostridia*: 0.6% последовательностей имели 94% сходства к гену строгого анаэроба, гетеротрофа, с оптимумом роста при нейтральных pH и температуре 55-60°C - *Clostridium cellulosi* [He et al., 1991]; 0.4% последовательностей имели 93% сходства с *Eubacterium* sp., обнаруженным в цианобактериальных матах Йеллоустон [Weller et al., 1992]; 0.3% последовательностей имели 98% сходства с геном 16S рНК *Clostridium symbiosum*; 0.2% последовательностей имели 95% сходства с геном 16S рНК облигатного анаэроба, гетеротрофа, водородокисляющего сульфатредуктора *Desulfotomaculum geothermicum* DSM 3669 [Daumas et al., 1988].

Некоторая часть обнаруженных последовательностей имели 93-100% сходства с кандидатными типами: OP10, Ac1, OP1, OP4 и OP7. Представители кандидатного типа OP10 имеют близкое сходство более 99% к некультивируемым последовательностям, обнаруженным ранее в кальдере Узон [Burgess et al., 2012], Йеллоустон [Hugenholtz et al., 1998] и центральном Тибете [Lau et al., 2009]. Последовательности типа OP1 имеют сходство 98% к последовательностям, обнаруженным в геотермальных источниках Папуа-Новая Гвинея [GenBank: JF935228.1] и Йеллоустон [Meyer-Dombard et al., 2011]. Наиболее близкие последовательности к типу OP7 были получены из геотермальных источников кальдеры Узон [Burgess et al., 2012] и центрального Тибета [Lau et al., 2009]. Часть последовательностей, обнаруженных нами, не имеют близкого сходства с культивируемыми микроорганизмами, но имеют сходство более 99% с аннотированными в GenBank последовательностями, обнаруженными ранее в геотермальных источниках кальдеры Узон [Burgess et al., 2012].

Представители типа *Deferribacteres* имеют более 99% сходства со строгим анаэробом, гетеротрофным нитратредуктором, восстанавливающим

нитрат до аммония, с оптимум роста при температуре 55<sup>0</sup>С и рН 7,0-7,5 - *Calditerrivibrio nitroreducens* DSM 19672, выделенным из геотермальных источников Японии [Iino et al., 2008].

Представители типа Chloroflexi составили менее 1%. Половина из них была представлена последовательностями, близкими к *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl, выделенному из геотермальных источников Японии. *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl - автотрофный фотосинтезирующий микроорганизм, способный к гетеротрофному росту в аэробных условиях в темноте при температуре 52 - 60<sup>0</sup>С с оптимумом рН - 8,0 [Pierson & Castenholz, 1974]. 0.1% последовательностей имели 99% сходства со строгим анаэробом, гетеротрофом, с оптимум роста 65<sup>0</sup>С и рН 7,0, выделенным из глубинных высокотемпературных водоносных горизонтов - *Thermanaerotherix daxensis* GNS-1 [Grégoire et al., 2011].

Среди полученных последовательностей 2.7% были отнесены к домену архей. Были обнаружены представители типов Crenarchaeota (1%), Euryarchaeota (0.1%) и Thaumarchaeota (1.6%). Последовательности архей, относящиеся к типу Euryarchaeota, имели наибольшее сходство (97%) с последовательностями некультивируемых микроорганизмов, выделенных из геотермальных источников кальдеры Узон [Auchtung et al., 2010]. Последовательности типа Crenarchaeota имели большее сходство с последовательностями некультивируемых микроорганизмов геотермальных источников кальдеры Узон и меньшее сходство (>95%) с последовательностями из геотермальных источников Болгарии [Tomova et al., 2011], Мексики [GenBank: FJ901693.1] и Китая [Huang et al., 2011]. Последовательности типа Thaumarchaeota имели 96% сходства с последовательностями, обнаруженным в геотермальных источниках Камчатки [Pester et al., 2011; GenBank: HM150108.1].

Соотношение выделенных таксономических групп микроорганизмов в сообществе бентосного мата источника Заварзина для наглядности

представлено на рисунке 16. Согласно представленной диаграмме можно видеть, что доля 4-х доминирующих типов составляет более 80%, из которых более 60% это матрикс образующие бактерии. При этом для каждого из 4-х доминирующих типов характерно существенное преобладание одного вида.

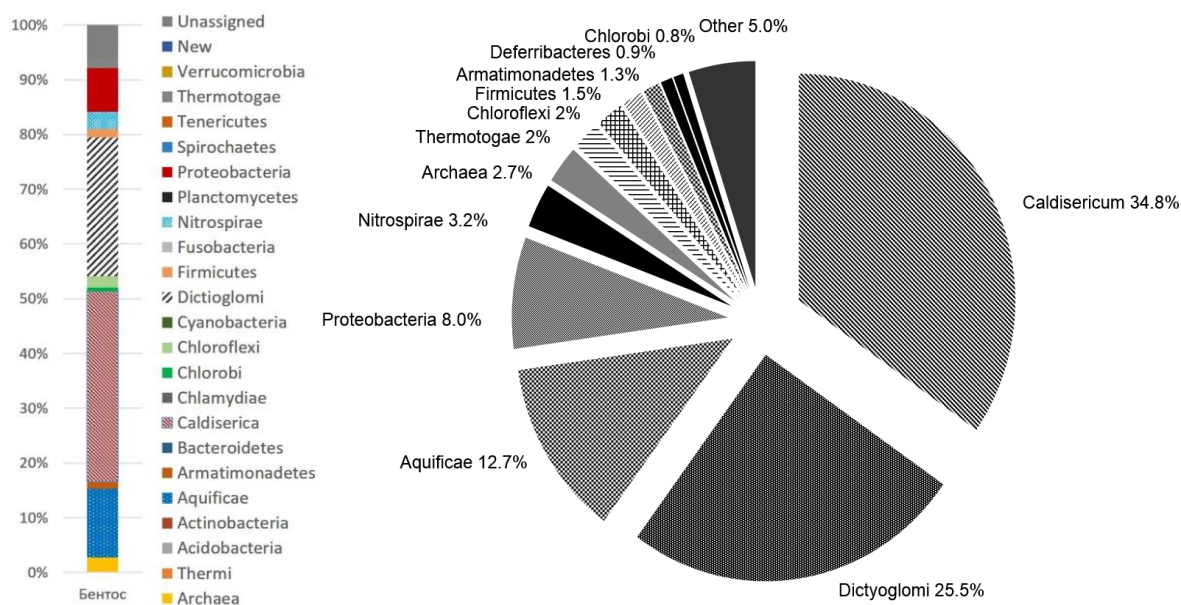


Рис. 16. Соотношение таксонов микроорганизмов, выделенных из бентосного сообщества источника Заварзина, на основании анализа данных метагеномного секвенирования. Слева – столбчатая диаграмма аналогичная той, что представлена для микробных сообществ источника Гаргинского. Справа – круговая диаграмма в порядке уменьшения представленности типа.

Ранее микробное сообщество источника Заварзина было описано в работах Burgess и др. [Burgess et al., 2012] и Гумерова и др. [Gumerov et al., 2011]. В связи с тем, что при анализе этого источника были взяты разные виды проб (суммарная проба воды и донных отложений, проба воды), представляло интерес провести сравнительный анализ полученных нами данных с данными других исследователей. Филогенетический анализ микробного сообщества источника Заварзина, проведенный Burgess и коллегами в 2012 году, был построен с использованием классического подхода – представленности гена 16S рРНК из разных микроорганизмов, выявленной при клонировании продуктов ПЦР в плазмидный вектор с последующим его секвенированием по

Сенгеру [Burgess et al., 2012]. Эта работа сильно отличается как в построении схемы эксперимента, так и по используемому инструментарию, что не позволяет проводить прямое сравнение с двумя другими работами. Филогенетический анализ микробного сообщества источника Заварзина в нашей работе [Rozanov et al., 2014] и в работе Гумерова [Gumerov et al., 2011] был основан на получении данных при помощи массового параллельного секвенирования, был использован один и тот же прибор. Сходными оказались и схемы выполнения исследований, что позволяет сравнивать полученные данные.

Сравнительный анализ процентных соотношений представленности таксонов в микробных сообществах источника Заварзина, основанный на результатах анализа различных проб, взятых тремя исследовательскими группами в разные годы, приведен в таблице 3. Данные по микробному сообществу, полученные нами и в работе Гумерова с соавторами, схожи качественно, но имеют ярко выраженные различия в соотношении между различными таксономическими группами. Доминирующие в бентосном микробном мате представители типов *Caldiserica* 34,8% и *Dictyoglomi* 25,5%, способные формировать прочный матрикс, в водном сообществе были представлены достаточно слабо ~1,5%. Представители *Aquificae* имели наибольшую долю в водной пробе - 32% и 12,7% - в бентосном микробном сообществе. Доля *Proteobacteria* в водной пробе составила 23%, по численности они находятся на втором месте, при этом преобладали *Gamma* - 11%, *Beta* - 6,5% и *Deltaproteobacteria* 3%. В бентосном микробном мате значительную долю составили *Deltaproteobacteria* - 7,3%. *Thermotogae* были более представлены в микробном сообществе водной пробы - 6,3%, по сравнению с микробным сообществом пробы бентосного микробного мата - 2%. Представленность *Thermodesulfobacteria* в микробном сообществе водной пробы и пробы бентосного микробного мата составила 6,3% и 1,2%, соответственно.

Таблица 3. Численности крупных филогенетических таксонов, полученные для микробных сообществ вод источника, суммарной пробы, и бентосного мата источника Заварзина.

Домен	Тип	% в бентосном микробном мате	% в образце воды [Гумеров и др., 2011]	% в интегральной пробе [Burgess et al., 2011]
<i>Bacteria</i>	Caldiserica	34.8	1.72	1
	Dictyoglomi	25.5	1.65	2
	Aquificae	12.7	32.27	3
	Proteobacteria	8.0	23	13
	Alphaproteobacteria*	-	> 1	-
	Deltaproteobacteria*	7.3	3.01	-
	Betaproteobacteria*	0.3	6.57	13
	Gammaproteobacteria*	0.4	10.99	-
	Epsilonproteobacteria*	-	> 1	-
	Thermotogae	2	6.27	-
	Thermodesulfobacteria	1.2	6.32	-
	Deferribacteres	0.9	12.15	8
	Deinococcus-Thermus	-	4.35	-
	Verrucomicrobia	-	1.01	-
	Armatimonadetes	1.3	-	6
	Candidate divisions AC1, OP4, OP7	1.4	-	-
	Candidate division BRC1	0.1	1.70	0.3
	Nitrospirae	3.2	-	3
	Bacteroidetes/Chlorobi	0.8	> 1	-
	Firmicutes	1.5	> 1	0.3
	Actinobacteria	0.1	> 1	-
	Chloroflexi	2.0	> 1	38
	Acidobacteria	0.3	> 1	1
	Cyanobacteria	-	>0.20	-
	New lineage 1	-	1.04	+
	New lineage 2	-	-	-
	Unclassified	3.8	-	24
<i>Archaea</i>	Crenarchaeota	1.0	2.25	59
	Thaumarchaeota	1.6	-	-
	Euryarchaeota	0.1	1.89	7
	Korarchaeota	-	0.34	21
	Nanoarchaeota	-	0.02	-
	Unclassified	-	-	13

Другие филогенетические группы бактерий были представлены либо в водной пробе (Deferribacteres 12,2%, Deinococcus-Thermus 4,4%), либо в пробе бентосного микробного мата (Armatimonadetes 1,3%, Nitrospirae 3,2%, Firmicutes 1,5%, Chloroflexi 2%). Представленность *Archaea* оказалась достаточно низка в обоих случаях.

На основании проведенного анализа становится очевидным, что ввиду разности в подходе к получению библиотек и используемых методов секвенирования, возможно проведение только качественного сравнения данных о составе микробного сообщества источника Заварзина, полученных тремя исследовательскими группами. Сделать определенные выводы об изменении состава микробного сообщества ввиду взятия для анализа разных несопоставимых проб не представляется возможным.

Учитывая высокую степень сходства с известными и описанными ранее микроорганизмами, которая наблюдалась для большинства проанализированных нами последовательностей, можно сделать некоторые предположения и выводы о метаболических путях, существующих в бентосном сообществе, и о его связи с сообществом, представленном в воде.

Ранее, в работе Гумерова с соавторами [Gumerov et. al 2011] были выдвинуты гипотезы о природе экологических взаимосвязей, которые устанавливаются между основными группами микроорганизмов микробного сообщества водной толщи источника Заварзина. Авторами показано, что первичная продукция органического вещества в воде источника может осуществляться как фотосинтетически, так и хемолитоавтотрофно. Представленность фототрофов - *Chloroflexi* (0.9%) и хемолитотрофов (около 15%) в бентосном мате гораздо менее значительна, чем в водной толще и интегральной пробе из разных частей источника, где она составляет около или более половины всех микроорганизмов. Хемолитоавтотрофная продукция возможна за счет *Aquificae* (наиболее близкая к *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* SS5 и *Thermosulfidibacter takaii*) и *Thermodesulfobacteria* (наиболее близкая к *Caldimicrobium rimaе* DS). Согласно имеющимся данным, можно предположить, что продукция органического вещества за счет фото- и хемосинтеза происходит в водной толще и цианобактериальном мате источника.



Основная масса полученных последовательностей для бентосного микробного сообщества принадлежит микроорганизмам-деструкторам органического вещества. Именно органотрофы формируют структуру сообщества. Более 50% составляют последовательности типов *Caldiserica* (34.8%) и *Dictyoglomi* (25.5%). Менее многочисленны представители типов *Proteobacteria*, *Thermotogae*, *Firmicutes*, *Deferribacteres*. Разложение органики может происходить как за счет сбраживания органических субстратов, так и за счет ее полного окисления при использовании в качестве акцепторов электронов кислорода, нитрата, серы или тиосульфата. Основная масса микроорганизмов бентосного мата в качестве акцептора электронов может использовать элементную серу, образующуюся в результате окисления сероводорода в воде источника. В водной толще не были обнаружены микроорганизмы, осуществляющие нитрификацию. Однако в бентосном мате данные организмы (археи типа *Thaumarchaeota* и бактерии типа *Nitrospirae*) были выявлены. Таким образом, метаболические процессы микробного сообщества бентосного микробного мата в основном нацелены на деструкцию органического вещества, создаваемого в водной толще и цианобактериальном мате.

В результате проделанной работы описаны макроскопические особенности микробных образований щелочных гидротерм Прибайкалья, а также микробных образований геотермальных источников кальдеры вулкана Узон полуострова Камчатка. Образцы микробных образований и донных отложений, отобранные из источников, были использованы для выделения термофильных микроорганизмов. Проведен анализ биоразнообразия бентосного микробного сообщества источника Заварзина (Камчатка). Установлено, что доминирующую группу микроорганизмов данного сообщества составили представители *Caldiserica* 34,8%, *Dictyoglomi* 25,5%, *Aquificae* 12,7%, *DeltaproteoBacteria* 7,3%, *Nitrospirae* 3,2 и *Thermotogae* 2%. Среди малопредставленных видов выявлены бактерии порядка: *Firmicutes*,

Actinobacteria, Proteobacteria, Thermotogae, Bacteroidetes/Chlorobi, которые перспективны для поиска в их геномах генов ферментов деструкции компонентов лигноцеллюлозы. В том числе были найдены виды бактерий, являющиеся специализированными деструкторами лигноцеллюлозы: *Clostridium sp.* (Firmicutes), *Gaiella sp.* (Actinobacteria).

### **3.3 Выделение термофильных микроорганизмов. Их описание и филогенетический анализ.**

Бактерии, обитающие в микробных сообществах, отобранных нами из геотермальных источников Прибайкалья и Камчатки, являются потенциальным источником новых вариантов ферментов, представляющих интерес для промышленных биотехнологий, в том числе и для процесса переработки лигноцеллюлозного растительного сырья.

Основным подходом к поиску целевых генов в геномах бактерий, обитающих в микробиологических сообществах, является выделение их отдельных штаммов, их геномное секвенирование и поиск генов, представляющих интерес для конкретного исследования. Для этих целей из проб донных отложений и микробных образований, отобранных в геотермальных источниках Прибайкалья (Аллинского с температурой воды на выходе 65°C, Гаргинского - 72°C и Уринского - 65°C) и кальдеры вулкана Узон на Камчатке были проведены микробиологические посева на питательные агаризованные среды согласно протоколу (Глава 2). Всего было выделено более 200 штаммов термофильных микроорганизмов. Визуально колонии были разделены на три типа. К первому типу были отнесены округлые колонии кремового цвета. Края колоний были волнистые или слегка волнистые. Профиль колоний - слегка выпуклый. Размеры колоний варьировали от 3 до 5 мм. Ко второму типу были отнесены округлые полупрозрачные колонии бежевого цвета с легким зеленым оттенком. Края колоний были ровные или слегка волнистые. Профиль колоний - слегка выпуклый. Размеры колоний достигали 5 мм. К третьему типу были отнесены округлые кремовые колонии с белым налетом при спорообразовании. Края колоний были неровные, слегка волнистые и расплывающиеся. Профиль колоний - слегка выпуклый. Размеры колоний достигали 8 мм.

Для видовой идентификации выделенных штаммов был проведен филогенетический анализ. Для этих целей были частично секвенированы гены

16S рРНК выделенных штаммов микроорганизмов. Согласно полученным последовательностям, выделенные микроорганизмы были разделены на пять групп (видов) относящихся к трем родам *Geobacillus*, *Anoxybacillus* и *Thermoactinomyces*: бактерии рода *Geobacillus* (Камчатка), бактерии рода *Geobacillus* (Прибайкалье), бактерии рода *Anoxybacillus* (Камчатка), бактерии рода *Anoxybacillus* (Прибайкалье), бактерии рода *Thermoactinomyces* (Прибайкалье). Для полногеномного секвенирования были выбраны шесть штаммов (по одному из каждой группы), для филогенетической группы *Geobacillus* (Прибайкалье) было взято два штамма. Штаммы для всех групп выбирались случайно. Для отобранных штаммов было проведено более подробное фенотипическое описание, последовательности гена 16S рРНК были определены более полно для точной филогенетической идентификации в сравнении с последовательностями типовых штаммов.

Надо отметить, что часть полученных штаммов была выделена из образцов микробного мата источника Гаргинского. Но, несмотря на большое число последовательностей фрагмента гена 16S рРНК, полученных для этого сообщества в ходе метагеномных исследований, среди них не было обнаружено последовательностей, сходных с последовательностями гена 16S рРНК выделенных нами штаммов.

Для определения филогенетического положения по последовательности гена 16S рРНК было построено филогенетическое дерево с использованием последовательностей шести отобранных штаммов и последовательностей генов 16S рРНК типовых штаммов, принадлежащих родам *Geobacillus*, *Anoxybacillus* и *Thermoactinomyces*. Согласно построенному дереву (рис.19), штаммы бактерий *G. stearotherophilus* 22 и 53, выделенные из микробных сообществ геотермальных источников Прибайкалья, имеют наиболее близкое родство к *Bacillus stearotherophilus* (данный вид был переименован в *Geobacillus stearotherophilus*, но в базах данных типовой штамм сохранил свое название). Штамм *G. icigianus* GIWI выделенный из проб, отобранных в

геотермальных источниках Камчатки, на филогенетическом дереве располагается на отдельной ветви, достаточно удаленной от типовых штаммов. Штамм *A. flavithermus* 25 выделенный из проб, отобранных в геотермальных источниках Прибайкалья, имеет высокий уровень сходства с типовым штаммом *Anoxybacillus flavithermus* WK1, что позволяет отнести его к этому виду. Штамм *Anoxybacillus* KU2-6-11 выделенный из проб, отобранных в геотермальных источниках Камчатки, наиболее схож по последовательности гена 16S рРНК с типовым штаммом *Anoxybacillus thermarum*. Штамм *Thermoactinomyces* Gus2-1 выделенный из проб, отобранных в геотермальных источниках Прибайкалья, располагается на филогенетическом дереве на отдельной ветви, при этом наибольшее сходство штамм *Thermoactinomyces* Gus2-1 имеет с типовым штаммом *Thermoactinomyces vulgaris*.

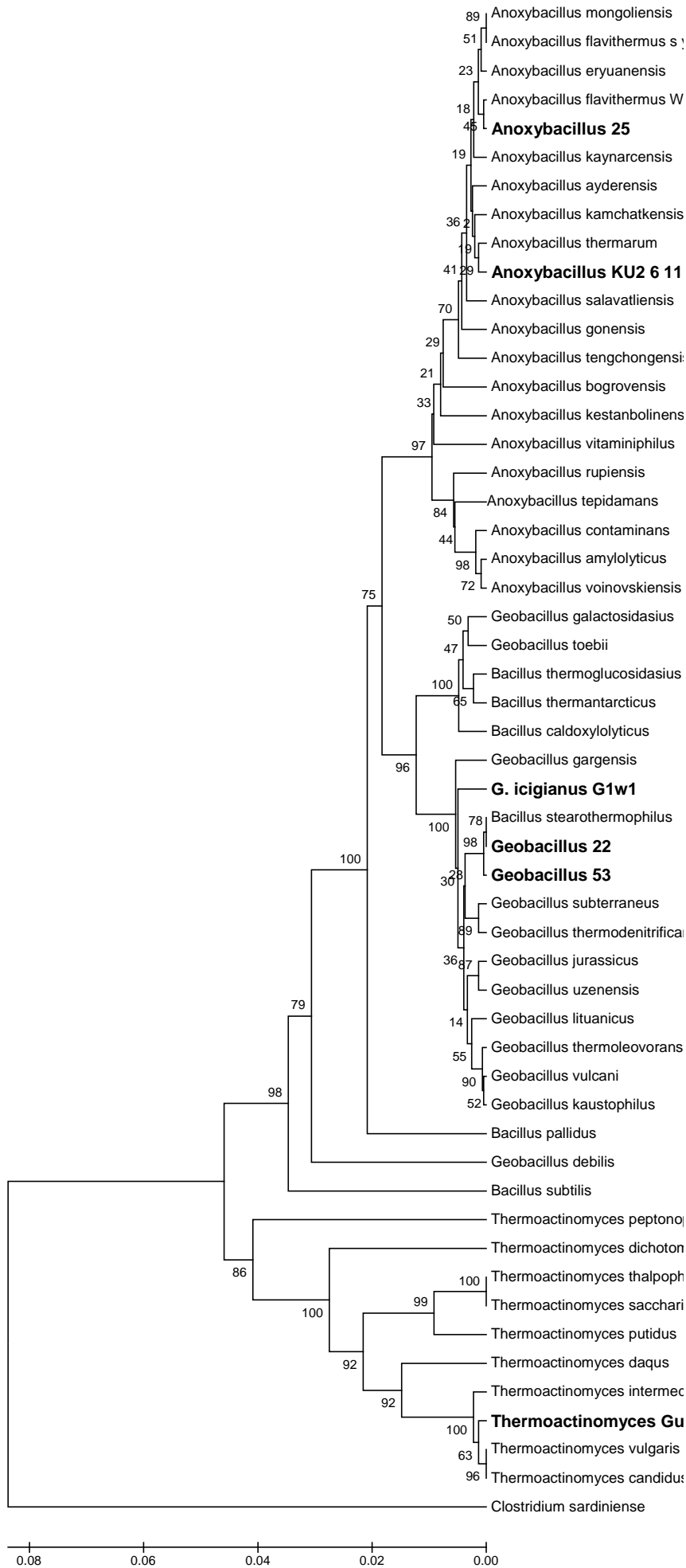


Рис. 17. На рисунке представлено филогенетическое дерево, построенное с использованием последовательностей генов 16s типовых штаммов и последовательностей генов 16srнк штаммов, выделенных из проб, отобранных в геотермальных источниках Камчатки и Прибайкалья. Названия штаммов, полученных в лаборатории, выделены жирным шрифтом.

*Geobacillus stearotherophilus* штамм **22** образует округлые колонии кремового цвета. Края колоний волнистые или слегка волнистые. Профиль колоний слегка выпуклый. Размеры колоний варьируют от 3 до 5 мм. Клетки штамма представлены палочками, размеры которых составили 2-3 x 7-10 мкм. У исследуемого штамма выявлено спорообразование. Эндоспоры овальные или сферические, размером 1,5 мкм.

*Geobacillus stearotherophilus* штамм **53** по фенотипическим признакам идентичен штамму *Geobacillus stearotherophilus* 22

*Geobacillus icigianus* штамм **G1W1T** образует округлые колонии кремового цвета. Края колоний волнистые или слегка волнистые. Профиль колоний слегка выпуклый, размеры варьируют от 3 до 5 мм. Клетки штамма палочковидные, размер 0.5-1.0 x 3.5-6.0 мкм. У исследуемого штамма наблюдается спорообразование. Эндоспоры овальные или сферические 1.5x3.0 мкм. Данный штамм был охарактеризован сотрудниками лаборатории как новый вид [Bryanskaya et al., 2014].

*Thermoactinomyces vulgaris* штамм **Gus2-1** образует округлые кремовые колонии с белым налетом при спорообразовании. Края колоний неровные, слегка волнистые и расплывающиеся. Профиль колоний слегка выпуклый. Размеры колоний достигают 8 мм. Клетки штамма палочковидные, обладают способностью ветвиться, образуя субстратный мицелий 0,4–0,8 мкм в диаметре. Споры сферические, диаметром 1,0-2,0 мкм.

*Anoxybacillus flavithermus* штамм **25** образует округлые полупрозрачные колонии желтого цвета. Края колоний ровные или слегка волнистые. Профиль колоний слегка выпуклый. Размеры колоний достигают 5 мм. Клетки штамма представлены палочками 1,0-2,0 x 3,0-12,0 мкм. У исследуемого штамма выявлено спорообразование. Эндоспоры овальные, терминальные, размером 1,5-2,0x3,0 мкм.

*Anoxybacillus* штамм **KU2-6(11)** образует округлые полупрозрачные колонии бежевого цвета. Края колоний волнистые или слегка волнистые. Профиль колоний слегка выпуклый. Размеры колоний до 5 мм. Клетки штамма представлены палочками, размеры которых 2,0 x 5,0-10,0 мкм. У исследуемого штамма выявлено спорообразование. Эндоспоры овальные, терминальные, размером 1,5-2,0 x 3,0 мкм.

Представители родов *Geobacillus*, *Anoxybacillus* и *Thermoactinomyces* выделяются из геотермальных источников по всему земному шару [Dereikova et al., 2008; Tang et al., 2006; Cihan et al., 2011]. Ферменты бактерий этих родов находят широкое применение в биотехнологических процессах. В связи с чем было опубликовано много работ по изучению их свойств. [Eminoğlu et al., 2015; Bakir, Metin 2015; Soriano-Maldonado et al., 2015; Mitra et al., 2015; Singh, Singh 2012]

Для выявления генов ферментов, способных к гидролизу компонентов лигноцеллюлозной биомассы, было проведено полногеномное секвенирование термофильных микроорганизмов, выделенных из образцов донных отложений геотермальных источников Прибайкалья и Камчатки. Секвенирование было выполнено в Институте Цитологии и Генетики к.б.н. Г.В. Васильевым на приборе IonTorrent и в лаборатории эволюционной геномики факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова на приборе MiSeq фирмы Illumina. Сборку геномов осуществляли согласно методикам, приведённым в главе 2. Данные о полученных последовательностях геномов приведены в таблице 4. При аннотировании полученных последовательностей в геноме *G. stearothermophilus* штаммов 22 и 53, выделенных из образцов, отобранных в Прибайкалье, были обнаружены последовательности генов, участвующих в деструкции гемицеллюлозы. Выявлен оперон, состоящий из 5 генов эндо-1,4-β-глюканазы, ксилан-1,4-β-ксилозидазы, эндо-1,4-β-ксиланазы, α-глюкуронидазы, α-L-арабинофуранозидазы.



Таблица 4. Список секвенированных геномов, способ секвенирования и id аннотированных геномов в базах данных DDBJ/EMBL/GenBank.

	Платформа NGS, программное обеспечение для сборки контигов	DDBJ/EMBL/GenBank №, ссылка
<i>Geobacillus icigianus G1W1</i>	MiSeq, SPAdes v3.1.0	JPYA00000000
<i>Geobacillus stearothermofillus 22</i>	MiSeq, SPAdes v3.1.0	JQCS00000000
<i>Geobacillus stearothermofillus 53</i>	MiSeq, SPAdes v3.1.0	JPYV00000000
<i>Anoxybacillus flavithermus 25</i>	IonTorrent, MIRA 4.0	JPZO00000000
<i>Anoxybacillus sp. KU-2-6(11)</i>	IonTorrent, MIRA 4.0	JPZN00000000
<i>Thermoactinomyces sp. Gus2-1</i>	IonTorrent, MIRA 4.0	JPZM00000000

Гены ферментов ксилан-1,4-β-ксилозидазы, эндо-1,4-β-ксиланазы, α-глюкуронидазы, α-L-арабинофуранозидазы выявленные в геноме *G. stearothermofillus 22* были клонированы в экспрессирующую конструкцию *E.coli*. Последовательности генов ферментов деструкции лигноцеллюлозы, найденные в геноме штамма *G. stearothermofillus 22* приведены в таблице 5.

Таблица 5. Белковые последовательности карбогидраз, найденные в геноме штамма *G. stearothermophilus 22*.

Название фермента/ожидаемый молекулярный вес рекомбинантного белка (Да).	Белковая последовательность обнаруженных в геноме штамма <i>G. stearothermophilus 22</i> ,
α- глюкуронидаза/ 79493.59	MTAGYEPCLWRYERKQYSRLRFEEIVAKRTSPIFQA AVEELQKGLRS MMEIEPQVVQEVNETANSIWLGTLEDEEFKRPLEGTLVHPEGYVIRSDV DDGPFRIYIIGKTDAGVLYGVFHFLLRLLQMGENIAQLSIEQPKNRLRMI NHWDNMDGNIERGYAGRSIFFAGGQFVKQNQRIDYARLLASVGINAI SINNVNVHKTETKLITDHFLPDVAEVADIFRTYGIKTFLSINYASPIEVGG LPTADPLDPEVRRWWKETAKRIYQYIPDFGGFVVKADSEFRPGPFTYG RDHAEGANMLAEALAPFGGLVIWRCFVYNCQQDWRDRTTDRAKAAY DHFKPLDGQFRENVILQIKNGPMDFQVREPVSPFGAMPKTNQMMEV QITQEYTGQQKHL CFLIPQWKEVLDFTYAKGKGSEVKKVIDGSLFDY RYSGIAGVSNIGSDPNWTGHTLAQANLYGFGRLAWNPDLSAEEIANEW VVQTFGDDSQV VETISWMLLSSWRIYENYTSPLGVGWMVNPGHYGP NVDGYEYSHWGTYHYADRDGIGVDRTVATGTGYTAQYFPENAAMYE SLDTCPDELLFFHHVPYTHRLHSGETVIQHIYNTHFEGVEQAKQLRKR WEQLKKGKIDEKRYHDVLERLTIQVEHAKEW RDVINTYFYRKSGIDDQY GRKIYR*

<p><math>\alpha</math>-L-арабинофуранозидаса/58201.04</p>	<p>MATKKATMIEKDFKIAEIDKRIYGSFIEHLGRAVYGGIYEPGHPQADEN GFRQDVIELVKELQVPIIRYPGGNFVSGYNWEDGVGPKEKRPRRLDLA WRSVETNEIGLNEFMDWAKMVGAEVNMAVNLGTRGIDAARNLVEYC NHPSGSYSDLRISHGYKEPHKIKTWCLGNEMDGPWQIGHKTAVEYG RIACEAAKVMKWVDPTIELVACGSSNRNMPTFAEWATVLDHTYEYV DYISLHQYYGNRDNDTANYLALSLEMDDFIRSVVAIADYVKAKKRSK KTIHLSFDEWNVWYHSNEADKQIEPWTVAPPLLEDIYNFEDALLVGCM LITLMKHADR VKIACLAQLVNVIAPIMTEKNGPAWKQTIYYPFMHASV YGRGVALHPVVSSPKYDSKDFTDVPYLESIAVYNEEKKEVTIFAVNRD MDDALLLECDVRSFEDYRVIEHIVLEHENVKQTNSAQSSPVVPHRNGD AQMSDGKVSATLPKLSWNVIRLGK*</p>
<p>эндо-1,4-<math>\beta</math>-ксилаза/3984 4.17</p>	<p>MNSSLPSLRDVFANDFRIGAAVNPVTIEMQKQLLIDHVNSITAENHMKF EHLQPEEGKFTFQEADRIVDFACSHRMAVRGHTLVWHNQTPDWVVFQD GQGHFVSRDVLRLERMKCHISTVVRRYKGGIYCWDVVNEVVADEGDEL LRPSKWRQIIGDDFMEQAFLYAYEADPDALLFYNDYNECFPEKREKIFA LVKSLRDKGIPIHGIGMQAHWSLTRPSLDEIRAAIERYASLGVVLHITEL DVSMFEFHDRRTDLAVPTNEMIEQQAERYGQIFALFKEYRDVIQSVTF WGIADDHTWLDNFPVQGRKNWPLLDEQHKPKPAFWRAVSV*</p>
<p>ксилан-1,4-<math>\beta</math>-ксилозидаза/80 988.39</p>	<p>MPTNVFFNAHHSVPVGFASFTLGFPGKSGGLDLELARPPRQNVFIGVES PHEPGLYHILPFAETAGEDESKRYDIENPDNPQKPNILIPFAKERIEREF RVATDTWKAGDLTLTIYSPVKAVPDPETASEEELKLALVPAVIVEMTID NTNGTRTRRAFFGFEGTDPYTSMRRIDDTCPQLRGVGGQGRILGIVSKDE GVRSAHFMSMEDILTATLEENWTFGLGKVGALIVDVPAGEKKTYQFAV CFYRGGCVTAGMDASYFYTRFFHNIEEVGLYALEQAEVLKEQAFRSNE LIEKEWLSDDQKFMMAHAIRSYYGNTQLEHEGKPIWVVNEGEYRMM NTFDLTVDQLFFELKMNPTVKNVLDIFYVERYSYEDRVRFPGDETEY PGGISFTHDMGVANTFSRPHYSSYELYGISGCFSHMTHEQLVNWVLC AVYIEQTKDWAWRDRRLTILEQCLES MVRRDHPDPEKRNGVMGLDST RTMGGAEITTYDSL DVSLGQARNNLYLAGKCWAAYVALEKLFRDVG KEELAALAREQA EKCAATIVSHVTEDGYIPAVMGE GND SKIIPAIEGLV FPYFTNCHEALREDGRFGDYIRALRQHLQYVLREGICLFPDGGWKISST SNNSWLSKIYLCQFIARHILGWEWDEQGKRADA AHVAWLTHPTLSIWS WSDQIIAGEISGSKYYPRGVTSILWLEEG*</p>

### 3.4 Клонирование генов ферментов деструкции лигноцеллюлозы, найденных в геноме штамма *G. stearothermophilus* 22

Для получения экспрессирующих векторов была выбрана конструкция pQE30 содержащая промотор фага T5 под контролем lac оператора, так как промотор фага T5 является одним из самых мощных для экспрессии белка в *E.coli*. Регуляторная область с выделенными регуляторными элементами представлена на рисунке 18.

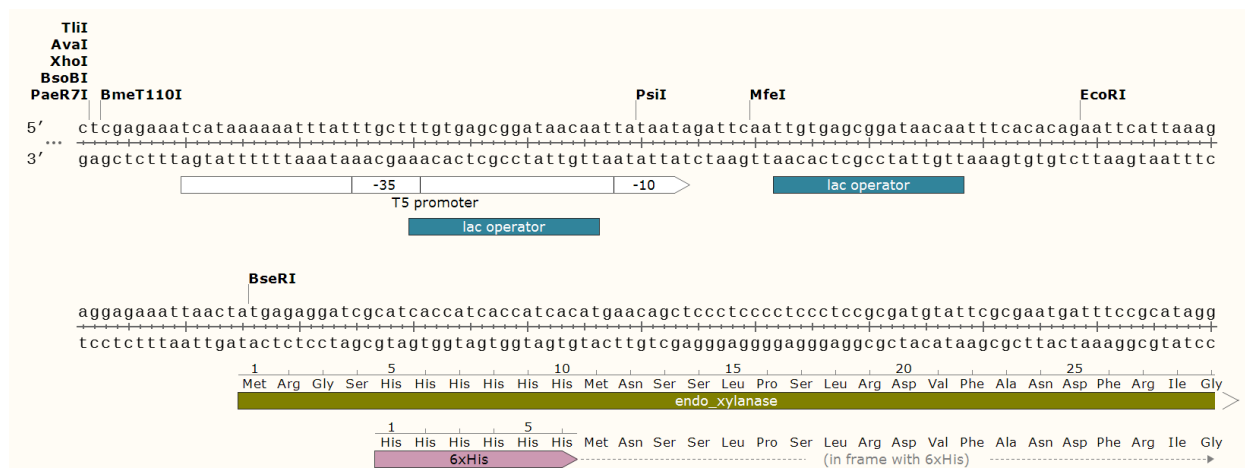


Рис. 18. Регуляторная область плазмиды pQE30 с клонированной в нее последовательностью гена эндо-1,4-β-ксилазы. Lac operator – сайт посадки регулирующего работу lac оперона белка lacI. Endo\_xylanase – последовательность фермента белка эндо-1,4-β-ксилазы штамма *G.stearothermophilus* 22. 6xHis – последовательность, состоящая из шести гистидинов, предназначенная для метал-аффинной очистки рекомбинантного белка.

На основании данных о последовательности генов ферментов разрушающих связи лигноцеллюлозы, штамма *G. stearothermophilus* 22, для сборки экспрессирующих в *E.coli* конструкций были разработаны олигонуклеотиды, предназначенные для амплификации и последующего переноса последовательностей генов в экспрессирующую конструкцию. Олигонуклеотиды подбирали таким образом, чтобы конечная конструкция содержала полную последовательность целевого гена. Последовательности олигонуклеотидов приведены в таблице 6. Олигонуклеотиды были

синтезированы ООО “Биосан” (Новосибирск). Помимо олигонуклеотидов, предназначенных для амплификации целевых генов, в таблице приведены последовательности олигонуклеотидов, предназначенных для амплификации вектора pQE30 и последующей сборки экспрессирующей конструкции (pQE30\_F1 и pQE30\_R1), а также проверки правильности сборки итоговой конструкции (pQE\_chek\_>f и pQE\_chek\_<r)

Таблица 6. Последовательности праймеров, использованных в работе.

	Название	Последовательность	Описание
1	pQE30_F1	ATGGTGATGGUGATGCGAT CCTCT	Для амплификации фрагмента экспрессирующей конструкции, вектора pQE30
2	pQE30_R1	ATTAGCTGAGCUTGGACTC CTGTT	
3	a_glucuron_F	ACCATCACCAUCACATGAC GGCGGATACGAA	Для амплификации гена фермента $\alpha$ -глюкуронидазы штамма <i>G. stearothermofillus</i> 22. Ожидаемая длина фрагмента 2064 п.н.
4	a_glucuron_R	AGCTCAGCTAAUCTACCGA TAAATTTTCCGCCCGT	
5	a_arabino_fur onosidase_F	ACCATCACCAUCACATGGC TACGAAAAAAGCAAC	Для амплификации гена фермента $\alpha$ -L-арабинофуранозидазы штамма <i>G. stearothermofilus</i> 22. Ожидаемая длина фрагмента 1530 п.н.
6	a_arabino_fur onosidase_R	AGCTCAGCTAAUCTATTTT CCTAAACGGATGACGTT	
7	Endo_xylanase_F	ACCATCACCAUCACTGAAC AGCTCCCTCCCCTC	Для амплификации гена фермента эндо-1,4- $\beta$ -ксилазазы штамма <i>G. stearothermofilus</i> 22. Ожидаемая длина фрагмента 1020 п.н.
8	Endo_xylanase_R	AGCTCAGCTAAUCTAGACA CTCACTGCCCGCCAAAA	
9	Beta_xylosidase_F	ACCATCACCAUCACCCAAC CAATCTATTTTCAACGC	Для амплификации гена фермента ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы штамма <i>G. stearothermofilus</i> 22. Ожидаемая длина фрагмента 2139 п.н.
10	Beta_xylosidase_R	AGCTCAGCTAAUCTATYAT TCYCCCTCCTCAARCCA	
11	pQE_chek_>f	CCSTTTCGTCTTCACCTCGA G	Праймеры для проверки правильности встройки итоговых конструкций
12	pQE_chek_<r	ССААGCTAGCTTGGATTCT CACC	

Для клонирования фрагментов генов карбогидраз в экспрессирующую конструкцию (плазмиду) был амплифицирован фрагмент вектора pQE30 с использованием праймеров pQE30\_F1 и pQE30\_R1, представленных в таблице 6. Амплификацию фрагментов генов карбогидраз проводили с использованием соответствующих праймеров №№ 3 – 10, представленных в таблице 6. В качестве матрицы была использована геномная ДНК штамма *G. stearothermofillus* 22. На рисунке 19 Представлена фотография агарозного гелеэлектрофореза ампликонов, синтезированных на этапе подготовки к сборке генетической конструкции. Согласно полученной картине были выявлены ампликоны, размеры которых совпадали с расчётными.

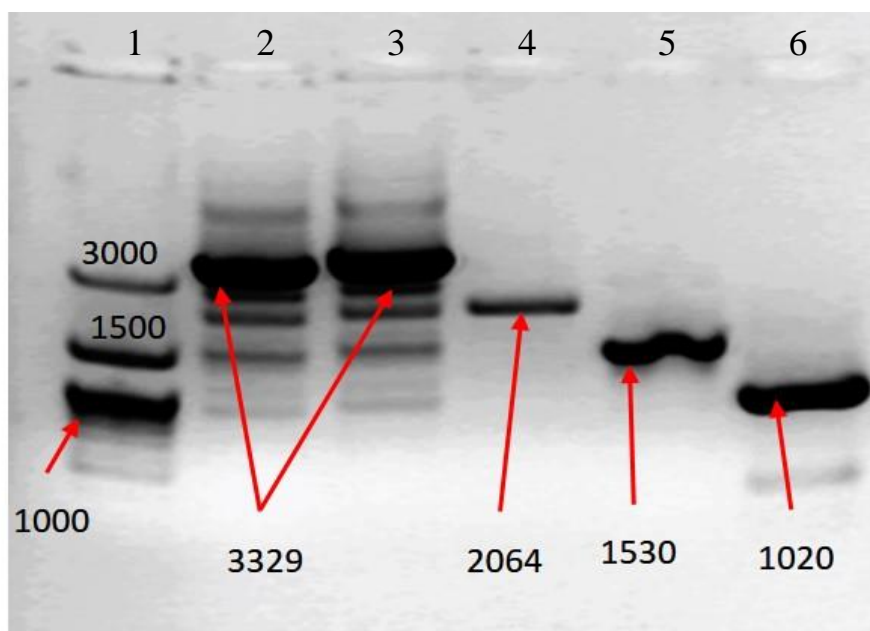


Рис. 19. Электрофореграмма ампликонов, полученных в результате амплификации генов, кодирующих ферменты участвующие в разрушении лигноцеллюлозы *G. stearothermophilus* штамм 22 и фрагмента pQE30. Дорожка 1 - ДНК-маркер 100 bp+1.5 Kb+3 Kb (НПО "СибЭнзим"); дорожки 2 и 3 – ампликоны, полученные с экспрессирующего вектора pQE30 с использованием праймеров pQE30\_F1 и pQE30\_R1; дорожка 4 – ампликон гена фермента  $\alpha$ -глюкуронидазы *G. stearothermofillus* штамм 22; дорожка 5 – ампликон гена фермента  $\alpha$ -L-арабинофуранозидазы *G. stearothermofillus*

штамм 22; 6 – ампликон гена фермента эндо-1,4-β-ксилаза *G. stearothermofillus* штамм 22.

Сборку экспрессирующих конструкций на основе вектора pQE30, проводили согласно методике с использованием урацил содержащих праймеров, описанной в главе 2. В результате были получены колонии с векторами, содержащими последовательности генов ферментов, участвующих в разрушении гемицеллюлозы, найденных в геноме штамма *G. stearothermofillus* 22: α-глюкуронидазы, арабино-фуранозидазы, эндо-1,4-β-ксилаза, ксилан-1,4-β-ксилозидазы. Далее при помощи ПЦР с использованием праймеров pQE\_chek\_>f и pQE\_chek\_<r, представленных в таблице 6, был проведен поиск колоний, несущих вставку, длина которой соответствует ожидаемой. По результатам проверки было отобрано по 5 колоний для каждой из четырех конструкций.

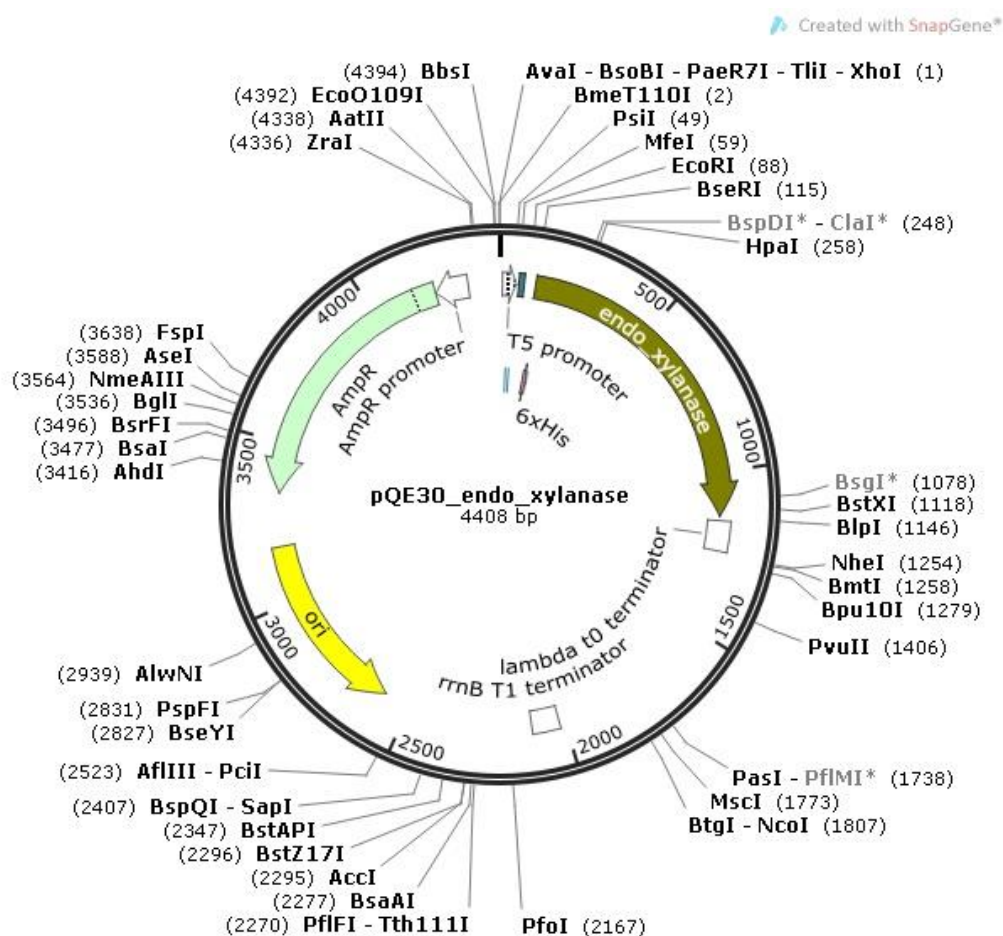


Рис. 20. Генетическая и физическая карты экспрессирующей

конструкции pQE30, несущей ген фермента эндо-1,4- $\beta$ -ксилаказы.

Обозначения: *endo\_xylanase* – последовательность гена, кодирующая фермент эндо-1,4- $\beta$ -ксилаказу; *ori* – ориджин репликации; *AmpR* – последовательность гена, обеспечивающего устойчивость клеток *E.coli* к ампициллину; *AmpR promoter* – промотор, контролирующий экспрессию гена устойчивости к ампициллину; *T5 promoter* – промотор фага T5, контролирующий экспрессию гена фермента эндо-1,4- $\beta$ -ксилаказы; *6xHis* – последовательность, добавленная к последовательности гена эндо-1,4- $\beta$ -ксилаказы с 5' конца, обеспечивающая синтез 6 гистидинов с N конца рекомбинантного белка; *lambda t0 terminator* – терминатор транскрипции фага лямбда; *rrnB T1 terminator* – терминатор транскрипции.

На рисунке 20 для примера приведена генетическая и физическая карты конструкции, собранной на основе вектора pQE30 и гена фермента эндо-1,4- $\beta$ -ксилаказы штамма *G. stearothermofillus* 22. Аналогичные конструкции были получены для генов трех других ферментов.

Для проверки синтеза целевых белков штаммами *E.coli* и последующей масс-спектрометрической верификации рекомбинантных белков была проведена наработка биомассы рекомбинантных штаммов с их последующей индукцией. Полученную биомассу лизировали и использовали для ПААГ-ДСН электрофореза. Результаты электрофоретического разделения белков биомассы рекомбинантных штаммов *E. coli* после индукции экспрессии представлены на рисунке 21. По результатам электрофореза были выявлены рекомбинантные штаммы, синтезирующие белок ожидаемого молекулярного веса (расчётные данные по молекулярному весу приведены в таблице 5).

В результате были созданы генетические конструкции для синтеза белков, участвующих в деструкции лигноцеллюлозы: эндо-1,4- $\beta$ -ксилаказы, ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы,  $\alpha$ -глюкуронидазы,  $\alpha$ -L-арабинофуранозидазы и на их основе получены продуценты новых ферментных препаратов. Правильность синтезируемых рекомбинантных белков была подтверждена при помощи масс-спектрометрического анализа триптических гидролизатов белковых фракций, полученных в ходе электрофоретического разделения в ПААГ-ДСН. Полученные спектры представлены на рисунке 22. Созданные

штаммы-продуценты рекомбинантных белков - ферментов деструкции лигноцеллюлозы, кодирующие последовательности которых были обнаружены нами в термофильной бактерии *G. stearotherophilus* штамм 22, были использованы нами для наработки препаративных количеств рекомбинантных белков.

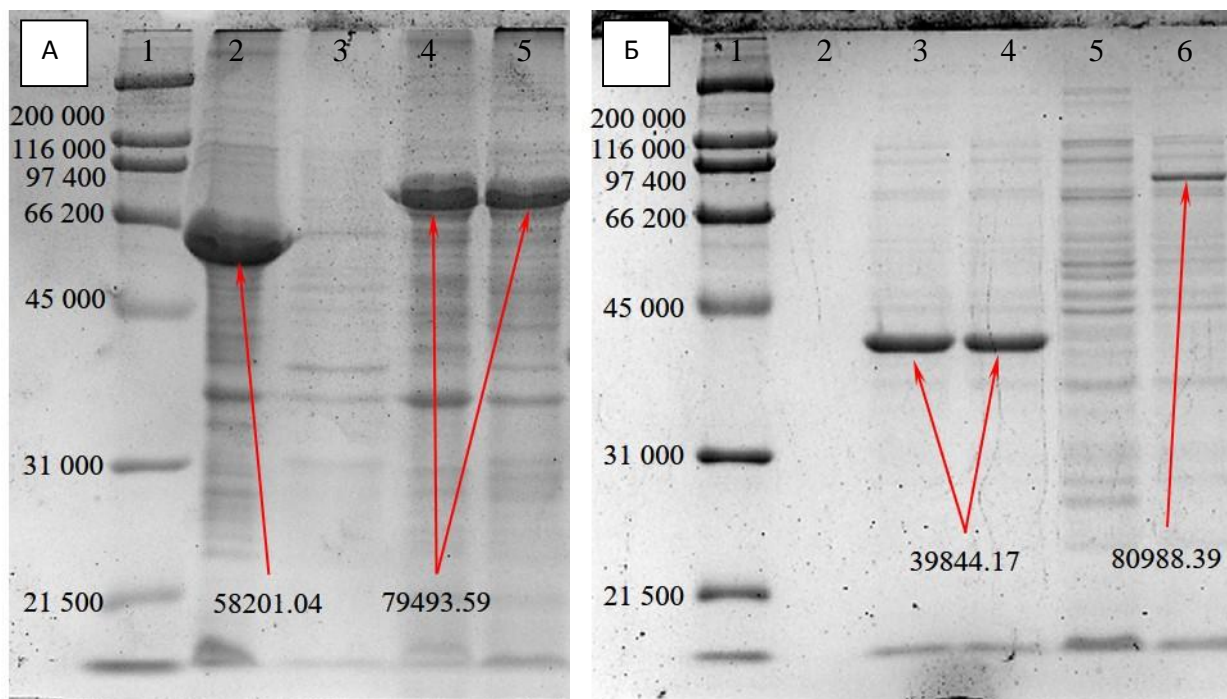


Рис. 21. Электрофореграмма белков клонов *E.coli*, несущих экспрессирующий вектор pQE30 со встроенными генами ферментов деструкции лигноцеллюлозы. В клетках индуцировали синтез белка, затем выделяли общий белок и проводили его электрофоретическое разделение в 12% ДСН-ПААГ, краситель Coomassie Brilliant Blue G-250. (А) 1 дорожка– маркер молекулярного веса широкого спектра SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (BioRad); 2,3 – клетки, несущие конструкции для синтеза  $\alpha$ -L-арабинофуранозидазы; 4, 5 – клетки, несущие конструкции для синтеза ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы. (Б) 1 дорожка– маркер молекулярного веса широкого спектра SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (BioRad); 2 – пустая дорожка; 3, 4 – клетки, несущие конструкции для синтеза эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазы; 5, 6 – клетки, несущие конструкции для синтеза  $\alpha$ -глюкуронидазы.



Обозначения: – слева от маркера приведены молекулярные веса составляющих его белков; - стрелками отмечены полосы рекомбинантных белков, под стрелками указан их расчётный молекулярный вес.

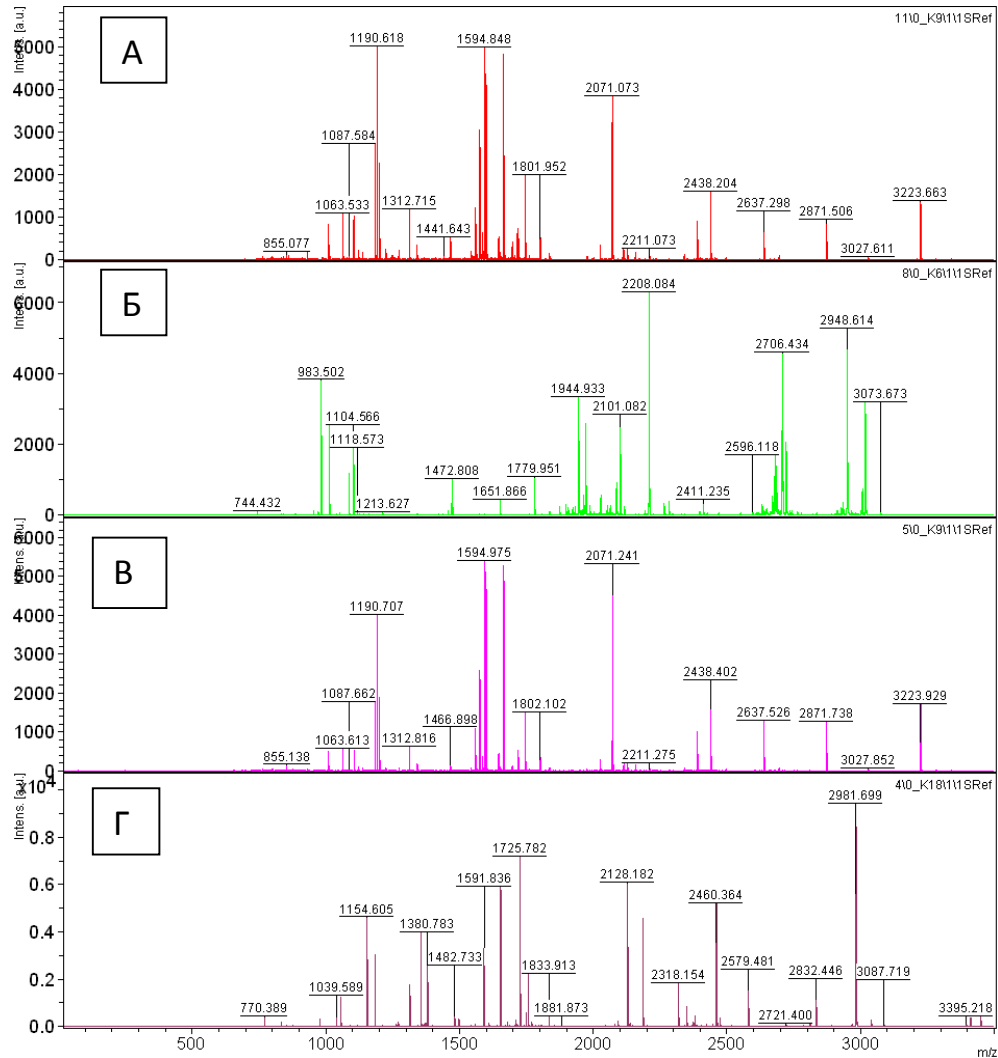


Рис. 22. Масс-спектры триптических гидролизатов белков: А -  $\alpha$ -глюкуронидаза, Б - эндо- $\beta$ -1,4-ксилаза, В -  $\alpha$ -L-арабинофуранозидаза, Г -  $\beta$ -ксилозидаза.

### 3.5 Нарботка и очистка рекомбинантных белков.

Для получения максимального выхода рекомбинантного белка на единицу объема культуральной жидкости исследователями применяются различные методы и подходы, одним из которых является оптимизация условий культивирования, позволяющих поддерживать активно растущие клетки при их высокой плотности культивирования. Именно этот подход был использован нами для повышения выхода белка на единицу объема культуральной жидкости для наработки биомассы продуцентов исследуемых нами ферментов деструкции лигноцеллюлозы. В случае использования *E.coli* как системы экспрессии для синтеза рекомбинантных белков, для поддержания ее высокой синтетической активности в условиях культивирования высокой плотности, необходимо соблюдение ряда условий. При повышении объема культуры из-за увеличения отношения объема жидкости к поверхности увеличивается необходимая для нормального роста культуры концентрация кислорода в среде. Вторым важным условием является снижение концентрации и интенсивности наработки побочных продуктов, приводящих к ингибированию роста и жизнедеятельности клетки. Третьим важным условием является использование источников углерода, позволяющих синтетическому аппарату клетки находиться в оптимальном состоянии, обеспечивающем максимальный выход целевого белка.

Основным продуктом, приводящим к интоксикации клеток *E.coli*, является уксусная кислота, синтезируемая по анаэробному пути. Снижение уровня ее наработки может быть достигнуто за счет поддержания оптимального уровня кислорода в культуральной среде, а также за счет снижения интенсивности катаболизма, что может достигаться при использовании соответствующих субстратов, медленно усваиваемых клеткой и снижении температуры культивирования. При слабой интенсивности гликолиза и высокой интенсивности цикла трикарбоновых кислот, уксусная кислота может даже метаболизироваться культурой *E.coli*. [Shiloach & Fass, 2005]. Опираясь на эти данные, мы подбирали условия, позволяющие

повысить насыщение культуральной среды кислородом в ходе культивирования. Для этих целей при культивировании штамма-продуцента в биореакторе использовали интенсивную аэрацию, а при культивировании в колбах Эрленмейера использовали соотношение объема среды к объему колбы 1/10, вместо общепринятых 1/5. Так как при снижении температуры повышается растворимость кислорода и снижается активность гликолиза, для культивирования использовали сниженную температуру 32°C.

Генетический аппарат клетки запрограммирован таким образом, чтобы обеспечивать максимально возможную экспансию с использованием наиболее легкодоступного метаболита в каждый конкретный момент времени. Если в культуральной среде присутствует глюкоза, то клетки *E.coli* начинают использовать только ее. При этом происходит интенсификация процессов гликолиза, ингибирование путей использования других метаболитов и снижение интенсивности синтетического аппарата клетки, что сопровождается снижением выхода целевых продуктов и увеличением выработки продуктов брожения. В связи с этим, для увеличения синтетической активности *E.coli* необходима замена (полностью или частично) глюкозы на другие субстраты.

Для адаптации имеющихся в литературе методов культивирования высокой плотности были протестированы различные составы питательных сред для культивирования *E.coli* в условиях высокой плотности культуры. В качестве основы использовали минимальную солевую среду MSM, состав которой приведен далее. К базовой минимальной среде добавляли различные варианты источников углерода (таблица 7) и ампициллин до концентрации 100 мкг/мл, проводили засев рекомбинантного штамма *E.coli* и пробную двадцатичетырехчасовую инкубацию в объеме 100 мл при температуре 32°C и перемешивании 250 об/мин в литровых конических колбах Эрленмейера. После 24 часов инкубирования к каждой культуре добавили 150 мкл 1М водного раствора IPTG и ампициллин из расчета 100 мкг/мл. Одновременно с началом индукции экспрессии генов рекомбинантных белков к

бактериальным культурам были добавлены дополнительные источники углерода – глицерин 2 мл и раствор, содержащий 100 г/л триптона и 50 г/л дрожжевого экстракта 3 мл. Дальнейшее инкубирование культур проводили при температуре 32°C в течение 8 часов. В ходе культивирования отбирали аликвоты для измерения оптической плотности. Графики изменения оптической плотности во время культивирования рекомбинантных штаммов, представленные на рисунке 23 демонстрируют, что после внесения индуктора и дополнительных питательных веществ в большинстве случаев угол наклона стал более крутым, что говорит об увеличении скорости роста культуры.

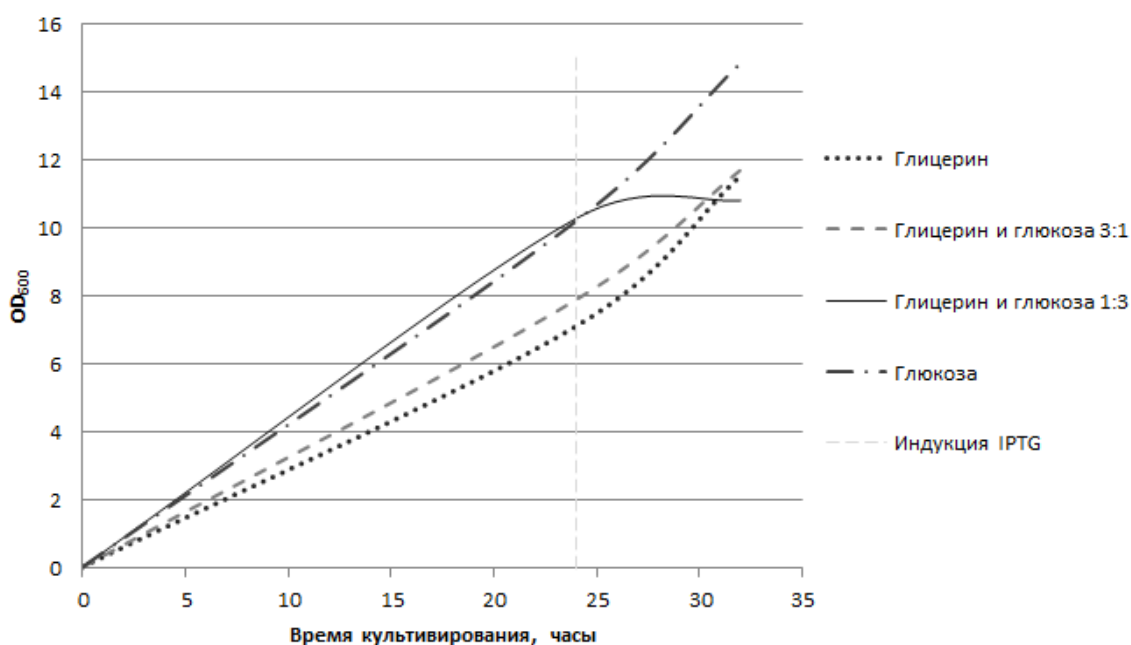


Рис. 23. Рост клеточной культуры в зависимости от состава питательной среды.

Далее, для оценки эффективности наработки рекомбинантного белка, культуры, полученные по окончании культивирования каждого тестового образца, были проанализированы при помощи ПААГ-ДНС для оценки количества рекомбинантного белка, нарабатываемого в единице объема. Фотография полученного гель-электрофореза приведена на рисунке 24. Полученная картина демонстрирует, что при культивировании в присутствии больших количеств глюкозы эффективность наработки белка очень низкая.

Максимальное количество рекомбинантного белка наблюдается, когда в качестве источника энергии использовался глицерин без добавления глюкозы.

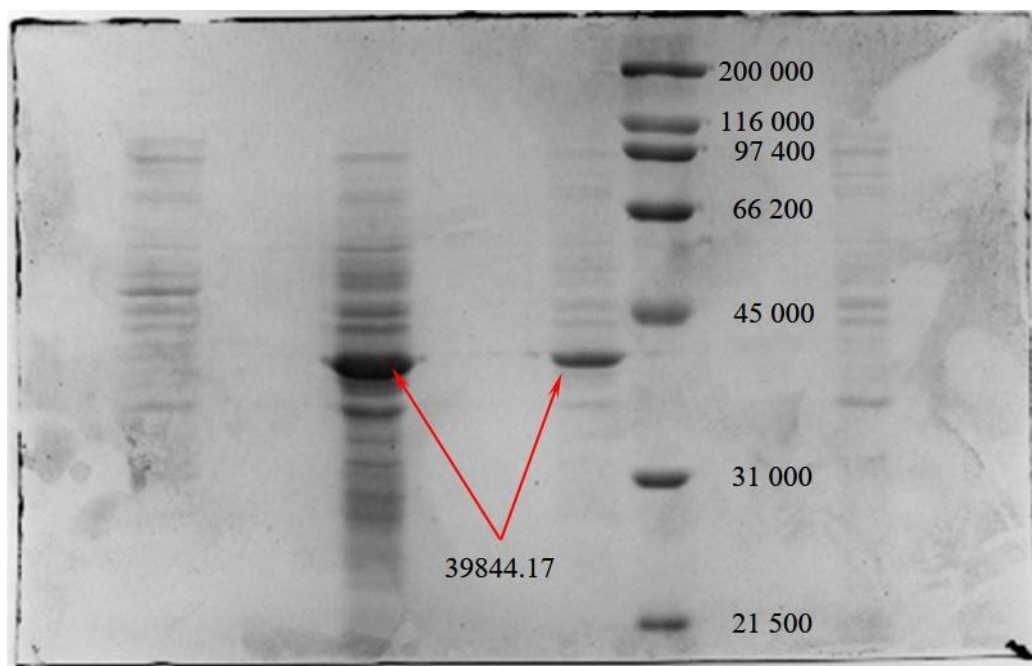


Рис. 24. Зависимость содержания рекомбинантного белка в клетках *E. coli* от стартового состава питательной среды. М – маркер молекулярного веса широкого спектра СДС-ПААГ Molecular Weight Standards, Broad Range (BioRad), 1 – среда с 10 г/л глицерина, 2 – среда, содержащая 7.5 г/л глицерина и 2.5 г/л глюкозы, 3 – среда, содержащая 2.5 г/л глицерина и 7.5 г/л глюкозы, 4 – среда с 10 г/л глюкозы. Стрелками обозначено место положения продуцируемого белка в общем спектре.

Обобщенные данные по условиям культивирования и анализу наработки рекомбинантного белка приведены в таблице 7. Из приведенных данных можно сделать выводы, что, не смотря на более низкую скорость роста культуры, в при низком содержании глюкозы мы наблюдаем более высокий выход рекомбинантного белка с единицы объема культуры. При этом даже небольшое добавление глюкозы в среду радикально снижает выход целевого белка. На основе полученных данных был выбран глицерин в качестве единственного источника углерода, поскольку он позволяет получать максимальную продукцию рекомбинантного белка при достаточно высокой плотности клеточной культуры. Дальнейшие эксперименты по оптимизации

состава среды показали, что глицерин при индукции можно добавлять без триптона и дрожжевого экстракта.

Таблица 7. Источники углерода, использовавшиеся для установления оптимального источника углерода на разных стадиях культивирования *E. coli* в культурах высокой плотности без уменьшения уровня продукции рекомбинантного белка.

Исследованные варианты начального источника углерода		
№п/п	Источник углерода	Уровень содержания рекомбинантного белка
1	Глицерин 10г/л	Высокий
2	Глицерин и глюкоза в пропорции 3:1 по массе, концентрация смеси 10г/л	Высокий
3	Глицерин и глюкоза в пропорции 1:3 по массе, концентрация смеси 10г/л	Крайне низкий
4	Глюкоза 10г/л	Крайне низкий (при максимальном значении OD600)

На основании этих данных был разработан протокол, представленный далее. Ночные культуры клеток *E.coli*, содержащие векторные конструкции со встройкой генов соответствующих карбогидраз, культивировали в среде LB (рН=8.0) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина при температуре 32°C и 250 об/мин в термостатируемом шейкере. Затем 200 мл культуры инокулировали в вихревой биореактор «Энлиль» (ООО «Центр Вихревых Технологий») с 2 л стерильной минимальной солевой среды MSM (2.0 г/л Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6.12 г/л (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.50 г/л NH<sub>4</sub>Cl, 14.60 г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.60 г/л NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.00 г/л двухосновного цитрата аммония, 0.36 г/л MgSO<sub>4</sub>, 4 мл раствора солей микроэлементов, содержащего 0.50 г/л CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 0.18 г/л ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.10 г/л MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 20.1 г/л Na<sub>2</sub>-ЭДТА, 16.70 г/л FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 0.16 г/л CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O, 0.18 г/л CoCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O) в среду добавляли 10 г/л глицерина, 0.1 г/л тиамина гидрохлорида и 0.1 г/л ампициллина. Параметры культивирования: 32°C, 1400

об/мин, контроль уровня pH с помощью 30% NaOH, принудительная воздушная аэрация 2 л/мин. Через 24 часа в колбу биореактора добавили 2 мл 1М водного раствора IPTG, 0.2 г ампициллина и 80 мл 50%-го водного раствора глицерина. Культивирование продолжили без изменения условий в течение 8 часов.

Согласно приведенному протоколу было выполнено культивирование для четырех рекомбинантных штаммов *E.coli*, несущих векторные конструкции, экспрессирующие целевые гены карбогидраз. Изменение оптической плотности культуры в ходе культивирования в биореакторе для каждого штамма-продуцента показано на рисунке 25.

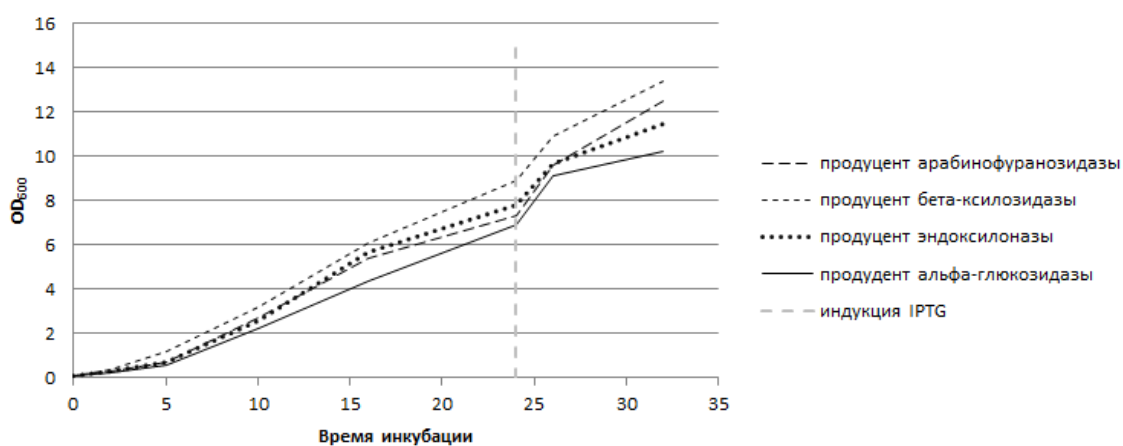


Рис. 25. Изменение оптической плотности культур штаммов-продуцентов рекомбинантных карбогидраз во время культивирования.

Согласно приведенным графикам конечная плотность культур рекомбинантных штаммов-продуцентов карбогидраз варьирует в пределах 30% процентов, что может быть обусловлено как случайными факторами, так и свойствами целевых генов, встроенных в ген-экспрессирующие плазмидные вектора.

В результате проведенных экспериментов были подобраны условия для культивирования высокой плотности клеток *E.coli*, несущих экспрессирующие вектора pQE30. Это позволило нарабатывать ферментативные препараты в необходимых количествах, используя объемы

лабораторного биореактора. Из биомассы рекомбинантных штаммов при помощи высаливания сульфатом аммония проведено фракционирование белков и отобраны фракции с наибольшими концентрациями целевых рекомбинантных белков. Полученные ферментативные препараты были использованы в дальнейших работах по определению их свойств.



### 3.6 Изучение свойств, полученных рекомбинантных карбогидраз

Согласно методике, приведенной в главе 2 “Материалы и методы”, было проведено определение активности ферментативных препаратов рекомбинантных белков: эндо-1,4- $\beta$ -ксилаказы, ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы и  $\alpha$ -глюкуронидазы. На рисунке 28 приведены графики зависимости ферментативных активностей полученных нами препаратов от значений температуры и pH реакционной смеси.

Препарат ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы (рисунок 26, А) имеет оптимальные значения pH в диапазоне от 5 до 5,5. В этом диапазоне pH максимальная активность фермента проявляется при температуре 65°C. При удалении от оптимальных условий наблюдается падение уровня активности фермента. Изменение значений pH в реакционной среде имеет огромное значение для активности фермента, при переходе в слабощелочную область активность препарата резко падает. На графике видно, что при достижении pH=7,5, независимо от температуры проведения реакции, ферментативная активность не наблюдается. Также резкое снижение активности фермента происходит при повышении температуры реакции выше 65°C, в диапазоне от 45 до 65°C наблюдается плавное увеличение ферментативной активности в широком (от 4 до 6,5) диапазоне pH. При сдвиге значений pH среды в щелочную область оптимальная температура для функционирования ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы понижается. Так, при pH от 6 до 6,5 температурный оптимум составил 60°C, а при pH=7 температурный оптимум составил 55°C. Описанная ранее ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидаза GH52 из *Geobacillus stearothermophilus* имеет максимум активности при 70°C и pH 5.5 [Huang et al., 2014]. Клонированная нами ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидаза демонстрирует максимальную активность при том же pH, но несколько меньшей температуре.

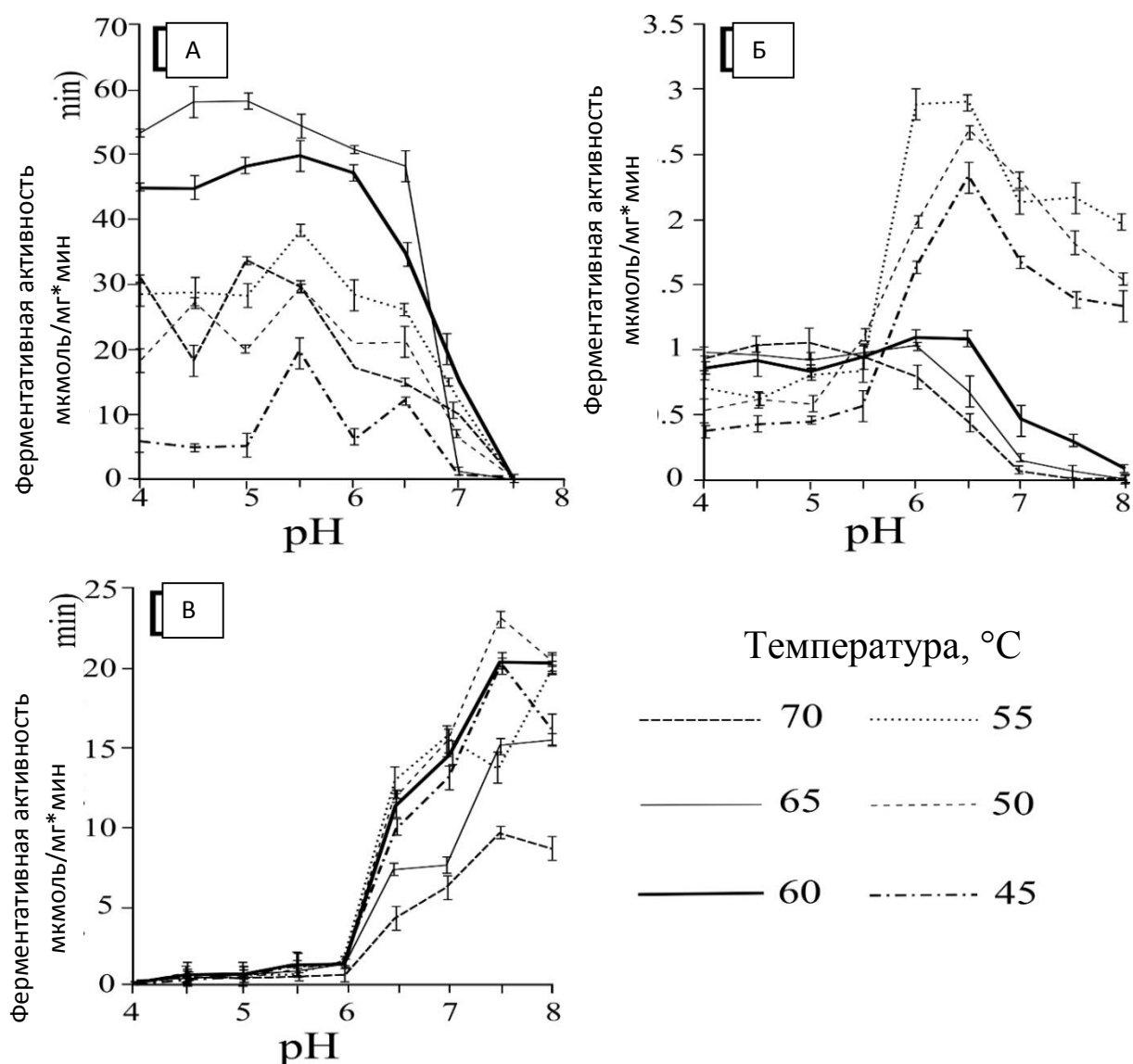


Рис. 26. Зависимость активности полученных ферментных препаратов от значений температуры и pH реакционной смеси. А – активность ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы, считали по высвобождению п-нитрофенильной группы, в качестве субстрата использовали 4-нитрофенил- $\beta$ -D-ксилопиранозид; Б – активность эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазы, считали по высвобождению п-нитрофенильной группы, в качестве субстрата использовали 4-нитрофенил- $\beta$ -D-ксилопиранозид; В – активность  $\alpha$ -глюкуронидазы, измеряли при помощи набора  $\alpha$ -Glucuronidase Assay Kit (Megazyme, Ireland)

Результаты определения свойств ферментативного препарата эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазы представлены на рисунке 26, Б. Как видно из представленных на

данном рисунке графиков, зависимость активности фермента от значений рН меняется в зависимости от изменений температуры. При температуре 45 – 55°C активность фермента резко возрастает при рН 6.0 – 6.5 и далее падает при снижении рН до 8.0. При температуре 60-70°C наблюдается стабильное плато при значениях рН от 4.0 до 5.5. При температуре 65°C активность фермента сохраняется до рН 6.0, при температуре 60°C до рН 6.5. Далее активность падает и при рН 8.0 равна или практически равна нулю, при всех температурах. Чем выше температура, тем быстрее падает активность фермента в диапазоне рН 6.5 – 8.0. Для описанного ранее близкого по последовательности фермента эндо-β-1,4-ксилазазы из *Geobacillus sp. WSUCF1* был показан более высокий температурный оптимум (70°C) и гораздо более низкий оптимум рН, равный 5 [Rastogi et al., 2010].

Профили активности ферментативного препарата α-глюкуронидазы при разных рН и температуре представлены на рисунке 26.В. Из графиков очевидно, что при рН менее 6.0 ферментативная активность препарата низка и остается близкой к нулю. При рН от 6.5 до 7.5 ферментативная активность растет при всех температурах. Максимальную активность фермент проявляет при рН=7.5. Наиболее благоприятная температура для работы α-глюкуронидазы составляет 45-60°C, в этом диапазоне ферментативная активность была примерно одинакова. Повышение температуры реакционной смеси до 65°C уменьшает активность фермента на 30%, до 70°C – на 55%. α-глюкуронидаза *G.stearothermophilus* штамм 22 имеет немного меньшую термостабильность и более щелочной оптимум работы по сравнению с α-глюкуронидазой Т-6, которая продемонстрировала максимум активности при рН 5.5±6.0, и сохраняет около 40% активности при рН 4.5 и 7.5. Максимум активности α-глюкуронидаза Т-6 проявляет при рН 7.0 и температуре 65°C при времени реакции 10 минут [Zaide et al., 2001].

В сравнении с описанными в литературе ферментами, имеющими схожие последовательности, ферменты, полученные в нашей работе имеют немного меньшую температурную стабильность. Возможно, это связано с тем,

что время реакции в дизайне эксперимента у нас было несколько выше в сравнении с данными, приведенными в литературе, а прогрев, за счет маленького объема, осуществлялся быстрее.

*Для проверки устойчивости к воздействию ИЖ* эндо-1,4- $\beta$ -ксилаказы и ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы были выполнены экспериментальные работы по изучению влияния 1-бутил-3-метилимидазолий хлорида [bmim]Cl на их активность. На рисунке 27 представлены зависимости ферментативной активности эндо-1,4- $\beta$ -ксилаказы и ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы в присутствии различных концентраций [bmim]Cl.

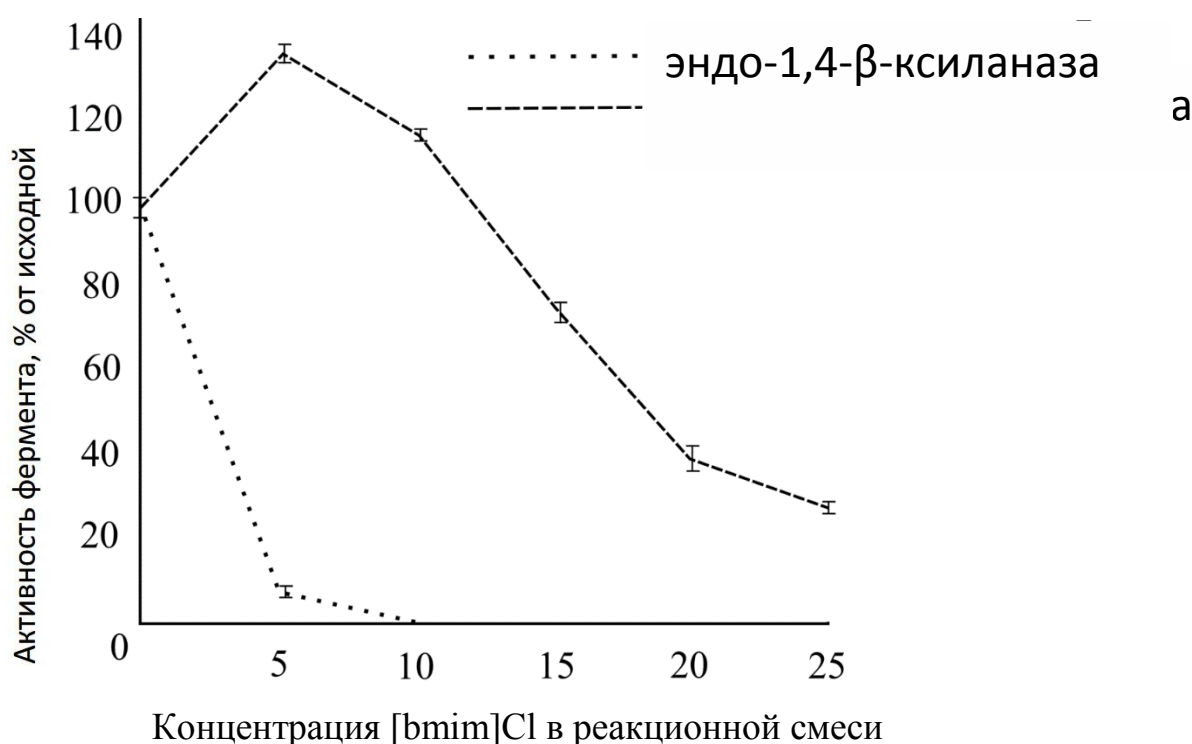


Рис. 27. Активность ферментов в присутствии различных концентраций ионных жидкостей.

По графикам, представленным на рисунке 27, можно сделать следующие выводы. Ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидаза демонстрирует увеличение ферментативной активности при концентрации ионной жидкости 5 и 10%. При дальнейшем повышении концентрации ионной жидкости ферментативная активность падает, и при 15%-ной концентрации [bmim]Cl теряется около 30% активности от контрольной. Дальнейшее повышение концентрации [bmim]Cl

сопровождается усилением падения ферментативной активности. При максимальной исследованной концентрации ионной жидкости 25%, активность ферментативного препарата ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы составила около 30% от активности, показанной для ферментативного препарата в оптимальных условиях без ИЖ.

Ферментативная активность препарат эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазы демонстрирует резкое снижение уже при минимальной концентрации [bmim]Cl, равной 5%. При концентрации [bmim]Cl, равной 10%, ферментативная активность препарата эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазы не наблюдается. В литературе описана ксиланаза, которая активна в присутствии ИЖ [Jaeger, Pfaendtner 2013]. Возможно, что в нашем случае отсутствие стабильности у фермента обусловлено свойствами глобулы белка, а не активного центра.

В общем, такое поведение ферментов в присутствии ионных жидкостей является распространенным явлением. Часть ферментов хорошо переносит их присутствие, а часть инактивируется полностью уже при небольшой концентрации. Например, комплексный ферментный препарат, сделанный на основе ферментов термофильных бактерий “JTherm”, продемонстрировал сохранение 50% активности в присутствии 20% [EMIM]AcO при 70°C по сравнению с обычными условиями [Park et al., 2012]. В работе Gladden с соавторами проводился поиск среди термофильных ферментов бактерий, адаптированных к росту на субстрате из биомассы растений, целлюлаз, устойчивых к воздействию ионных жидкостей. В результате были получены данные о том, что даже среди разных вариантов термостабильных белков, относящихся к одному классу ферментов, наблюдается координальный разброс по устойчивости к воздействию ИЖ. Ферменты способны работать при максимальных концентрациях ИЖ от 0 до 40% [Gladden et al., 2014].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метагеномные исследования микробных матов источника Гаргинского выявили наличие в нем трехслойной структуры. Верхний слой – слой активного фотосинтеза, в котором происходит накопление органического вещества. Доминирование цианобактерий в этом слое очень высоко. Более 50% обнаруженных последовательностей в верхнем слое принадлежит к типу *Cyanobacteria*. Средний слой, в котором происходит снижение освещенности, потока вещества из вод источника и содержания кислорода, как в дневное, так и в ночное время. *Cyanobacteria* здесь занимают ~28%. Ввиду снижения интенсивности освещения в этом слое, а также из-за снижения потока  $\text{CO}_2$  из вод источника, эффективность фотосинтеза снижается. По мере роста микробного мата, расположенные в нижних слоях мата фотосинтезирующие микроорганизмы отмирают. В результате формируется нижний слой микробного мата. Это зона деструкции, здесь происходит разложение клеток фототрофов и бактерий, плохо приспособленных к жизни в анаэробных условиях. В нижнем слое доля последовательностей, относящихся к типу *Cyanobacteria*, составляет менее 5%, скорее всего это не до конца гидролизованные остатки или споры. Значительно возрастает доля гетеротрофов *Proteobacteria* и *Actinobacteria*, появляются представители не выявленных в более высоких слоях групп *Firmicutes (Clostridia)* и *Thermi*. Представители анаэробных гетеротрофов сбраживают остатки отмерших клеток и переводят их в низкомолекулярные соединения, которые, попадая в верхние слои микробного мата, используются аэробными микроорганизмами. Таким образом, в условиях микробного мата источника Гаргинского существует практически замкнутый цикл углерода. Кроме того, благодаря наличию слоев с разным содержанием кислорода, могут быть полноценно реализованы циклы серы и азота.

Анализ микробных образцов, отобранных в наиболее высокотемпературной точке источника Гаргинского, выявил наличие значительного числа представителей Archaea, которые занимали ~20% от общего числа последовательностей. Для многих ОТЕ не было обнаружено последовательностей с высоким уровнем сходства как среди культивируемых, так и среди некультивируемых микроорганизмов. Это говорит о высокой эндемичности описываемого архейного сообщества.

В результате 16S рРНК метагеномного анализа бентосного микробного сообщества источника Заварзина, расположенного в кальдере вулкана Узон на Камчатке, установлено, что основную долю по численности в данном микробном сообществе занимают бактерии, способные к образованию матрикса, позволяющего формировать плотную структуру кожистого мата. Это представители типов *Caldisericum* и *Dictyoglomi*, в сумме они занимают более 60%. В качестве первичных продуцентов органического вещества могут выступать представители типа *Aquificae*, занимающие долю 12.7%. К использованию серы в качестве акцептора электронов способно большинство обнаруженных в ходе работы микроорганизмов, что логично, так как сообщество расположено между слоями серы. Азотфиксацию в сообществе могут обеспечивать представители типа *Nitrospirae*, доля которых составляет 3.2%.

Метагеномные исследования геотермальных мест обитания Прибайкалья и Камчатки увеличили объем знаний о биологическом разнообразии микробных сообществ, их населяющих. В том числе было показано, что микробные сообщества Прибайкалья содержат в себе большое количество микроорганизмов, которые не были обнаружены в других геотермальных местах обитания.

Выполняя исследование термофильных микробных сообществ, мы не могли обойти вниманием возможность поиска генов термостабильных ферментов в геноме микроорганизмов, которые могут быть выделены из

имеющихся в нашем распоряжении образцов. В рамках работы нас интересовал поиск термостабильных ферментов деструкции лигноцеллюлозы и определение их устойчивости к воздействию ионных жидкостей. Несмотря на развитие современных подходов анализа микробиологических сообществ, по-прежнему актуальными остаются классические методы микробиологии, направленные на выделение новых штаммов бактерий из природных микробных сообществ, с последующим их филогенетическим описанием и геномным секвенированием. В рамках диссертационной работы были выделены представители трех термофильных родов бактерий *Geobacillus*, *Anoxybacillus* и *Thermoactinomyces*. Согласно фенотипическим и филогенетическим характеристикам один из штаммов был определен как новый вид, который был депонирован в открытые коллекции под названием *Geobacillus icigianus*. Для шести штаммов, включая штамм нового вида, было выполнено полногеномное секвенирование.

В ходе анализа данных полногеномного секвенирования ДНК выделенных в ходе работы термофильных микроорганизмов в геноме бактерий *G.stearothermophilus*, штамм 22 и 53, из проб геотермальных источников Прибайкалья, был обнаружен оперон, содержащий гены ферментов деструкции лигноцеллюлозы.

Было проведено клонирование обнаруженных генов термофильных ферментов в экспрессирующие конструкции *E.coli*, что позволило получить целевые белки в необходимых для изучения их свойств количествах. Были получены продуценты 4-х рекомбинантных ферментов: эндо-1,4- $\beta$ -ксилаза, ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы,  $\alpha$ -глюкуронидазы и  $\alpha$ -L-арабинофуранозидазы. Согласно данным по исследованию ферментативных активностей, рекомбинантные белки (эндо-1,4- $\beta$ -ксилаза, ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазы,  $\alpha$ -глюкуронидазы) проявляли стабильность до температуры 65°C.

Одним из аспектов работы было исследование свойств полученных в работе рекомбинантных ферментов в присутствии ионных жидкостей. Для



этого было проведено изучение влияния 1-бутил-3-метил имидазолиум хлорида ([bmim]Cl) на эндо-1,4- $\beta$ -ксиланазу и ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидазу. Эти исследования показали, что ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидаза проявляла активность при достаточно высоких концентрациях [bmim]Cl до 25%, что дает основание для рассмотрения возможности ее использования при создании комплексных ферментативных препаратов для осахаривания лигноцеллюлозы после предобработки ионными жидкостями. Напротив, рекомбинантная эндо-1,4- $\beta$ -ксилаза проявила лабильность к воздействию ионных жидкостей.

## ВЫВОДЫ

1. Основной микробного мата источника Гаргинского (Прибайкалье) являются цианобактерии, рода *Leptolyngbya*. Аноксигенные фототрофы типов Chloroflexi (*Chloroflexus*, *Anaerolineae*) и Chlorobi не занимали доминирующего положения, но присутствовали в значительном количестве в высокотемпературных частях микробного мата. Большую часть гетеротрофных микроорганизмов составили представители типов Proteobacteria и Actinobacteria. Археи в значительном числе (19.9%) были выявлены в самом высокотемпературном (74°C) образце из исследованных. Метаболизм микробного мата в основном строится на взаимодействии фотоавтотрофных и гетеротрофных микроорганизмов.

2. Структуру бентосного микробного сообщества источника Заварзина формируют представители типов Caldiseptica (34,8%) и Dictyoglomi (25,5%). Менее представленными в исследуемом бентосном сообществе были бактерии, обеспечивающие первичную продукцию, литоавтотрофные бактерии Aquificae (12,7%). Следующие по численности представители Deltaproteobacteria (7,3%). Азотфиксацию в сообществе обеспечивают Nitrospirae (3,2%).

3. Выделенные в чистую культуру из образцов микробных матов и донных отложений Камчатки и Прибайкалья бактерии филогенетически были отнесены к трем родам: *Geobacillus*, *Anoxybacillus* и *Thermoactinomyces*.

4. Штамм *Geobacillus* sp. G1W1, выделенный из образцов донных отложений геотермальных источников Камчатки, определен как новый вид - *Geobacillus icigianus* тип Firmicutes.

5. Согласно данным полногеномного секвенирования в геноме *G.stearotherophilus* (штаммы 22 и 53) выявлены гены четырех ферментов деструкции лигноцеллюлозы: эндо-1,4-β-ксилазы, ксилан-1,4-β-ксилозидазы, α – глюкуронидазы и α-L-арабинофуранозидазы. На основе найденных генов были получены соответствующие рекомбинантные продуценты.

6. Найденные ферменты эндо-1,4- $\beta$ -ксилаза, ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидаза и  $\alpha$ -глюкуронидаза являются термостабильными и проявляют ферментативную активность при температуре 60°C.

7. Установлено, что ксилан-1,4- $\beta$ -ксилозидаза ингибируется 1-бутил-3-метилимидазолиум хлоридом только при концентрации 15% и более.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H. W., Fricke, H., Trincone, A., ... & Stetter, K. O. (1991). *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 C. *Archives of Microbiology*, 156(4), 239-247.
2. Rothschild, L. J., & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101
3. Gumerov VM, Mardanov AV, Beletsky AV, Bonch-Osmolovskaia EA, Ravin NV: Molecular analysis of microbial diversity in the Zavarzin Spring, the Uzon caldera. *Mikrobiologia* 2011, 80:258-265.
4. Rozanov, A. S., Bryanskaya, A. V., Malup, T. K., Meshcheryakova, I. A., Lazareva, E. V., Taran, O. P., ... & Peltek, S. E. (2014). Molecular analysis of the benthos microbial community in Zavarzin thermal spring (Uzon Caldera, Kamchatka, Russia). *BMC genomics*, 15(Suppl 12), S12.
5. Chernyh, N. A., Mardanov, A. V., Gumerov, V. M., Miroshnichenko, M. L., Lebedinsky, A. V., Merkel, A. Y., ... & Moran, M. A. (2015). Microbial life in Bourlyashchy, the hottest thermal pool of Uzon Caldera, Kamchatka. *Extremophiles*, 19(6), 1157-1171.
6. Gaisin, V. A., Kalashnikov, A. M., Sukhacheva, M. V., Namsaraev, Z. B., Barhutova, D. D., Gorlenko, V. M., & Kuznetsov, B. B. (2015). Filamentous anoxygenic phototrophic bacteria from cyanobacterial mats of Alla hot springs (Barguzin Valley, Russia). *Extremophiles*, 19(6), 1067-1076.
7. Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
8. Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5(10), R245-R249.
9. Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., ... & Banfield, J. F. (2004). Community structure and metabolism through

- reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428(6978), 37-43.
10. Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., ... & Smith, H. O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *science*, 304(5667), 66-74.
  11. Stal, L. J. (2000). Cyanobacterial mats and stromatolites. The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space.
  12. Заварзин, Г. А. (2003). Эволюция геосферно-биосферной системы. *Природа*, 1, 27-35.
  13. Dupraz, C., Reid, R. P., Braissant, O., Decho, A. W., Norman, R. S., & Visscher, P. T. (2009). Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*, 96(3), 141-162.
  14. Yallop, M. L., de Winder, B., Paterson, D. M., & Stal, L. J. (1994). Comparative structure, primary production and biogenic stabilization of cohesive and non-cohesive marine sediments inhabited by microphytobenthos. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 39(6), 565-582.
  15. Van Gemerden, H. (1993). Microbial mats: a joint venture. *Marine Geology*, 113(1-2), 3-25.
  16. Visscher, P. T., & Stolz, J. F. (2005). Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 219(1), 87-100.
  17. De Philippis, R., & Vincenzini, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(3), 151-175.
  18. Grant J, Gust G (1987) Prediction of coastal sediment stability from photopigment content of mats of purple sulfur bacteria. *Nature* 330: 244–246.
  19. Pomeroy LR, Williams PJI, Azam F, Hobbie JE (2007) The microbial loop. *Oceanography* 20: 28–33.
  20. Stal LJ, Moezelaar R (1997) Fermentation in Cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* 21: 179–211.

21. Visscher PT, Prins RA, van Gernerden H (1992) Rates of sulfate reduction and thiosulfate consumption in a marine microbial mat. *FEMS Microbiol Ecol* 86: 283–293.
22. Iqbal, H. M. N., Kyazze, G., & Keshavarz, T. (2013). Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. *BioResources*, 8(2), 3157-3176.
23. Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W. R. (2007). Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(5), 955-962.
24. Zhao, H., Jones, C. L., Baker, G. A., Xia, S., Olubajo, O., & Person, V. N. (2009). Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 139(1), 47-54.
25. Hong, F., Guo, X., Zhang, S., Han, S. F., Yang, G., & Jönsson, L. J. (2012). Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. *Bioresource technology*, 104, 503-508.
26. Engel, P., Krull, S., Seiferheld, B., & Spiess, A. C. (2012). Rational approach to optimize cellulase mixtures for hydrolysis of regenerated cellulose containing residual ionic liquid. *Bioresource technology*, 115, 27-34.
27. Turner, P., Mamo, G., & Karlsson, E. N. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact*, 6(9), 1-23.
28. Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., & Kondo, A. (2013). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource technology*, 135, 513-522.
29. Tsudome, M., Deguchi, S., Tsujii, K., Ito, S., & Horikoshi, K. (2009). Versatile solidified nanofibrous cellulose-containing media for growth of extremophiles. *Applied and environmental microbiology*, 75(13), 4616-4619.

30. Chistoserdova, L. (2010). Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. *Biotechnology letters*, 32(10), 1351-1359.
31. Pham, V. H., & Kim, J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in biotechnology*, 30(9), 475-484.
32. Stewart, E. J. (2012). Growing unculturable bacteria. *Journal of bacteriology*, 194(16), 4151-4160.
33. Schütte, U. M., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D., & Forney, L. J. (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(3), 365-380.
34. Cai, L., Ye, L., Tong, A. H. Y., Lok, S., & Zhang, T. (2013). Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets. *PLoS One*, 8(1), e53649.
35. Debross, D., Humbert, J. F., Enault, F., Bronner, G., Faubladiere, M., & Cornillot, E. (2009). Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget-France). *Environmental microbiology*, 11(9), 2412-2424.
36. Vogel, T. M., Simonet, P., Jansson, J. K., Hirsch, P. R., Tiedje, J. M., van Elsas, J. D., ... & Philippot, L. (2009). TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 252.][ Virgin, H. W., & Todd, J. A. (2011). Metagenomics and personalized medicine. *Cell*, 147(1), 44-56.
37. Schmidt, T. M., DeLong, E. F., & Pace, N. R. (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of bacteriology*, 173(14), 4371-4378.
38. Chien, A., Edgar, D. B., & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of bacteriology*, 127(3), 1550-1557.

39. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
40. Inskip, W. P., Jay, Z. J., Tringe, S. G., Herrgård, M. J., Rusch, D. B., Committee, Y. M. P. S., & Members, W. G. (2013). The YNP metagenome project: environmental parameters responsible for microbial distribution in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Frontiers in microbiology*, 4, 67.
41. Bohorquez, L. C., Delgado-Serrano, L., López, G., Osorio-Forero, C., Klepac-Ceraj, V., Kolter, R., ... & Zambrano, M. M. (2012). In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes. *Microbial ecology*, 63(1), 103-115.
42. Tekere, M., Lötter, A., Olivier, J., Jonker, N., & Venter, S. (2013). Metagenomic analysis of bacterial diversity of Siloam hot water spring, Limpopo, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 10(78), 18005-18012.
43. Pagaling, E., Grant, W. D., Cowan, D. A., Jones, B. E., Ma, Y., Ventosa, A., & Heaphy, S. (2012). Bacterial and archaeal diversity in two hot spring microbial mats from the geothermal region of Tengchong, China. *Extremophiles*, 16(4), 607-618.
44. Portillo, M. C., Sririn, V., Kanoksilapatham, W., & Gonzalez, J. M. (2009). Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles*, 13(2), 321-331.
45. Holmes, A. J., Tujula, N. A., Holley, M., Contos, A., James, J. M., Rogers, P., & Gillings, M. R. (2001). Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environmental Microbiology*, 3(4), 256-264.
46. López-López, O., Knapik, K., Cerdán, M. E., & González-Siso, M. I. (2015). Metagenomics of an alkaline hot spring in Galicia (Spain): microbial diversity analysis and screening for novel lipolytic enzymes. *Frontiers in microbiology*, 6.



47. Leis, B., Angelov, A., & Liebl, W. (2013). Screening and expression of genes from metagenomes. *Advances in applied microbiology*, 83, 1-68.
48. Elleuche, S., Schröder, C., Sahn, K., & Antranikian, G. (2014). Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current opinion in biotechnology*, 29, 116-123.
49. Jegannathan, K. R., & Nielsen, P. H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. *Journal of cleaner production*, 42, 228-240.
50. Fogarty, W. M., & Kelly, C. T. (Eds.). (2012). *Microbial enzymes and biotechnology*. Springer Science & Business Media.
51. López-López, O., Cerdán, M. E., & Siso, M. I. G. (2014). New extremophilic lipases and esterases from metagenomics. *Current protein & peptide science*, 15(5), 445.
52. Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 48(2), 201-211.
53. Toplak, A., Wu, B., Fusetti, F., Quaedflieg, P. J., & Janssen, D. B. (2013). Proteolysin, a novel highly thermostable and cosolvent-compatible protease from the thermophilic bacterium *Coprothermobacter proteolyticus*. *Applied and environmental microbiology*, 79(18), 5625-5632.
54. Esvelt, K. M., & Wang, H. H. (2013). Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Molecular systems biology*, 9(1), 641
55. Ikeda, M., & Takeno, S. (2013). Amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. In *Corynebacterium glutamicum* (pp. 107-147). Springer Berlin Heidelberg.
56. Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.

57. Raaijmakers, J. M., Vlami, M., & De Souza, J. T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 537-547.
58. Burgess, C. M., Smid, E. J., & van Sinderen, D. (2009). Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: an overview. *International journal of food microbiology*, 133(1), 1-7.
59. Svetlitchnyi, V. A., Kensch, O., Falkenhan, D. A., Korseska, S. G., Lippert, N., Prinz, M., ... & Curvers, S. (2013). Single-step ethanol production from lignocellulose using novel extremely thermophilic bacteria. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 31-46.
60. Frock, A. D., & Kelly, R. M. (2012). Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis. *Current opinion in chemical engineering*, 1(4), 363-372
61. F Bosma, E., van der Oost, J., M de Vos, W., & van Kranenburg, R. (2013). Sustainable production of bio-based chemicals by extremophiles. *Current Biotechnology*, 2(4), 360-379.
62. Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review// *Bioresour. Technol.* 2002. 83. P. 1–11. Hames B.R. Biomass compositional analysis for energy applications// *Methods in Mol.* 2009. 581. P. 145–167.
63. Henry R.J. Evaluation of plant biomass resources available for replacement of fossil oil// *Plant Biotechnol. J.* 2010. 8(3). P. 288–293.
64. Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160-167.
65. Ljungdahl, L. G., & Eriksson, K. E. (1985). Ecology of microbial cellulose degradation. In *Advances in microbial ecology* (pp. 237-299). Springer US.
66. Brown, R. M. (2013). *Cellulose and other natural polymer systems: biogenesis, structure, and degradation*. Springer Science & Business Media.
67. Reese E. 1976. History of cellulase program at US Army Natick Development Center. *Proc. Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6:9–20.

68. Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, et al. 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* 26:553–60
69. Rouvinen J, Bergfors T, Teeri T, Knowles JKC, Jones TA. 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 249:380–86
70. Linder M, Lindeberg G, Reinikainen T, Teeri TT, Pettersson G. 1995. The difference in affinity between two fungal cellulose-binding domains is dominated by a single amino acid substitution. *FEBS Lett.* 372:96–98
71. Divne C, Stahlberg J, Teeri TT, Jones TA. 1998. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.* 275:309–25
72. Harrison MJ, Nouwens AS, Jardine DR, Zachara NE, Gooley AA, et al. 1998. Modified glycosylation of cellobiohydrolases
73. Adney WS, Jeoh T, Beckham GT, Chou YC, Baker JO, et al. 2009. Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis. *Cellulose* 16:699–709
74. Heinzelman P, Snow CD, Smith MA, Yu XL, Kannan A, et al. 2009. SCHEMA recombination of a fungal cellulase uncovers a single mutation that contributes markedly to stability. *J. Biol. Chem.* 284:26229–33
75. Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Kenerley C.M. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective// *Microbiology*. 2012. 158(Pt 1). P. 35–45.,
76. Dashtban M., Buchkowski R., Qin W. Effect of different carbon sources on cellulase production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains// *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2011. 2(3). P. 274–286.
77. Cherry, J. R., & Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current opinion in biotechnology*, 14(4), 438-443.
78. Pinheiro B.A., Gilbert H.J., Sakka K., Sakka K., Fernandes V.O., Prates J.A., Alves V.D., Bolam D.N., Ferreira L.M., Fontes C.M. Functional insights into

- the role of novel type I cohesin and dockerin domains from *Clostridium thermocellum*// *J. Biochem.* 2009. 424(3). P. 375–384.
79. Mohand-Oussaid O., Payot S., Guedon E., Gelhaye E., Youyou A., Petitdemange H. The extracellular xylan degradative system in *Clostridium cellulolyticum* cultivated on xylan: evidence for cell-free cellulosome production// *J. Bacteriol.* 1999. 181(13). P. 4035–4040.
80. Watanabe, H., Noda, H., Tokuda, G., & Lo, N. (1998). A cellulase gene of termite origin. *Nature*, 394(6691), 330-331.
81. Ke J., Laskar D.D, Gao D., Chen S. Advanced biorefinery in lower termite-effect of combined pretreatment during the chewing process// *Biotechnol Biofuels.* 2012. 5. doi: 10.1186/1754-6834-5-11.
82. Inoue H., Yano S., Endo T., Sakaki T., Sawayama S. Combining hot-compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus// *Biotechnol Biofuels.* 2008. 1(1). 10.1186/1754-6834-1-2.
83. Taherzadeh M.J., Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review// *Int. J. Mol. Sci.* 2008. 9. P. 1621–1651.
84. Yoshida M, Liu Y, Uchida S, Kawarada K, Ukagami Y, Ichinose H, Kaneko S, Fukuda K. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides// *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008. 72(3). P. 805–810.
85. Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review// *Bioresour. Technol.* 2010. 101. P. 4851–4861.
86. Dadi, A. P., Varanasi, S., & Schall, C. A. (2006). Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(5), 904-910.
87. Park, J. I., Steen, E. J., Burd, H., Evans, S. S., Redding-Johnson, A. M., Batth, T., ... & Gladden, J. M. (2012). A thermophilic ionic liquid-tolerant cellulase cocktail for the production of cellulosic biofuels. *PLoS One*, 7(5), e37010.

88. Kamiya, N., Matsushita, Y., Hanaki, M., Nakashima, K., Narita, M., Goto, M., & Takahashi, H. (2008). Enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media. *Biotechnology letters*, 30(6), 1037-1040.
89. Simmons, C. W., Reddy, A. P., VanderGheynst, J. S., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2014). *Bacillus coagulans* tolerance to 1-ethyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids in aqueous and solid-state thermophilic culture. *Biotechnology progress*, 30(2), 311-316
90. Xu, J., Wang, X., Hu, L., Xia, J., Wu, Z., Xu, N., ... & Wu, B. (2015). A novel ionic liquid-tolerant *Fusarium oxysporum* BN secreting ionic liquid-stable cellulase: Consolidated bioprocessing of pretreated lignocellulose containing residual ionic liquid. *Bioresource technology*, 181, 18-25.
91. Barr, C. J., Mertens, J. A., & Schall, C. A. (2012). Critical cellulase and hemicellulase activities for hydrolysis of ionic liquid pretreated biomass. *Bioresource technology*, 104, 480-485.
92. Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541-555.
93. Wang, Y., & Qian, P. Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies.].
94. Schmieder R, Edwards R: Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011, 27:863-864.
95. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 2010, 7:335-336.

96. Edgar RC: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010, 26:2460-2461.
97. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R: UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011, 27:2194-2200
98. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL: Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology* 2006, 72:5069-5072.
99. Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
100. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
101. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477.
102. Chevreur, B., Pfisterer, T., Drescher, B., Driesel, A. J., Müller, W. E., Wetter, T., & Suhai, S. (2004). Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome research*, 14(6), 1147-1159.
103. Geu-Flores, F., Nour-Eldin, H. H., Nielsen, M. T., & Halkier, B. A. (2007). USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic acids research*, 35(7), e55.
104. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning* (Vol. 2, pp. 14-9). New York: Cold spring harbor laboratory press.
105. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

106. Заварзин, Г. А. (2003). Эволюция геосферно-биосферной системы. *Природа*, 1, 27-35.
107. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G. O., Azevedo, V., ... & Borriss, R. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256.
108. Mardanov, A. V., Gumerov, V. M., Beletsky, A. V., Prokofeva, M. I., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Ravin, N. V., & Skryabin, K. G. (2011). Complete genome sequence of the thermoacidophilic crenarchaeon *Thermoproteus uzoniensis* 768-20. *Journal of bacteriology*, 193(12), 3156-3157
109. Itoh, T., Suzuki, K. I., & Nakase, T. (2002). *Vulcanisaeta distributa* gen. nov., sp. nov., and *Vulcanisaeta souniana* sp. nov., novel hyperthermophilic, rod-shaped crenarchaeotes isolated from hot springs in Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(4), 1097-1104.
110. Kimura, H., Mori, K., Tashiro, T., Kato, K., Yamanaka, T., Ishibashi, J. I., & Hanada, S. (2010). Culture-independent estimation of optimal and maximum growth temperatures of archaea in subsurface habitats based on the G+ C content in 16S rRNA gene sequences. *Geomicrobiology Journal*, 27(2), 114-122.
111. Mirete, S., de Figueras, C. G., & González-Pastor, J. E. (2011). Diversity of Archaea in Icelandic hot springs based on 16S rRNA and chaperonin genes. *FEMS microbiology ecology*, 77(1), 165-175.
112. Nakamori, H., Yatabe, T., Yoon, K. S., & Ogo, S. (2014). Purification and characterization of an oxygen-evolving photosystem II from *Leptolyngbya* sp. strain O-77. *Journal of bioscience and bioengineering*, 118(2), 119-124.
113. Coman, C., Drugă, B., Hegedus, A., Sicora, C., & Dragoș, N. (2013). Archaeal and bacterial diversity in two hot spring microbial mats from a geothermal region in Romania. *Extremophiles*, 17(3), 523-534.
114. Urbietta, M. S., González-Toril, E., Bazán, Á. A., Giaveno, M. A., & Donati, E. (2015). Comparison of the microbial communities of hot springs waters and the microbial biofilms in the acidic geothermal area of Copahue (Neuquén, Argentina). *Extremophiles*, 19(2), 437-450.

115. Lau, E., Nash, C. Z., Vogler, D. R., & Cullings, K. W. (2005). Molecular diversity of cyanobacteria inhabiting coniform structures and surrounding mat in a Yellowstone hot spring. *Astrobiology*, 5(1), 83-92.
116. McGregor, G. B., & Rasmussen, J. P. (2008). Cyanobacterial composition of microbial mats from an Australian thermal spring: a polyphasic evaluation. *FEMS microbiology ecology*, 63(1), 23-35.
117. Roeselers, G., Norris, T. B., Castenholz, R. W., Rysgaard, S., Glud, R. N., Kühl, M., & Muyzer, G. (2007). Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). *Environmental Microbiology*, 9(1), 26-38.
118. Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., & Kamagata, Y. (2006). *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum Chloroflexi. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(6), 1331-1340.
119. Bryant, D. A., Liu, Z., Li, T., Zhao, F., Costas, A. M. G., Klatt, C. G., ... & Overmann, J. (2012). Comparative and functional genomics of anoxygenic green bacteria from the taxa Chlorobi, Chloroflexi, and Acidobacteria. In *Functional genomics and evolution of photosynthetic systems* (pp. 47-102). Springer Netherlands.
120. Pierson, B. K., & Castenholz, R. W. (1974). A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Archives of Microbiology*, 100(1), 5-24.
121. Tang, K. H., Barry, K., Chertkov, O., Dalin, E., Han, C. S., Hauser, L. J., ... & Larimer, F. W. (2011). Complete genome sequence of the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *BMC genomics*, 12(1), 1.



122. Collins, A. M., Xin, Y., & Blankenship, R. E. (2009). Pigment organization in the photosynthetic apparatus of *Roseiflexus castenholzii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(8), 1050-1056.
123. Frigaard, N. U., Chew, A. G. M., Li, H., Maresca, J. A., & Bryant, D. A. (2003). *Chlorobium tepidum*: insights into the structure, physiology, and metabolism of a green sulfur bacterium derived from the complete genome sequence. *photosynthesis research*, 78(2), 93-117.
124. Everroad RC, Otaki H, Matsuura K et al. Diversification of bacterial community composition along a temperature gradient at a thermal spring. *Microbes Environ* 2012;27: 374-81.;
125. Boomer SM, Noll KL, Geesey GG et al. Formation of multilayered photosynthetic biofilms in an alkaline thermal spring in Yellowstone National Park, Wyoming. *Appl Environ Microbiol* 2009;75: 2464-75
126. Akimov, V. N., Podosokorskaya, O. A., Shlyapnikov, M. G., & Gal'chenko, V. F. (2013). Dominant phylotypes in the 16S rRNA gene clone libraries from bacterial mats of the uzon caldera (Kamchatka, Russia) hydrothermal springs. *Microbiology*, 82(6), 721-727.
127. Lau, M. C., Aitchison, J. C., & Pointing, S. B. (2009). Bacterial community composition in thermophilic microbial mats from five hot springs in central Tibet. *Extremophiles*, 13(1), 139-149.
128. Engel, A. S., Johnson, L. R., & Porter, M. L. (2013). Arsenite oxidase gene diversity among Chloroflexi and Proteobacteria from El Tatio Geyser Field, Chile. *FEMS microbiology ecology*, 83(3), 745-756.
129. Jiménez, D. J., Andreote, F. D., Chaves, D., Montaña, J. S., Osorio-Forero, C., Junca, H., ... & Baena, S. (2012). Structural and functional insights from the metagenome of an acidic hot spring microbial planktonic community in the Colombian Andes. *PloS one*, 7(12), e52069.
130. Bernd Wemheuer, Robert Taube, Pinar Akyol, Franziska Wemheuer, and Rolf Daniel (2013). Microbial diversity and biochemical potential encoded by

- thermal spring metagenomes derived from the Kamchatka Peninsula. *Archaea*, 2013.
131. Chan, C. S., Chan, K. G., Tay, Y. L., Chua, Y. H., & Goh, K. M. (2015). Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. *Frontiers in microbiology*, 6.
132. Meyer-Dombard, D. R., Shock, E. L., & Amend, J. P. (2005). Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA. *Geobiology*, 3(3), 211-227.
133. Song, Z., Zhi, X., Li, W., Jiang, H., Zhang, C., & Dong, H. (2009). Actinobacterial diversity in hot springs in Tengchong (China), Kamchatka (Russia), and Nevada (USA). *Geomicrobiology Journal*, 26(4), 256-263.
134. Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K., & Eurwilaichitr, L. (2004). Diversity and abundance of Bacteria and Archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand. *Journal of basic microbiology*, 44(6), 430-444.
135. Iino, T., Mori, K., Uchino, Y., Nakagawa, T., Harayama, S., & Suzuki, K. I. (2010). *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of *Ignavibacteria* classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(6), 1376-1382.
136. Daniel, R. (2004). The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products. *Current opinion in biotechnology*, 15(3), 199-204.
137. Holmfeldt, K., Dziallas, C., Titelman, J., Pohlmann, K., Grossart, H. P., & Riemann, L. (2009). Diversity and abundance of freshwater Actinobacteria along environmental gradients in the brackish northern Baltic Sea. *Environmental microbiology*, 11(8), 2042-2054.
138. Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., ... & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*, 312(5778), 1355-1359.

139. Trujillo, M. E., & Goodfellow, M. (2003). Numerical phenetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84(1), 39-68.
140. Cheng, W., Da, D., HaoShu, W., Müller, K., Yong, Q., HaiLong, W., & WeiXiang, W. (2016). Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. *Biotechnology for Biofuels*, 9(22).
141. Lewis, K., Epstein, S., D'Onofrio, A., & Ling, L. L. (2010). Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *The Journal of antibiotics*, 63(8), 468-476.
142. Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., ... & Richardson, P. (2007). Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *Journal of bacteriology*, 189(6), 2477-2486.
143. Valverde, A., Tuffin, M., & Cowan, D. A. (2012). Biogeography of bacterial communities in hot springs: a focus on the actinobacteria. *Extremophiles*, 16(4), 669-679.
144. Shivlata, L., & Satyanarayana, T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Frontiers in microbiology*, 6.
145. Lamed, R., & Bayer, E. A. (1988). The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Advances in applied microbiology (USA)*.
146. Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L., & Pace, N. R. (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of bacteriology*, 180(2), 366-376.
147. Gregersen, L. H., Bryant, D. A., & Frigaard, N. U. (2011). Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria. *Front Microbiol*, 2(116), 1-14.
148. Лазарева, Е. В., Жмодик, С. М., Петрова, И. В., Колмогоров, Ю. П., Федорин, М. А., Брянская, А. В., & Таран, О. П. (2012). Исследование распределения элементов между цианобактериальным сообществом и

карбонатной постройкой термального источника методом РФА СИ. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, (5), 77-85.

149. Mori K, Yamaguchi K, Sakiyama Y, Urabe T, Suzuki K: *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldisericaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009, 59:2894-2898.
150. Saiki T, Kobayashi Y, Kawagoe K, Beppu T: *Dictyoglomus thermophilum* gen. nov., sp. nov., a Chemoorganotrophic, Anaerobic, Thermophilic Bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 1985, 35:253-259.
151. Svetlichny VA, Svetlichnya TP: *Dictyoglomus turgidus*, sp. nov., a new extreme thermophilic eubacterium isolated from hot springs in the Uzon Volcano crater. *Mikrobiologiya* 1988, 57:435-441.
152. Garrity, G. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. D. R. Boone, & R. W. Castenholz (Eds.). Springer Science & Business Media.
153. Spear JR, Walker JJ, McCollom TM, Pace NR: Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:2555-2560.
154. O'Neill AH, Liu Y, Ferrera I, Beveridge TJ, Reysenbach AL: *Sulfurihydrogenibium rodmanii* sp. nov., a Sulfur Oxidizing Chemolithoautotroph from the Uzon Caldera, Kamchatka Peninsula, Russia, and Emended Description of the Genus *Sulfurihydrogenibium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, 58:1147-1152.
155. Nakagawa S, Shtaih Z, Banta A, Beveridge TJ, Sako Y, Reysenbach AL: *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively heterotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from Yellowstone National Park, and emended descriptions of the genus *Sulfurihydrogenibium*,

- Sulfurihydrogenibium subterraneum and Sulfurihydrogenibium azorense. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, 55:2263-2268.
156. Nunoura T, Oida H, Miyazaki M, Suzuki Y: *Thermosulfidibacter takaii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, 58:659-665.
157. Miroshnichenko ML, Rainey FA, Hippe H, Chernyh NA, Kostrikina NA, Bonch-Osmolovskaya EA: *Desulfurella kamchatkensis* sp. nov. and *Desulfurella propionica* sp. nov., new sulfur-respiring thermophilic bacteria from Kamchatka thermal environments. *Int J Syst Bacteriol* 1998, 48:475-479.
158. Qiu YL, Hanada S, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y, Sekiguchi Y: *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:2051-2058.
159. Sonne-Hansen J, Ahring BK: *Thermodesulfobacterium hveragerdense* sp. nov., and *Thermodesulfovibrio islandicus* sp. nov., two thermophilic sulfate reducing bacteria isolated from a Icelandic hot spring. *Syst Appl Microbiol* 1999, 22:559-564.
160. Patel BKC, Morgan HW, Daniel RM: *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new hemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. *Arch Microbiol* 1985, 141:63-69.
161. Andrews KT, Patel BK: *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from nonvolcanically heated geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. *Int J Syst Bacteriol* 1996, 46:265-269
162. Miroshnichenko ML, Lebedinsky AV, Chernyh NA, Tourova TP, Kolganova TV, Spring S, Bonch-Osmolovskaya EA: *Caldimicrobium rimae* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively lithoautotrophic, anaerobic

- bacterium from the Uzon Caldera, Kamchatka. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009, 59:1040-1044.
163. Albuquerque L, Franca L, Rainey FA, Schumann P, Nobre MF Costa MS: *Gaiella occulta* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class Actinobacteria and proposal of Gaiellaceae fam. nov. and Gaiellales ord. nov. *Syst Appl Microbiol* 2011, 34:595-599.
164. He YL, Ding YF, Long YQ: Two cellulolytic *Clostridium* species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1991, 41:306-309.
165. Weller R, Bateson MM, Heimbuch BK, Kopczynski ED, Ward DM: Uncultivated cyanobacteria, Chloroflexus-like inhabitants, and spirochete-like inhabitants of a hot spring microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 1992, 58:3964-3969.
166. Daumas S, Cord-Ruwisch R, Garcia JL: *Desulfotomaculum geothermicum* sp. nov., a thermophilic, fatty acid-degrading, sulfate-reducing bacterium isolated with H<sub>2</sub> from geothermal ground water. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1992, 54:165-178.
167. Burgess EA, Unrine JM, Mills GL, Romanek CS, Wiegel J: Comparative geochemical and microbiological characterization of two thermal pools in the Uzon Caldera, Kamchatka, Russia. *Microb Ecol* 2012, 63:471-489.
168. Meyer-Dombard DR, Swingley W, Raymond J, Havig J, Shock EL, Summons RE: Hydrothermal ecotones and streamer biofilm communities in the Lower Geyser Basin, Yellowstone National Park. *Environ Microbiol* 2011, 13:2216-2231.
169. Iino T, Nakagawa T, Mori K, Harayama S, Suzuki K: *Calditerrivibrio nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, 58:1675-1679.
170. Grégoire P, Fardeau ML, Joseph M, Guasco S, Hamaide F, Biasutti S, Michotey V, Bonin P, Ollivier B. Isolation and characterization of

- Thermanaerotherix daxensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium pertaining to the phylum "Chloroflexi", isolated from a deep hot aquifer in the Aquitaine Basin. *Syst Appl Microbiol.* 2011 Nov;34(7):494-7. Epub 2011 May 31.
171. Auchtung TA, Shyndriayeva G, Cavanaugh CM: 16S rRNA phylogenetic analysis and quantification of Korarchaeota indigenous to the hot springs of Kamchatka, Russia. *Extremophiles* 2011, 15:105-116.
172. Tomova I, Dimitrova D, Stoilova-Disheva M, Lyutskanova D, Kambourova M: Archaeal diversity at two hot springs, Rupi Basin, Bulgaria. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2011, 25:105-113.
173. Huang Q, Dong CZ, Dong RM, Jiang H, Wang S, Wang G, Fang B, Ding X, Niu L, Li X, Zhang C, Dong H: Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China. *Extremophiles* 2011, 15:549-563.
174. Pester M, Schleper C, Wagner M: The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr Opin Microbiol* 2011, 14:300-306.
175. Derekova, A., Mandeva, R., & Kambourova, M. (2008). Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1697-1702.
176. Tang, K., Utairungsee, T., Kanokratana, P., Sriprang, R., Champreda, V., Eurwilaichitr, L., & Tanapongpipat, S. (2006). Characterization of a novel cyclomaltodextrinase expressed from environmental DNA isolated from Bor Khleung hot spring in Thailand. *FEMS microbiology letters*, 260(1), 91-99.
177. Cihan, A. C., Ozcan, B., Tekin, N., & Cokmus, C. (2011). Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(11), 2683-2696.
178. Eminoğlu, A., Ülker, S., & Sandallı, C. (2015). Cloning, Purification and Characterization of Acetyl Xylane Esterase from *Anoxybacillus flavithermus* DSM 2641T with Activity on Low Molecular-Weight Acetates. *The protein journal*, 34(4), 237-242.

179. Bakir, Z. B., & Metin, K. (2015). Screening for industrially important enzymes from thermophilic bacteria; selection of lipase-producing microorganisms and optimization of culture conditions.
180. Soriano-Maldonado, P., Andújar-Sánchez, M., Clemente-Jiménez, J. M., Rodríguez-Vico, F., Las Heras-Vázquez, F. J., & Martínez-Rodríguez, S. (2015). Biochemical and Mutational Characterization of N-Succinyl-Amino Acid Racemase from *Geobacillus stearothermophilus* CECT49. *Molecular biotechnology*, 57(5), 454-465.
181. Mitra, S., Mukhopadhyay, B. C., Mandal, A. R., Arukha, A. P., Chakrabarty, K., Das, G. K., ... & Biswas, S. R. (2015). Cloning, overexpression, and characterization of a novel alkali-thermostable xylanase from *Geobacillus* sp. WBI. *Journal of basic microbiology*, 55(4), 527-537.
182. Singh, A., & Singh, V. P. (2012). Production of extracellular hydrolytic enzymes by an obligate thermophile—*Thermoactinomyces vulgaris*. *Vegetos: An International Journal of Plant Research*, 25(1), 138-145.
183. Shiloach J., Fass R. Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development. 2005. *Biotechnology Advances*. V. 23, P. 345 – 357.
184. Huang, Z., Liu, X., Zhang, S., & Liu, Z. (2014). GH52 xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*: characterization and introduction of xylanase activity by site-directed mutagenesis of Tyr509. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(1), 65-74.
185. Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Christopher, L. P., & Sani, R. K. (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource technology*, 101(22), 8798-8806.
186. Zaide, G., Shallom, D., Shulami, S., Zolotnitsky, G., Golan, G., Baasov, T., ... & Shoham, Y. (2001). Biochemical characterization and identification of



catalytic residues in  $\alpha$ -glucuronidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 3006-3016.

187. Jaeger, V. W., & Pfaendtner, J. (2013). Structure, dynamics, and activity of xylanase solvated in binary mixtures of ionic liquid and water. *ACS chemical biology*, 8(6), 1179-1186.
188. Gladden, J. M., Park, J. I., Bergmann, J., Reyes-Ortiz, V., D'haeseleer, P., Quirino, B. F., ... & Singer, S. W. (2014). Discovery and characterization of ionic liquid-tolerant thermophilic cellulases from a switchgrass-adapted microbial community. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 1.