

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ СО РАН

На правах рукописи



БУДАГАЕВА Валентина Григорьевна

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ
MEIOTHERMUS-THERMUS В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ
ЩЕЛОЧНЫХ ГИДРОТЕРМ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ**

03.02.08 – экология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Д.Д. Бархутова

Иркутск - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Характеристика азотных щелочных гидротерм.....	9
1.2. Микробные сообщества щелочных гидротерм.....	12
1.2.1. Органотрофные бактерии термальных источников.....	16
1.2.2. Распространение <i>Deinococcus–Thermus</i> в гидротермах, их функциональная роль.....	20
1.3. RuBisCO - ключевой фермент фиксации диоксида углерода.....	28
1.4. Углеводы микробных матов.....	31
1.5. Участие микробного сообщества в минералообразовании.....	33
1.6. Заключение к литературному обзору.....	39
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Объекты исследования.....	40
2.2. Методы исследования.....	43
2.2.1. Физико – химические методы.....	43
2.2.2. Методы учета численности и выделения чистых культур микроорганизмов.....	44
2.2.3. Методы изучения культуральных и физиолого-биохимических свойств бактерий.....	44
2.2.4. Электронно-микроскопические методы.....	45
2.2.5. Методы определения внеклеточной протеолитической активности.....	45
2.2.6. Рентгенофазовый анализ микробных матов.....	46
2.2.7. Методы определения углеводного состава.....	47
2.2.8. Методы молекулярно - генетического анализа.....	48
2.2.9. Методы статистической обработки данных.....	49

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Экологические условия среды обитания микробного сообщества гидротерм БРЗ.....	50
3.2. Филогенетическое разнообразие микробного сообщества термальных источников БРЗ.....	53
3.2.1. Распространение бактерий филума <i>Deinococcus-Thermus</i> в щелочных гидротермах БРЗ.....	66
3.3. Распространение органотрофных бактерий щелочных гидротерм БРЗ	67
3.4. Характеристика органотрофных бактерий, выделенных из термальных источников БРЗ	
3.4.1. Морфологическая характеристика культур.....	70
3.4.2. Генотипические свойства и филогенетическое положение культур	73
3.4.3. Экофизиология культур.....	75
3.4.4. Пигменты клеток.....	79
3.4.5. Определение ключевого фермента RuBisCO цикла Кальвина...	79
3.4.6. Исследование окислительной способности культур.....	81
3.4.7. Протеолитическая активность выделенных культур.....	82
3.5. Минералообразование в микробных матах гидротерм БРЗ.....	87
3.6. Исследование углеводного состава микробного сообщества гидротерм	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	97
ВЫВОДЫ.....	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	100
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	101
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Термальные источники представляют собой уникальные геотермальные местообитания, характеризующиеся высокой температурой и высокими значениями pH, которые создают благоприятные условия для развития термофильных и алкалофильных прокариот в водной толще и донных отложениях (Pace, 1997; Sand, 2003; Whitaker et al., 2003; Meyer-Dombard et al., 2005). Наземные горячие источники являются экстремальными экосистемами, и в связи с постоянством химического состава и температуры являются удобными модельными системами для изучения экологии обитающих в них прокариот (Sand, 2003; Coman et al., 2013; Vadhai et al., 2015). Отмечены существенные отличия в микробных сообществах горячих источников с различными диапазонами физико-химических параметров. Термофилы, населяющие высокотемпературные среды обитания, считаются ближайшими родственниками микроорганизмов, существовавших ранее на Земле (Brock, 1967; Woese et al., 1990; Stetter, 2006). Исследование микроорганизмов в термальных местообитаниях не только позволяет лучше понять происхождение и эволюцию ранней жизни, но также дает возможность применения многочисленных биоресурсов в промышленности и биотехнологии (Huber, Stetter, 1998; Andrade et al., 1999; Lewin et al., 2013; Lopez-Lopez et al., 2013 г.).

В процессах трансформации органического вещества в микробных сообществах термальных источников участвуют бактерии различных физиологических групп, связанные между собой тесными трофическими связями. Органотрофные термофильные бактерии играют важную роль в цикле углерода гидротермальных систем. Они участвуют в деструкции органического вещества, создаваемым продуцентами, и их метаболиты используются деструкторами терминального этапа (Namsaraev et al., 2010; Khan et al., 2017; Yang et al., 2018). Филум *Deinococcus-Thermus* является одним из самых широко распространенных в составе домена *Bacteria*. Группа включает термотолерантные виды, найденные в наземных и подземных горячих источниках, а также в горячих искусственных

средах обитания. Эти бактерии являются первичными декструкторами в микробном сообществе и проявляют высокую устойчивость к экстремальным условиям, таким как температура окружающей среды, ионизирующее и ультрафиолетовое излучения.

Микробное сообщество играет важную роль в биогеохимических процессах в наземных гидротермах, участвуя в создании геохимических барьеров. В результате деятельности различных функциональных групп микроорганизмов (цианобактерий, первичных и вторичных органо- и литотрофных гидролитиков) происходит резкое уменьшение интенсивности миграции ряда элементов и образование минералов (Phoenix et al., 2000; Franke, Bazyliniski, 2003; Tazaki, 2006; Лазарева и др., 2010).

Степень участия бактериальных сообществ в минералообразовании определяется физико-химическими параметрами экстремальных водных экосистем, характером биогеохимического взаимодействия микроорганизмов с водными растворами и содержащимися в них частицами горных пород, минералов.

Целью настоящей работы было изучить распространение бактерий группы *Meiothermus-Thermus*, их биологические особенности и экологическую значимость в гидротермах Байкальской рифтовой зоны (БРЗ).

В задачи исследования входило:

1. Оценить экологические условия формирования микробных сообществ щелочных гидротерм БРЗ.
2. Определить таксономическое разнообразие микробного сообщества гидротерм БРЗ методами высокопроизводительного секвенирования.
3. Оценить распространение аэробных органотрофных бактерий группы *Meiothermus-Thermus* в щелочных гидротермах.
4. Выделить, идентифицировать чистые культуры и изучить их экофизиологические свойства.
5. Оценить роль микробного сообщества гидротерм в синтезе полисахаридов и минералообразовании.

Научная новизна работы и значимость работы

Впервые с использованием молекулярно-генетических методов дана сравнительная характеристика филогенетического разнообразия микробных сообществ щелочных гидротерм БРЗ и определено широкое распространение бактерий группы *Meiothermus-Thermus* в исследуемых гидротермах.

Сравнительный анализ состава доминирующих таксонов выявил существенные различия микробного сообщества БРЗ и пространственную стратификацию сообщества в зависимости от физико-химических условий.

Из гидротерм БРЗ получены и описаны культуры термофильных алкалофильных органотрофных бактерий-деструкторов группы *Meiothermus-Thermus*, способных расти в широком диапазоне температур.

Впервые выделены бактерии рода *Thermus* из гидротерм БРЗ. В геноме гетеротрофных бактерий рода *Meiothermus* и *Thermus* выявлен функциональный ген *cbbL*, ответственный за синтез ключевого фермента цикла Кальвина (RubisCO) - индикатора способности к автотрофному росту.

Углеводы являются одним из составных компонентов органического вещества микроорганизмов и играют важную роль в функционировании микробного сообщества. Впервые из микробного мата гидротермы БРЗ выделен индивидуальный гетерополисахарид с высоким содержанием галактозы, глюкозы, маннозы и уроновых кислот, который обладает способностью к связыванию ионов Fe^{2+} и мембраностабилизирующим действием.

Микробное сообщество играет важную роль в биогеохимических процессах в исследуемых гидротермах. Показано, что в микробных матах щелочных гидротерм БРЗ идет процесс биоминералообразования кальцита и кремнезема.

Практическая значимость работы

Выделенные бактерии группы *Meiothermus-Thermus* могут быть использованы в качестве продуцентов термостабильных ферментов, в частности обладающих кератинолитической активностью. Полученные в работе данные могут быть

использованы для чтения курсов лекций по микробиологии и экологии в ВУЗах, в справочных изданиях и учебно-методических пособиях.

Основные защищаемые положения

1. Видовое разнообразие микробных сообществ, развивающихся в гидротермах Байкальской рифтовой зоны и активно участвующих в биогеохимических циклах углерода и в аккумуляции различных элементов, было выше в микробных матах и донных осадках по сравнению с водой источников. С понижением температуры гидротерм разнообразие микробного сообщества увеличивается.

2. Органотрофные бактерии группы *Meiothermus-Thermus* широко распространены в щелочных гидротермах, участвуют в деструкции органического вещества и имеют способность к автотрофной фиксации CO₂ через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены автором на Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов», Москва, 2014; IV Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Экологические проблемы Байкальского региона», Улан-Удэ, 2014; Международной научной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний», Улан-Удэ, 2013; Научно-практической конференции преподавателей, сотрудников и аспирантов, посвященной 90-летию Д.Ш. Фролова, Улан-Удэ, 2015; 11th International Congress on Extremophiles, Kyoto, Japan, 2016; 13th International Conference on Salt Lake Research ICSLR, Ulan-Ude, 2017.

Публикации. По теме диссертации, включая тезисы, опубликовано 15 работ, в том числе 4 работы в периодических изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

Личный вклад соискателя состоит в подготовке и проведении экспериментальных исследований на всех этапах работы, интерпретации полученных результатов, написании научных статей.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, обсуждения результатов, выводов, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа изложена на 129 страницах, включает 13 таблиц, 42 рисунка. Список литературы содержит 225 наименований, в т.ч. – 170 зарубежных авторов.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, к.б.н. Д. Д. Бархутовой за внимание, помощь при проведении работы, в интерпретации полученных результатов и подготовке диссертационной работы. Искреннюю признательность автор приносит профессору, д.б.н. В. М. Горленко, д.фарм.н. Д. Н. Оленникову за практическую помощь и ценнейшие советы. Также автор выражает благодарность за помощь в работе и поддержку всем сотрудникам и аспирантам лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН, лаборатории экологии и геохимической деятельности ФИЦ Биотехнологии РАН. Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке грантов Минобрнауки России (соглашение №6.1990.2014/К; соглашение N 14.575.21.0067), РФФИ №14-34-50171 мол_нр, №15-34-51168 мол_нр, №15-44-04335, №15-05-01275А. Ряд исследований проведен в рамках реализации работ по проекту "Биоремедиация и биоконверсия отходов с помощью комплекса фотосинтетических организмов и гетеротрофов в аэробных и анаэробных условиях с генерированием биоэнергии" (Соглашение № 14.583.21.0060 от 17 июля 2017 г.)

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика азотных щелочных гидротерм

Щелочные гидротермы, характеризующиеся высокими значениями температуры и pH, и занимающие экстремальные экологические ниши, широко представлены в природе (Panda et al., 2006; Намсараев, 2011; Hedlund et al., 2012; Bowen De León et al., 2013; Coman et al., 2013; Badhai et al., 2015; Tekere et al., 2015;). Среди них наиболее хорошо изучены гидротермы Национального парка Йелоустоун (Meyer-Dombard et al., 2005; Inskeep et al., 2013), Японии (Everroad et al., 2012), Исландии (Reigstad et al. 2010; Tobler, Benning, 2011), Малайзии (Chia Sing et al., 2015), Китая (Hou et al., 2013), Тибетского плато (Wang et al., 2013). Большинство наземных щелочных гидротерм относится к азотному типу гидротерм (Намсараев и др., 2006).

Азотные слабоминерализованные щелочные термы представляют собой одну из крупных групп минеральных вод, обладающих рядом характерных признаков и свойств и, прежде всего небольшой общей минерализацией.

Слабоминерализованные термальные воды Баргузинской котловины относятся к Байкальской области азотных терм. Они формируются в молодых тектонических разломах и выходят на поверхность или непосредственно из трещин в кристаллических образованиях, или из отложений, их перекрывающих. Для азотных терм характерно преобладание в газовом составе азота (до 85-95%), кроме которого в ощутимых количествах присутствует метан (до 32%), кислород (до 20%), сероводород и инертные газы. Весовое содержание сероводорода колеблется от 1-2 до 12-30 мг/дм³ (Барабанов, Дислер, 1968).

Для азотных терм характерна низкая минерализация, которая изменяется от 0,2 г/дм³ до 2,0 г/дм³. Почти все азотные термы относятся к щелочным с величиной pH до 10,3. Редкие исключения, когда pH понижается до 6,0-6,8, объясняются смешиванием термальных вод с грунтовыми или поверхностными (Трошин, 2005).

Характерной особенностью терм является преобладание в них щелочных металлов. Содержание натрия колеблется от 38,8 мг/дм³ до 476,7 мг/дм³ и составляет 63,2-97,8 % экв. Весовые количества кальция варьируют от 1,0 до 98,0 мг/дм³. Концентрации калия не поднимаются выше 10,5 мг/дм³, а магния – 7,8 мг/дм³.

Значительно разнообразнее в азотных термах представлены анионы. По анионному составу среди рассматриваемых вод выделяются сульфатные, гидрокарбонатно-сульфатные, сульфатно-гидрокарбонатные, гидрокарбонатные (Алекин, 1973). Такой различный анионный состав обусловлен вертикальной гидрогеохимической зональностью в подземной гидросфере, где с глубиной гидрокарбонатные воды сменяются сульфатными, затем хлоридными (Барабанов, Дислер, 1968). Содержание сульфат-иона в водах изменяется в широких пределах – от 23,0 до 895 мг/дм³ и, в общем, повышается с ростом минерализации вод. Концентрация гидрокарбонат-иона колеблется от 27,4 до 259,3 мг/дм³, достигая 60,8 % экв. В водах с высоким значением рН нередко присутствует карбонат-ион в количестве до 60,0 мг/дм³. Собственно гидрокарбонатные воды немногочисленны. В большинстве случаев термы имеют смешанный гидрокарбонатно-сульфатный или сульфатно-гидрокарбонатный состав и характеризуются широкими пределами колебаний абсолютного и процентного содержания сульфатов и гидрокарбонатов (Борисенко, 1978). Содержание хлора в гидротермах изменяется от 4,6 до 285 мг/дм³.

Азотные термы характеризуются высокой концентрацией фтора, содержание которого нередко превышает 10-15 мг/дм³ (Ломоносов, 1974). Наблюдается положительная корреляция ионов фтора с температурой и рН. Наиболее высокие содержания фтора характерны для гидрокарбонатных и сульфатно-гидрокарбонатных терм.

Одной из особенностей азотных терм является присутствие кремнекислоты, концентрация которой достигает (в пересчете на кремнезем) 120 мг/дм³. Она существует в форме диссоциированной и молекулярной ортокремниевой кислоты и молекул SiO₂, что определяется величиной рН, концентрацией кремнезема,

отношением содержания щелочного металла и кремния. Кремнекислота поступает за счет силикатов, в первую очередь полевых шпатов, растворение и гидролиз которых возрастает с повышением температуры вод (Намсараев и др., 2011).

Азотные термы характеризуются широким спектром микрокомпонентов. Для них характерны относительно высокие концентрации анионогенных элементов: селена, вольфрама, германия, молибдена, бора. В щелочных условиях катионогенные элементы (Li, Ba, Cu, Zn, Mn, Ni) образуют слаборастворимые соединения.

Среди элементов с переменной валентностью сера играет важнейшую роль как в определении геохимического облика гидротерм, так и в функционировании микробного сообщества источников. В щелочных условиях сера находится в виде гидросульфид иона (HS^-), который более устойчив к окислению, чем H_2S . Кроме того, гидросульфид менее токсичен для живых организмов. Что же касается генезиса сероводорода, то главным источником его являются биохимические процессы, приводящие, в частности, к разложению серосодержащих белковых тел и восстановлению сульфатов различными десульфидиризаторами (Горленко, Дубинина, 1977; Заварзин, 2003). Принятая точка зрения на происхождение сероводорода в термальных водах объясняет его небольшие содержания в термах, так как последние формируются в подавляющем большинстве случаев в изверженных и метаморфических породах, практически лишенных органического вещества и бактериальной жизни. Небольшое содержание сероводорода объясняется и тем, что последний, легко растворяясь в подземных водах, быстро уходит из газовой фазы и разлагается в приповерхностных условиях.

По мнению И.М. Борисенко и Л.В. Замана (1978) решающим фактором в формировании азотных терм является наличие глубинных разломов, где господствует восстановительная геохимическая обстановка, вследствие чего азотные термы являются щелочными и характеризуются низкими значениями окислительно-восстановительного потенциала (Eh). В очагах разгрузки происходит смешивание терм с грунтовыми или поверхностными водами и происходит изменение окислительно-восстановительных условий и pH смещается

в нейтральную или слабокислую сторону. Параллельно с изменением химического состава инфильтрационных вод преобразуется и их газовый состав - кислород расходуется на окислительные реакции, и воды становятся чисто азотными (Крайнов и др., 2012).

1.2 Микробные сообщества щелочных гидротерм

Исследованию термофильных алкалофильных микробных сообществ в последнее время уделяется большое внимание, что связано с выяснением их роли в высокотемпературных системах. Термофильные прокариоты известны как продуценты термостабильных ферментов с алакалофильными свойствами: протеазы, амилазы, хитиназы, ксиланазы, липазы, лактазы, представляющих интерес для многочисленных промышленных технологий (Wiegel, Kevbrin, 2004).

Изучение микробных сообществ горячих источников началось с выделения термофильных бактерий Маршем и Ларсеном (1953) с помощью культуральных методов. Исследования показали, что только 1-10% от общей численности сообщества удается культивировать в лабораторных условиях, большая часть относится к некультивируемым микроорганизмам.

В последующие нескольких десятилетий микробное разнообразие наземных горячих источников по всему миру было изучено с использованием библиотек клонов, на основе анализа гена 16S рРНК, в сочетании с классическими методами культивирования. Изучены состав и разнообразие микробных сообществ в наземных горячих источниках упомянутых выше различных геотермальных зон (Nakagawa, Fukui, 2002; Meyer-Dombard et al., 2005; Lau et al., 2006; Purcell et al., 2007; Gumerov et al., 2011; Tobler, Benning, 2011). В щелочных термальных источниках с температурой 75 °С и выше, как правило, присутствуют термофильные или гипертермофильные бактерии филумов *Aquificae*, *Deinococcus-Thermus*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermotogae* и некоторые термофильные виды филумов *Proteobacteria* и *Firmicutes*. При температуре ниже 75 °С развиваются умеренно термофильные и мезофильные бактерии *Cyanobacteria*, *Chloroflexi* и

Proteobacteria. Помимо бактерий, в геотермальных системах также часто обнаруживаются археи филумов *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* и *Thaumarchaeota*.

В последнее десятилетие применение метагеномных подходов в сочетании с высокопроизводительным секвенированием ДНК оказалось многообещающим инструментом для изучения разнообразия сообщества, состава функциональных генов, а также экологической роли микроорганизмов, живущих в геотермальных средах (Swingley et al., 2012; Inskeep et al., 2013; Hou et al., 2013; Wang et al., 2013). Для выяснения экологической роли и функционирования микроорганизмов, исследователи пытались установить связь между составом/разнообразием микробного сообщества и физико-химическими условиями, такими как температура, pH и химический состав воды (Everroad et al., 2012; Purcell et al., 2007). Было показано, что видовое разнообразие и активность микробного сообщества во многом определяются температурой, а также другими абиотическими факторами, включая pH и концентрацию серы (растворенного сероводорода) (Ward, Castenholz, 2000; Purcell et al., 2007; López-López et al., 2013). Из этих условий окружающей среды большое внимание уделяется влиянию температуры на структуру сообщества. Изучение Японских горячих источников в температурном градиенте (Nakagawa, Fukui, 2002) показало, что в микробных сообществах источников с температурой выше 66 °C преобладали *Aquificae*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermus* и *Crenarchaeota*, а в микробных матах с более низкой температурой (<60 °C) доминировали представители *Synechococcus*, *Chloroflexaceae*, *Rhodothermus* и *Armatimonadetes* (OP10). Более позднее исследование (Everroad et al., 2012) обнаружило, что *Sulfurihydrogenibium* филума *Aquificae* был доминирующим в микробных матах с температурой 75–67 °C, тогда как анаэробные фототрофные бактерии *Chloroflexus* был основными представителями при более низких температурах (66–60 °C). Оксигенные фототрофы *Thermosynechococcus* / *Synechococcus* доминировали при температуре ниже 60–58 °C. В целом, ряд исследователей считают, что микробное разнообразие источников обратно пропорционально коррелировало с

температурой, и температура была ключевым фактором микробного разнообразия в горячих источниках (Purcell et al., 2007; Tobler, Benning, 2011).

В природе микроорганизмы часто образуют сообщества, прикрепляясь к какой-либо поверхности с образованием сложных экологических сообществ в различных средах обитания по всему миру (Davey, O'Toole, 2000; Neelakanta, Sultana, 2013). Особенностью таких сообществ является формирование микробных матов (Намсараев и др., 2011), которые являются одними из наиболее хорошо изученных микробных сообществ (Seckbach, Oren, 2010). Их ламеллярное строение обусловлено вертикальным разделением отдельных сообществ бактерий и диатомовых водорослей, которые «выстраиваются» в соответствие с градиентом, как по интенсивности света, так и по окислительно-восстановительному потенциалу (Armitage et al., 2012). Физико-химический градиент является одним из главных факторов биологического разнообразия в микробных матах, на который в значительной степени влияют биологические процессы (биотические факторы) населяющих микроорганизмов (Volhuis et al., 2014). Недавние исследования показали, что такие факторы как биогеография (Whitaker et al., 2003) и геологические процессы (Takacs-Vesbach et al., 2008) также могут быть важны при оценке биоразнообразия. Микробные маты функционируют как консорциум, где биохимические процессы и биогеохимические циклы связаны между собой (Paerl et al., 2000), и это тесное взаимодействие позволяет продуктам метаболизма одной группы быть доступными для других микроорганизмов. В верхнем слое мата, как правило, часто преобладают кислородные цианобактерии и эукариотические водоросли, которые придают микробным матам зеленый оттенок из-за содержания в них хлорофилла. Под слоем цианобактерий, где свет становится более рассеянным, преобладают анаэробные фотосинтетические бактерии (АФБ) (как правило, они представлены зелеными нитчатными (несерными) бактериями филума *Chloroflexi*), зелеными серными бактериями (*Chlorobi*) и пурпурными бактериями), аэробные гетеротрофные и анаэробные сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), сероокисляющие бактерии и метаногенные археи (Klatt et al., 2016).

В микробных матах фотосинтетические организмы играют важную роль в метаболической динамике сообщества (Boomer et al., 2009). Фотосинтез в термальных водах имеет два основных препятствия, высокие температуры, которые уменьшают растворенные газы, такие как O_2 и CO_2 , и денатурация белков и других биомолекул из-за высоких температур; поэтому температурный предел роста фотосинтетических бактерий $75\text{ }^\circ\text{C}$ - температура, при которой хлорофилл разрушается (Rothschild, Mancinelli, 2001). Наиболее высокопродуктивными являются цианобактерии, они играют две ключевые роли в сообществе: фиксация углерода и азота. Считается, что цианобактерии в термальных источниках повышают продуктивность и доступность кислорода и внеклеточных органических соединений, которые способствуют ассоциации различных гетеротрофов (Everroad et al., 2012).

Изучение видового разнообразия цианобактерий в щелочных гидротермах Байкальской рифтовой зоны выявило, что доминирующим структурным компонентом матов являются нитчатые формы, которые обуславливают плотную слоистую структуру (Намсараев и др., 2003). В исследованных матах при температуре $50\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$ преобладают представители рода *Phormidium* sp. и термофильная нитчатая АФБ *Cfl.aurantiacus*, при $50\text{-}45\text{ }^\circ\text{C}$ доминируют нитчатые цианобактерии *Oscillatoria* sp. и *Phormidium* sp., в меньшем количестве представлены одноклеточные цианобактерии *Synechococcus* sp. и *Gloeocapsa* sp. Также встречались и другие цианобактерии родов *Oscillatoria*, *Mastigocladus*, *Anabaena* (Брянская и др., 2006; Калашникова, 2006). При температуре $25\text{-}35\text{ }^\circ\text{C}$ при смешении термальных вод и вод озера Байкал развиваются серные обрастания *Thiotrix* sp. Одноклеточные цианобактерии, особенно *Synechococcus*, преобладают в источниках, где температура воды превышает $55\text{ }^\circ\text{C}$ (Ward et al., 1998). Азотфиксация осуществляется в основном за счет одноклеточных и нитевидных цианобактерий (порядок Nostocales, Stigonematales). Анаэробные фототрофы располагаются под цианобактериями и приспособлены к использованию водорода и сероводорода. Геохимическая роль аноксигенных

фототрофных бактерий (АФБ) заключается в окислении соединений серы в анаэробных условиях. Представители *Chloroflexi* являются основными компонентами фотосинтетических микробных матов и широко распространены в различных типах термальных источников (Bauld, Brock, 1973). Большое количество термофильных штаммов бактерий *Chloroflexus* spp. было выделено из термальных источников Камчатки и Бурятии (Красильникова и др., 1986). АФБ трофически связаны с сульфатредуцирующими бактериями, которые завершают цепь деструкции органического вещества в гидротермах. Синтезируемое фототрофными и хемолитотрофными микроорганизмами органическое вещество подвергается аэробной и анаэробной деструкции.

Формирование этих сложных сообществ управляется процессом экологической преемственности, в которой цианобактерии являются колонизирующими организмами и модификаторами микроокружения для дальнейшей колонизации более специализированными бактериями и с более высокими и конкретными экологическими требованиями (Boomer et al., 2009; Klatt et al., 2011). Кроме того, микробный мат - динамическое сообщество, в котором микроорганизмы способны к мобильности (подвижности) меняя, таким образом, свое положение в мате в поисках благоприятных условий окружающей среды, таких как освещенность и окислительно-восстановительный потенциал (Paerl et al., 2000).

1.2.1 Органотрофные бактерии термальных источников

Органотрофные бактерии представляют собой микроорганизмы, использующие в качестве источника энергии и углерода органические соединения. В деструкции органического вещества минеральных источников принимают участие аэробные и анаэробные микроорганизмы разнообразных физиологических групп: сапрофиты, гидролитические бактерии (протеолитики, липолитики, амилолитики, целлюлолитики, сахаролитики) (Заварзин, Колотилова, 2001; Заварзин, 2003). Продуктами гидролиза являются низкомолекулярные вещества – моносахара, пептиды, аминокислоты, нуклеотиды, жирные кислоты. В

процесс анаэробной деструкции органического вещества вовлечены бродильщики, использующие растворимые соединения; диссипотрофные бродильщики, которые утилизируют олигомеры; вторичные анаэробы, утилизирующие продукты брожения (Заварзин, 1993). Тесные трофические взаимоотношения между различными группами микроорганизмов позволяют им эффективно участвовать в трансформации органических и неорганических веществ подземных вод, что обусловлено их огромным биохимическим потенциалом и большой численностью (Заварзин, 2003). Многие виды данных микроорганизмов утилизируют аминокислоты, белки, сахара, спирты и органические кислоты. Однако существуют специализированные гетеротрофные бактерии, способные разлагать также целлюлозу, лигнин, хитин, кератин, углеводороды, фенол и др. вещества (Кевбрин и др., 1999; Кевбрин, 2007; Кубланов, Подосокорская, 2011). Наиболее доступными источниками углерода для большинства гетеротрофных микроорганизмов являются сахара, глицерин, маннит, молочная, винная и лимонная кислоты.

Широкое распространение органотрофных бактерий разных физиологических групп отмечено в термальных источниках Камчатки (Zhao et al., 2006; Kozina et al., 2010; Bryanskaya et al., 2015), Национального парка Йелоустоун (Bowen de Leon et al., 2013), Китая (Ming et al., 2014; Khan et al., 2017; Yang et al., 2018), Тибета (Khan et al., 2017), Японии (Tanaka et al., 2006). Из источников Камчатки выделены органотрофные алкалитолерантные бактерии семейства *Bacillaceae Thermalkalibacillus uzonensis* (Zhao et al., 2006) и *Geobacillus icigianus* (Bryanskaya et al., 2015). Термофильные бактерии рода *Thermus* были выделены из горячих источников Исландии, Португалии, Азорских островов (Williams et al., 1996; Chung et al., 2000), Китая (Zhang et al., 2010; Ming et al., 2014) и др. Представители рода *Thermus* и производимые ими термостабильные ферменты (экстремозимы) привлекают внимание благодаря своим уникальным свойствам и возможностью применения в промышленности и молекулярной биологии. *Thermus aquaticus* был выделен в 1969 г. из термальных источников Национального парка Йелоустоун (Brock, Freeze, 1969). ДНК-полимераза,

полученная из *T. aquaticus* применяется в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из горячих источников Индии (северо-восточные Гималаи) выделено 8 термофильных штаммов рода *Bacillus* и *Geobacillus*, обладающих целлюлолитической активностью (Priya et al., 2016).

В гидротермах Прибайкалья и Монголии изучено разнообразие органотрофных бактерий (Намсараев и др., 2003; Nazina et al., 2004, Бабасанова, 2007; Lavrentyeva et al., 2018). В щелочных гидротермах Байкальского региона широко распространены и принимают активное участие в деструкции органического вещества алкало-термофильные протеолитики, амилолитики, целлюлолитики, сапрофиты и сульфатредукторы (Зайцева, 2004). В основном они отнесены к представителям грамположительных *Bacillaceae*, а именно *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus dendritiformis* (Раднагуруева, 2016), *Bacillus hemicellulosolyticum*, *Anoxybacillus pushchinoensis* (Бабасанова, 2007), *Anoxybacillus mongoliensis* (Намсараев и др., 2010), *Geobacillus gargiensis* (Nazina et al., 2004). Впервые из горячих источников БРЗ Алла и Гусиха была выделена и описана новая алкалотолерантная аэробная органотрофная бактерия *Thermus ruber* (Loginova, 1984). В отличие от описанных ранее видов этого рода, *T. ruber* имел оптимум роста при 60-65 °С, т.е. являлся умеренным термофилом. Впоследствии он был перенесен в новый род семейства *Thermaceae* – *Meiothermus* (Nobre, 1996). Известно, что бактерии рода *Thermus* являются одними из самых распространенных аэробных гетеротрофов в природных и искусственных термальных средах (Stramer, Starzyk, 1981; Marteinsson et al, 1995). Представители рода *Meiothermus* встречаются, как правило, в бедных питательными веществами средах обитания. Они широко распространены в горячих природных или искусственных средах обитания, таких как бытовые и промышленные системы горячей воды или ферментеры, работающие при высоких температурах (Chen, 2002; Chung, 1997).

В горячих источниках Прибайкалья были обнаружены термофильные анаэробные бактерии, использующие полисахариды, с максимальными численностями свыше 100 тысяч кл/мл, численности амилолитических и

целлюлозоразлагающих бактерий не превышали 10 тысяч кл/мл. В небольшом количестве обнаружены аэробные целлюлозоразлагающие бактерии, а анаэробные целлюлолитики отсутствовали (Бабасанова, 2004). Последующее сбраживание продуктов гидролиза аэробных бактерий завершается полным окислением продуктов брожения в терминальных процессах метаногенеза и сульфатредукции. Сульфидогенез и метаногенез находятся в конкурентной зависимости, преобладание того или другого процесса определяется содержанием сульфатов (Бонч-Осмоловская, 2011; Заварзин и др., 1999; Намсараев и др., 1999).

Микробиологические и геохимические аспекты проблемы восстановления сульфата и образования сероводорода и сульфидов в современных осадках природных вод обсуждаются во многих публикациях геологов, геохимиков, микробиологов (Горленко и др, 1999; Baumgartner et al., 2006; Rabus et al., 2006; Намсараев и др., 2007) . Большинство исследователей признает, что процесс микробиологической сульфатредукции является основным механизмом образования восстановленных серных соединений (Заварзин, 1993; Розанова, 1978; Замана, 2000). Способностью к восстановлению сульфатов до сероводорода обладают представители физиологической группы микроорганизмов, которые носят название десульфуризирующих, или сульфатредуцирующих, бактерий (Волкова, Ташинская, 1961). По своей химической сущности процесс микробной сульфатредукции – окислительно-восстановительный процесс, в котором сульфат используется в качестве конечного акцептора электронов при анаэробном окислении органических веществ или водорода. По своей физиологической сущности – это процесс, который обеспечивает бактериальную клетку необходимой энергией (Замана, 2000). Восстановленная сера выделяется в форме H_2S , а окисленный углерод – в виде CO_2 . Сульфатредукция протекает только там, где уголь, гумус, торф, битумы и другие органические вещества разлагаются в присутствии сульфатов без доступа свободного кислорода (Розанова, 1978). В илах соляных озер степей и пустынь есть сульфаты, остатки различных водорослей и мелких животных. Свободного кислорода в илах, как правило, не хватает, и в них развивается десульфуризация (Добрынин, 1988). Образующийся

сероводород восстанавливает гидроокислы трехвалентного железа, которые, хотя бы в малых количествах, присутствуют почти во всех горных породах. В результате образуется черный коллоидный минерал – гидротроилит, придающий илам черный цвет (Толстихин, 1975). Такие черные, соленые, пахнущие сероводородом илы характерны для многих соляных озер и солончаков. Они не привлекали бы большого внимания, если бы не замечательная способность вылечивать многие тяжелые заболевания. Под названием «лечебные грязи» они используются в медицине (Доронина, 1970; Ломоносов и др., 1977; Куликов и др., 1991).

Благодаря повсеместному распределению сульфатов в природе СРБ встречаются в различных экосистемах и являются широко распространенной группой микроорганизмов (Заварзин, 1993; Вайнштейн, 1996; Замана, 2000). Микробиологическое восстановление сульфатов с образованием пирита и других восстановленных соединений серы – важнейший биогеохимический процесс выведения серы из ее глобального круговорота (Заварзин, 2003; Вайнштейн, 1996).

На конечных этапах деструкции органического вещества в гидротермах БРЗ сульфатредукторы являются основными деструкторами органического вещества в микробных сообществах гидротерм, в том числе и в бессульфидных. Сульфатредуцирующие бактерии широко распространены в донных осадках и микробных матах гидротерм. Их максимальная численность достигает 10^8 кл/см³. Анализ микробного сообщества гидротермы Алла методом пиросеквенирования показал присутствие организмов, родственных *Thermodesulfovibrio* (Lavrentyeva, 2018).

1.2.2 Распространение *Deinococcus–Thermus* в гидротермах, их функциональная роль

Фила *Deinococcus-Thermus* представляет собой древнюю линию, которая содержит широко распространенные виды в составе домена *Bacteria*. Представители филы *Deinococcus-Thermus* являются аэробами и

хемоорганогетеротрофами, широко распространены в горячих источниках и термальных водах, а также искусственных средах обитания. Группа включает термотолерантные виды, которые имеют устойчивость к радиационному и ультрафиолетовому излучению.

Фила содержит один класс (*Deinococci*), который делится на порядки *Deinococcales* с семействами *Deinococcaceae* и *Trueperaceae*, и *Thermales* с семейством *Thermaceae* (таблица 1). *Deinococcaceae* включает два рода, *Deinobacterium* и *Deinococcus*; *Trueperaceae* содержит только один род, *Truepera*, а семейство *Thermaceae* включает в себя шесть родов: *Marinithermus*, *Meiothermus*, *Oceanithermus*, *Rhabdothermus*, *Thermus* и *Vulcanithermus*.

Таблица 1

Филогенетическая структура группы *Deinococcus–Thermus*

Класс	Порядок	Семейство	Род
<i>Deinococci</i>	<i>Deinococcales</i>	<i>Deinococcaceae</i>	<i>Deinococcus</i>
			<i>Deinobacterium</i>
		<i>Trueperaceae</i>	<i>Truepera</i>
	<i>Thermales</i>	<i>Thermaceae</i>	<i>Marinithermus</i>
			<i>Meiothermus</i>
			<i>Oceanithermus</i>
		<i>Rhabdothermus</i>	
		<i>Thermus</i>	
		<i>Vulcanithermus</i>	

Семейство *Deinococcaceae*

Семейство *Deinococcaceae* содержит 57 валидно описанных видов. Все являются хемоорганотрофными, проявляют аэробный метаболизм, хотя и известны факультативные анаэробы *Deinococcus gobiensis* и *Deinococcus carri* являются факультативными анаэробами (Yuan et al., 2009; Kim et al., 2015). Большинство видов мезофильные с оптимальным ростом между 25 °С и 37 °С,

отдельные виды *Deinococcus* растут в широком диапазоне температур от 2 до 50 °С. Исключения составляют *Deinococcus geothermalis* и *Deinococcus murrayi* (Ferreira et al., 1997) с температурным оптимумом от 45 до 50 °С, а также *Deinococcus alpinitundrae*, *Deinococcus altitudinis*, *Deinococcus claudionis*, *Deinococcus frigens*, *Deinococcus marmoris*, *Deinococcus radiomollis* и *Deinococcus saxicola* (Hirsch et al., 2004; Callegan et al., 2008), которые имеют оптимум ниже 20 °С. Все виды *Deinococcus* растут в диапазоне pH от 5,0 до 10,0. Оптимум pH 6,0 - 8,0. По морфологии 30 видов представлены кокками, 27 - палочками. Образуют пигментированные колонии розового, оранжевого и кирпично-красного цвета. Бактерии филума *Deinococcus-Thermus* известны своей стойкостью к экстремальным стрессам, таким как радиация, окисление, высушивание и высокая температура. Было показано, что 57 видов из филы *Deinococcus-Thermus* способны к синтезу каротиноидов (Tian, 2010). Каротиноиды – это природные пигменты от желтого до красно-оранжевого цвета, синтезируемые бактериями, водорослями и др. В качестве неферментативных антиоксидантов они могут быть вовлечены в механизм резистентности клеточных стенок к неблагоприятным факторам окружающей среды, в частности к воздействию активных форм кислорода, и выполняют роль дополнительных фотосинтезирующих пигментов. Особенностью представителей рода *Deinococcus* является их чрезвычайная устойчивость к ионизирующему и ультрафиолетовому излучению (Cox and Battista, 2005).

Бактерии семейства *Deinococcaceae* были обнаружены в местообитаниях, которые сильно различаются по экологии и географическому положению. Большая часть изолятов была получена из почвы, а также пресноводных и морских систем, сточных вод, комнатной пыли, снега, обработанного мяса и текстиля. *Deinococcus phoenicis* был обнаружен как часть микрофлоры, ассоциируемой с посадочным модулем НАСА для изучения Марса Phoenix во время его сборки (Vaishampayan et al., 2014), *Deinococcus metallilatus* выделен из автомобильной системы кондиционирования воздуха (Kim et al., 2015). Термофильные штаммы *D. geothermalis* и *D. murrayi* первоначально были

выделены из горячих источников (Ferreira et al., 1997). Позже, *D. geothermalis* обнаружены в составе биопленок в бумагоделательных машинах, где горячая вода является неотъемлемой частью переработки древесной массы (Kolari et al., 2001). *Deinococcus spp.* были изолированы из природных высушенных и холодных мест, включая пустыни Атакама, Гоби, Сахара и Сонора и Антарктиду. Показано, что способность выживать после высыхания объясняет, по-видимому, случайное распределение видов *Deinococcus*. После высыхания они становятся частью пыли этой среды и могут рассеиваться воздушными потоками, оседая практически где угодно (Murray, 1992; Battista and Rainey, 2001). Если организм находит благоприятную среду, он растет; если нет, то сохраняется до тех пор, пока не распространится дальше. Тот факт, что изолированные из воздуха на высоте, достигающей стратосферы, *Deinococcus aerius* и *Deinococcus aetherius*, может свидетельствовать о том, что высушенные виды *Deinococcus spp.* распространяются таким образом (Yang et al., 2009, 2010).

Семейство *Trueperaceae*

Изоляты рода *Truepera* были выделены из горячих источников Азорских островов (Albuquerque et al., 2005). Штаммы были представлены неподвижными сферическими клетками и отличались тем, что были термофильными, алкалофильными и умеренно галофильными. Как представители *Deinococcaceae*, они строго аэробные и хемоорганотрофные. Некоторые из выделенных штаммов имели красную окраску колоний. Штаммы имели оптимальную температуру роста около 50 °С, оптимум pH для роста 7,5- 9,5 и не росли при pH ниже 6,5 и выше 11,2. Хотя изоляты росли в сложных средах без добавления NaCl, они имели максимальную скорость роста в 1,0% NaCl и могли расти в средах, содержащих 6,0% NaCl. Кроме того, они были чрезвычайно устойчивы к ионизирующему излучению и ультрафиолетовому излучению. *Truepera radiovictrix* является единственным валидно описанным видом семейства *Trueperaceae*.

Семейство *Thermaceae*

В настоящее время *Thermaceae* включает 33 валидно описанных вида (Albuquerque, da Costa, 2014). Все штаммы образуют палочки. Клетки имеют ширину 0,5–0,9 мкм, но длина палочек варьируется. Некоторые бактерии родов *Oceanithermus*, *Rhabdothermus* и *Thermus* образуют так называемые «круглые тела», совокупность клеток, окруженных общей внешней оболочкой (Sako et al., 2003; Mori et al., 2004; Steinsbu et al., 2011). Оптимальная температура роста для типовых штаммов каждого рода в пределах семейства 60-70 °С, но существует значительная разница в температуре роста среди не типовых видов. Бактерии рода *Meiothermus* имеют самые низкие оптимумы температур 45-60 °С. Напротив, виды *Thermus* демонстрируют оптимум между 65 и 75 °С, при этом типовой штамм *T. thermophilus* растет при 80 °С. рН роста для видов этого семейства находится в диапазоне от 5,0 до 10,5, но большинство из них имеют оптимальный рост при рН 6,0-7,0. Большинство изолятов, за исключением *T. thermophilus*, лучше всего растут в отсутствие NaCl. Штаммы *T. thermophilus* являются галотолерантными, растущими при концентрации NaCl 6%. В отличие от представителей *Deinococcaceae* или *Trueperaceae*, члены *Thermaceae* не обладают стойкостью к ультрафиолетовому излучению или ионизирующей радиации.

Виды *Marinithermus*, *Meiothermus*, *Rhabdothermus* и *Thermus* являются хемоорганотрофными. *Meiothermus* и *Thermus spp.* используют сахара, аминокислоты и органические кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии; бактерии данных родов растут аэробно с дыхательным метаболизмом. Сложные органические субстраты, включая казаминокислоты, триптон и пептон, являются предпочтительными для оптимального роста *Rhabdothermus*. Штаммы *Meiothermus*, *Rhabdothermus* и *Thermus* также могут расти анаэробно с использованием нитрата в качестве альтернативного акцептора электронов. *Oceanithermus* и *Vulcanithermus spp.* являются микроаэрофильными; оптимальные концентрации O₂ составляют 2–6%. Эти виды используют широкий спектр углеводов и органических кислот. Некоторые представители *Oceanithermus* растут анаэробно с нитратом, нитритом или элементарной серой в

качестве акцептора электронов (Mori et al., 2004). *Oceanithermus* и *Vulcanithermus* spp. способны к хемолитогетеротрофному росту, потребляя молекулярный водород в качестве донора электронов (Miroshnichenko et al., 2003 b).

Представители семейства *Thermaceae* встречаются в нейтральных или слабощелочных и щелочных природных водных средах по всему миру, где температура колеблется от 50 до 85 °С. Все виды *Marinithermus*, *Oceanithermus*, *Rhabdothermus* и *Vulcanithermus* были выделены из глубоководных гидротермальных сообществ (Miroshnichenko et al., 2003a, b; Sako et al., 2003; Steinsbu et al., 2011) на подводной горе Японии (1400 м), Восточно-Тихоокеанского хребта (2600 м), местности Soria Moria под Норвежско-Гренландским морем (700 м) и подводном источнике Rainbow в Средино-Атлантическом хребте (2300 м), соответственно. Эти глубоководные виды растут при более высоких температурах (60–70 °С) и являются галотолерантными, оптимально растущими приблизительно при 3% NaCl. Штаммы *Thermus* и *Meiothermus* были изолированы из наземных и мелководных морских горячих источников США (Brock, Freeze, 1969), Исландии (Kristjanssen, Alfredsson, 1983), Нью-Мексико (Saul et al., 1993), подводных горячих источников Новой Зеландии, Японии (Saiki et al., 1972), России (Loginova et al., 1975), неглубоких морских горячих источников в Португалии (Manaia, da Costa, 1991) и из подземного водоносного горизонта Большого Артезианского бассейна Австралии (Denman et al., 1991).

Бактерии родов *Thermus* и *Meiothermus* содержат аэробные термофильные гетеротрофы, которые впервые были выделены из нейтральных и щелочных горячих источников Йеллоустонского национального парка (США) (Brock, Freeze, 1969) и Камчатки (Loginova et al., 1975), соответственно.

Морфологически они представлены неподвижными неспорообразующими палочковидными бактериями, одиночными или формирующие цепочки. Обладают грамотрицательным морфотипом и имеют S-слой. Штаммы рода *Thermus* как правило, не пигментированы, описаны бледно- и ярко-желтые виды; они имеют оптимальную температуру роста 65-75 °С. Виды *Meiothermus*

образуют красные, розовые или желтые пигментированные колонии, оптимум температуры находится в диапазоне 50-65 °С. *Meiothermus ruber* (Loginova и др., 1984) является типовым видом рода. Штаммы трех видов рода *Meiothermus* формируют красновато-пигментированные колонии, хотя цвет значительно варьируется от оранжево-красного до темно-красного. Различия в пигментации не связаны ни с местом отбора, ни с таксономическим положением этих штаммов, потому, выделенные из одной и той же геотермальной области и принадлежащие к одному виду, могут иметь различную пигментацию (Chung et al., 1997). Штаммы *M. chliarophilus* образуют ярко-желтые пигментированные колонии (Tenreiro et al., 1995), но этот вид был выделен только из одного горячего источника в центральной Португалии и изоляты могут принадлежать одному клону. Возможно, поэтому, штаммы *M. chliarophilus*, происходящие из других геотермальных областей могут также продуцировать красно-пигментированные клетки. Красная или желтая пигментация штаммов *Meiothermus* обусловлена сложной смесью каротиноидов (Williams, Sharp, 1988).

M. silvanus и *M. cerbereus* имеют оптимальную температуру роста около 55 °С, максимальная температура роста 60 - 65 °С, а минимальная температура роста около 55 °С, тогда как *M. chliarophilus* является наименее термофильным из известных видов этого рода с оптимальной температурой роста примерно 50 °С, и максимальной – 60 °С (Loginova et al., 1984; Tenreiro, 1995a; Chung et al., 1997). Штаммы видов рода *Meiothermus* являются аэробами, но некоторые штаммы способны расти, используя нитрат как акцептор электронов. Все штаммы являются хемоорганотрофами, способными использовать аминокислоты, пептиды и белки, а также простые и сложные углеводы. Было обнаружено, что штаммы *M. cerbereus* и некоторые штаммы *M. silvanus* требуют восстановленные соединения серы, такие как тиосульфат, цистеин, или тиогликолят, для роста в жидкой среде (Nobre et al., 1996; Chung et al., 1997). В этих условиях сульфат не синтезируется во время роста на тиосульфате. Неспособность обнаружить тиосульфат, использованный этими штаммами, может быть связан с небольшими используемыми количествами для роста, что приводит к предположению, что эти

изоляты не могут восстанавливать сульфат с помощью ассимиляторной сульфатредукции. С другой стороны, типовой штамм *M. ruber* окисляет тиосульфат до сульфата (Chung et al., 1997; Намсараев, 2000), причем добавление тиосульфата не стимулировало рост. Окисление тиосульфата до сульфата типовым штаммом *M. ruber* может быть аналогом так называемого свободного окисления соединений серы, найденного у других гетеротрофных бактерий. Было подсчитано, что в культуральной среде *M. ruber* только около половины используемого тиосульфата находится в виде сульфата, и кристаллов серы не наблюдалось (Chung et al., 1997).

Изоляты, напоминающие штаммы *Meiothermus* также выделены из почвы в Республики Того (Логинава, Егорова, 1977). В естественных условиях, виды *M. ruber* выделены из слабощелочных до щелочных термальных местообитаний, где температура воды составляет 40-70 °C (Pires et al., 2005; Yu et al., 2014; Ming et al., 2015; Nabib et al., 2017). В отличие от штаммов, принадлежащих к *Thermus thermophilis*, или других, тесно связанных с галотолерантными видами рода *Thermus*, штаммы *Meiothermus* не были выделены из морских горячих источников, и галотолерантных штаммов среди них неизвестно.

Штаммы *M. silvanus* были выделены из двух горячих источников: в северной Португалии и из гейзера в Исландии. Штаммы *M. cerbereus* были выделены из Geysir в Исландии, и тесно связаны со штаммами, которые были выделены из Йелоустоунского национального парка (Nold, Ward, 1995). Штаммы *M. chliarophilus* изолированы только из горячего источника Alcafache в центральной Португалии с температурой 50,5 °C и pH 8,1. В нескольких километрах от него, в гидротерме S. Gemil с температурой 48 °C и pH 7,9 штаммы *Meiothermus* не были выделены. Кроме того, только штаммы, тесно связанные с *M. ruber*, были изолированы из горячего источника S. Pedro do Sul, в 20 км от Alcafache (Nobre et al., 1996). Одним из факторов, влияющих на выделение большого количества штаммов, схожих с *M. ruber*, из разнообразных геотермальных областей по всему миру, может быть температура.

Выделение *M. ruber* из ферментеров показывает, что эти организмы могут также колонизировать искусственные тепловые среды (Hensel et al., 1986). Известны штаммы рода *Thermus* с более высокими температурными диапазонами роста, которые также были выделены из искусственных тепловых сред обитания (Degryse et al., 1978).

Интересно, что виды *Meiothermus*, кроме того что были найдены в больших количествах в промышленных условиях, например, в системах сточных вод, и системах хранения ядерного топлива (Masurat, 2005), также были выделены в качестве основных представителей биопленок бумагоделательных машин, так как крахмал является легко доступным источником углерода (Kolari, 2003; Suihko, 2004). Все известные бактерии рода *Meiothermus* в качестве источника углерода и/или энергии используют белки, пептиды, дисахариды, аминокислоты, органические кислоты, гексозы, некоторые пентозы (Albuquerque et al., 2010). *Meiothermus* spp. часто связаны с фотосинтезирующими и хемолитотрофными прокариотами. Считается, что такие ассоциации обеспечивают продолжительно низкие концентрации органических соединений, что является полезным для их роста, так как воздействие высоких концентраций органических веществ является ингибирующим (Nold, Ward, 1995).

1.3. RuBisCO - ключевой фермент фиксации диоксида углерода

Цикл Кальвина-Бенсона-Бассама (КББ) представляет собой ряд ферментативных реакций, ответственных за фиксацию углерода. Лимитирующая реакция в этом цикле осуществляется мультимерным ферментом *рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазой/ оксигеназой* (RuBisCO), который катализирует первый важный этап фиксации углерода в цикле КББ: процесс, в котором рибулозо-1,5-бисфосфат вступает в реакцию с атмосферным CO_2 и H_2O с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата (McNevin et al., 2007; Price et al., 2008) (рисунок 1). Этот фермент является одним из важнейших в природе, поскольку играет центральную роль в основном механизме поступления неорганического углерода в биологический круговорот.

RuBisCO встречается во многих формах, которые различаются по структуре, каталитическим свойствам, чувствительности к O_2 и субстратной специфичности. По структурным и функциональным особенностям у бактерий в настоящее время выделяют 2 формы фермента. Наиболее распространённой является форма I, большая субъединица которой кодируется геном *cbbL*. Форму I RuBisCO можно разделить на две основные группы, которые весьма различны по составу аминокислот. Внутри формы I существует разделение на 2 варианта: «зелёный», обнаруживаемый у зелёных растений, водорослей и Alpha-, Beta – и Gammaproteobacteria, и «красный», преимущественно обнаруживаемый у Alpha-, Betaproteobacteria, а также красных водорослей. Было установлено, что большая распространённость автотрофных бактерий тесно связано с фиксацией CO_2 (Yuan et al., 2012a, b).

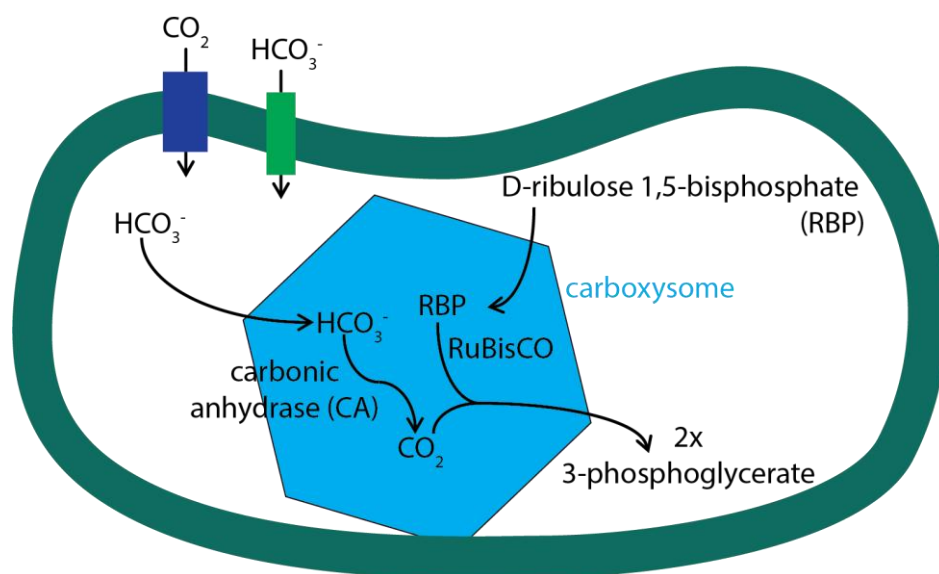


Рисунок 1. Карбоксисома внутри бактериальной клетки. Фиксация CO_2 с помощью фермента RuBisCO (Bonacci et al., 2011; Yeates et al., 2008)

Полногеномное секвенирование геномов двух штаммов *Meiothermus ruber* DSM 1279 и *Meiothermus silvanus* DSM 9946 показало наличие гена *cbbL*, большой субъединицы гена RuBisCO. Гомологи генов цикла Кальвина-Бенсона-Бассамы, в том числе RuBisCO I типа были идентифицированы в генном кластере *Thermus* sp. NMX2A.1 (Muller et al., 2016).

Bi-Di BLAST анализ показал, что гены RuBisCO встречаются не во всех видах *Thermus*. Гомологи этого гена не обнаружены ни в одном штамме *T. thermophilus*, за исключением *T. thermophilus* YIM77409. Относительно штаммов *T. scotoductus*: Bi-Di BLAST анализ показал, что обе субъединицы RuBisCO присутствуют в геноме штамма *T. scotoductus* DSM21543, а штамм *T. scotoductus* K12 обладает только большой субъединицей гена. Тогда как у 2-х штаммов *T. scotoductus* DSM8553 и SA-01 не было идентифицировано генов, кодирующих фермент RuBisCO (Walter et al., 2016). По-видимому, такое различие связано с физико-химическими параметрами среды обитания, из которых выделены термофильные штаммы рода *Thermus*. Установлено, что представители *Thermus*, имеющие гены Рубиско, были выделены из горячих источников, которые содержат достаточные количества HCO_3^- и CO_2 в сочетании с рН воды в диапазоне от нейтральной до щелочной (Muller et al., 2016). Гидрокарбонат-ион в горячих источниках происходит из различных карбонатов горных пород, донных отложений и почв, которые нагреваются от глубокой геотермальной активности, а также из биогенного CO_2 , который растворяется в воде (McGee et al., 2006).

Штамм *T. scotoductus* SA-01 был выделен из глубоких подземных зон, где гены цикла КББ почти полностью отсутствовали, а углеродный метаболизм происходил преимущественно по восстановительному ацетил-КоА пути (Simkus et al., 2016).

Штаммы *Thermus*, содержащие гены рубиско I типа, были выделены из горячих источников с температурой от 50 до 88 °С. Такие высокие температуры снижают уровень оксигенации в воде, тем самым повышая концентрацию CO_2 . Необходимо отметить, что RuBisCO-содержащие штаммы *Thermus* могут, вероятно, фиксировать углерод в качестве хемолитоавтотрофов, тогда как штаммы *Thermus*, лишённые генов RuBisCO являются скорее облигатными хемогетеротрофами (Muller et al., 2016).

1.4. Углеводы микробных матов

Углеводы являются одними из составных компонентов органического вещества организмов и играют важную роль в функционировании микробного сообщества мата. Микроорганизмы синтезируют широкий спектр многофункциональных полисахаридов, включая внутриклеточные полисахариды, структурные полисахариды и экзополисахариды (Nicolaus et al., 2010). Экзопалисахариды (ЭПС), или внеклеточные полисахариды составляют существенную часть внеклеточных полимеров, окружающих большинство микробных клеток в экстремальных условиях, таких как антарктические экосистемы, соленые озера, геотермальные источники, или глубоководные гидротермальные выходы (Chi, Fang, 2005; Kambourova et al., 2016; Le Costaouéc T., 2012). ЭПС представляют собой важный класс биополимеров, имеющих большое экологическое значение. В естественных условиях они являются главной составляющей микробных *биопленок*, где они выполняют защитную и структурообразующую роль. В экстремальных условиях распространенной стратегией выживания микроорганизмов является образование биопленок (Costerton et al. 1999), состоящих из прикрепленных к поверхности микроорганизмов и большого количества внеклеточных полимеров. Возрастающий интерес к микробным экзополисахаридам (ЭПС) определяется широким разнообразием их свойств за счет их неоднородного состава. Основным различием между бактериальными и растительными полисахаридами является отсутствие обширных разветвлений в микробных полимерах, а также их преимущественно гетерополисахаридный характер. Экзопалисахариды (ЭПС), синтезируемые бактериями защищают их от действия высоких и низких значений pH, повышенной температуры, осмотического шока, УФ-облучения, биоцидов, детергентов и др. (Wang et al., 2013; Whitney, Howell, 2013; Zhao et al., 2018). ЭПС являются диффузионным барьером для молекул и могут сорбировать металлы и минералы, растворенные органические вещества, концентрировать ферменты и ростовые факторы (Vu et al., 2009; Raveendran et al., 2013).

Моносахариды, наиболее часто встречающиеся в ЭПС: фукоза, рамноза, арабиноза, галактоза, глюкоза, манноза, ксилоза, галактуроновая кислота и глюкуроновая кислота (Rossi, De Philippis, 2015). Кроме того, также присутствуют галактозамин, глюкозамин, рибоза, фруктоза и, в некоторых случаях, N-ацетилглюкозамин, 2,3-*O*-метилрамноза, 3-*O*-метилрамноза, 4-*O*-метилрамноза и 3-*O*-метилглюкоза (Hu et al., 2003). Как правило, галактоза и, прежде всего, глюкоза (в более чем 90% полимеров) являются основными компонентами (Pereira et al., 2009; Rossi, De Philippis, 2015). По химическому составу различают гомо- и гетерополисахариды. Глюканы, фруктаны и галактаны – основные мономеры в гомополисахаридах, связанных, как правило, β -1,4 или β -1,3 и α -1,2 или α -1,6 связями, например декстран, пуллулан, леван, инулин, курдлан, маннаны, фукоидан, ламинаран. Гетерополисахариды образованы D-глюкозой, D-галактозой, L-рамнозой (ксантан, хондроитин, гиалуроновая кислота, гепарин, альгинат).

Известно, что альгинаты бактерий и водорослей имеют различный мономерный состав, приводящий к более сильному связыванию катионов Ca^{2+} , что влияет на стабильность образующегося геля (Schurks et al., 2002).

Колари с соавторами (Kolari et al., 2003) исследовали различные типы биопленкообразующих микроорганизмов, встречающихся в машинах для изготовления бумаги и картона. К первичным, образующим биопленки микроорганизмам, отнесены виды *Deinococcus geothermalis*; род *Meiothermus*, например виды *M. silvanus* и *M. ruber*, род *Azospirillum*; род *Burkholderia*, например *B. multivorans* или *B. cepacia*; род *Porphyrobacter*, например *P. cryptus*; род *Thermomonas*, например *T. haemolytica* или *T. hydrothermalis*. Они способны к адгезии с чистыми поверхностями, а вторичные биопленкообразующие микроорганизмы затем «связываются» с первичными биопленками. Первичными микроорганизмами, образующими биопленку, обычно являются умеренно термофильные микроорганизмами, температура роста составляет 67 °C, тогда как большинство штаммов показывает наиболее быстрый рост при температурах от 45 до 55 °C.

Широкое применение микробных полисахаридов в фармацевтической, парфюмерной, пищевой и других отраслях промышленности определяется их свойствами: вязкостью, реологическими характеристиками, способностью к набуханию, взаимодействием с определенными структурами (Nicolaus et al., 2010; Freitas et al., 2011). В фармацевтике они используются в качестве основы для изготовления лекарственных форм: как мягчители, эмульгаторы и стабилизаторы суспензий, как склеивающие агенты и разрыхлители в мазях, пилюлях, таблетках. Они обеспечивают длительную устойчивость лекарственных препаратов, стабилизируют и пролонгируют их действие (Radchenkova et al., 2013; Whitney, Howell, 2013; Wang et al., 2018).

1.5. Участие микробного сообщества в минералообразовании

Роль микроорганизмов, в частности цианобактерий, в осаждении минералов привлекла большое внимание из-за последствий этого процесса для эволюции ранних форм жизни на Земле. Цианобактерии были одними из первых организмов, способных к биоминерализации - процесса, посредством которого живые организмы образуют минералы и способствуют их образованию (Konhauser et al., 2001). В термальных водах источников натрий доминирует над кальцием, сульфат-ион доминирует над гидрокарбонат-ионом, а также содержится значительные концентрации растворенной кремнекислоты, поэтому факт образования из таких вод карбонатных отложений - травертинов представляет значительный интерес (Борисенко и др., 1976). Отложения кристаллического кальцита в выходах источника и участках разгрузки связывают, как правило, с быстрой дегазацией CO_2 и пресыщением вод по кальциту (Jones et al., 1996; Заварзин, 2002).

Существует мнение, что образование травертинов не может происходить только в ходе декомпрессии углекислого газа при выходе на поверхность, так как содержания углекислого газа, карбоната, гидрокарбоната и кальция порой слишком низки (Плюснин и др., 2000). Геомикробиологическое изучение травертиновых отложений из горячих источников азотных натриево-сульфатных

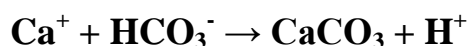
вод Байкальской рифтовой зоны указало на определяющую роль цианобактериальных матов в их образовании.

Намсараев Б.Б. и др. (2011), Татаринев А.В. и др. (2005) считают, что бактериальные маты принимают активное участие в формировании травертинов (известковый туф). Это карбонатная порода, образовавшаяся в результате осаждения карбонатов Ca, Mg, Fe, Na, иногда с кремнеземом и глинистыми минералами из термальных или холодных углекислых источников. Так, наибольшая активность процесса обнаруживается в зонах с постоянным доступом воды источника и превышением продукции над деструкцией. Здесь происходит формирование щелочного геохимического барьера в ходе оксигенного фотосинтеза в цианобактериальном мате, на котором и происходит осаждение карбоната кальция.

Фотосинтез цианобактерий сопровождается отложением карбоната кальция. Избыточное потребление CO₂ в процессе фотосинтеза неизбежно влечёт за собой нарушение карбонатного равновесия:



что снижает pH и приводит к отложению карбоната



Конечная реакция выглядит следующим образом:



В результате часть бикарбонат-иона преобразуется в продукт фотосинтеза, а часть отлагается в виде кальцита.



В процессе формирования микробного мата и отложения кальцита в нём идёт процесс разделения изотопов углерода. Органическое вещество обогащается более лёгким, а на долю карбоната кальция, формирующегося в микробном мате, остаётся более тяжёлый (d¹³C). При гибели основных представителей сообщества происходит параллельное растворение карбоната



В результате резко увеличивается минерализация раствора, концентрация кальция и гидрокарбонат-иона. Основные процессы деструкции происходят в нижней части микробного мата, что приводит к пресыщению раствора по кальцию и повторному его отложению (Заварзин, 2002). В этом процессе карбонат несколько обогащается лёгким изотопом, что снижает значение $\delta^{13}\text{C}$. Установлено, что в среде источника сначала на стенках клеток аккумулируется CaCO_3 , а затем на корке CaCO_3 осаждаются сферические частицы леллингита (FeAs_2) диаметром 100-200 нм, окруженные массой из кальцита. Сферический леллингит образуется только на внешних клетках живых бактерий. Внутри клеток он наблюдается только на умерших бактериях (Tazaki, 2006). Таким образом, в минералообразовании бактерии участвуют не только в период своей жизнедеятельности, но и при отмирании.

Биоинерализация – образование биоконпонентов микроорганизмами. Биологически индуцированная минерализация – это процесс минерального осаждения, который происходит, как правило, внеклеточно вследствие изменения физико-химических условий, вызванных метаболической активностью бактерий. Микробно–индуцированная минерализация как вид биологически индуцированной минерализации, является исключительно результатом микробной деятельности (Franke, Bazyliniski, 2003; Weiner, Dove, 2003). Так, во время микробно-индуцированного осаждения кальцита (CaCO_3) организмы могут секретировать один или более метаболических продуктов (CO_3^{2-}), которые реагируют с ионами (Ca^{2+}) в окружающей среде с последующим осаждением минералов. Некоторые бактерии могут вызывать осаждение CaCO_3 внеклеточно посредством таких процессов, как фотосинтез (McConnaughey, Whelan 1997), аммонификация, денитрификация, сульфатредукция (Hammes et al., 2003), анаэробное сульфидное окисление и разложение мочевины с помощью бактерий-деструкторов (Chen et al, 2009; Wen et al., 2004).

Осаждение карбоната кальция бактериями через гидролиз мочевины самый широко используемый вид микробиологически индуцированного осаждения кальцита (DeJong et al., 2010; De Muynck et al., 2010). Во время этого процесса

бактерии используют мочевины как источник азота и энергии и гидролизуют ее с образованием аммиака и побочных продуктов, состоящих из карбонатов и бикарбонатов. Этот процесс повышает щелочность раствора, создавая щелочную среду, в которой осаждение карбоната кальция становится благоприятным (Chou et al., 2011).

В природных условиях карбонат кальция существует в трех кристаллических полиморфных модификациях: кальцит, арагонит и ватерит. Кальцит является наиболее распространенной и стабильной полиморфной модификацией карбоната кальция, осаждающийся в бактериальных сообществах (Rodriguez-Navarro et al., 2012). Образование той или иной модификации зависит как от условий окружающей среды, так и видовой принадлежности штаммов микроорганизмов сообщества. Разные виды бактерий способствуют осаждению различных типов карбоната кальция, и образуются в основном либо сферические, либо полиэдрические кристаллические формы (Canaveras et al., 2001).

Биологически контролируемая минерализация - это совершенно иной процесс, в котором минералы формируются внутриклеточно, и бактерии оказывают полный контроль над всеми этапами зарождения, роста, морфологии и расположения минералов, образуя внешний и внутренний скелет живых организмов (моллюсков, иглокожих или млекопитающих) (Weiner, Dove, 2003).

В биологически обусловленной минерализации, внешние факторы окружающей среды (физические и химические) ответственны за создание условий (например, высокая щелочность) для осаждения минералов, и присутствия живых организмов не требуется. Однако, органический матрикс, фактически вовлекается в биологически обусловленное осаждение, влияя на морфологию и состав кристаллов посредством взаимодействия между образующимся минералом и органическим веществом, которое служит в качестве матрицы для осаждения минералов.

Окремнение цианобактерий является важным геологическим процессом в современных геотермальных средах, которые могут влиять на микробную фоссилизацию, химического осаждение и перенос кремния в термальных

источниках (Schultze-Lam et al., 1996; Jones et al., 1997; Konhauser et al., 2001). Изучение современных кремниевых гейзеритов в Исландии, Йеллоустоун (США), и Новой Зеландии обнаружило нитчатые цианобактерии, покрытые кремнистыми отложениями (Ferris et al., 1986; Schultze-Lam et al., 1996; Konhauser, Ferris, 1996; Jones et al., 1997, 1999; Konhauser et al., 2001). Однако механизмы окремнения до сих пор не ясны; не известно, что является движущей силой биоминерализации – охлаждение и испарение пересыщенных вод или гетерогенная нуклеация аморфного кремнезема на поверхности микроорганизмов (Yee et al., 2003).

Ранние лабораторные исследования предполагали, что растворенный диоксид кремния гетерогенно осаждается на органических поверхностях благодаря водородным связям (Francis et al., 1978; Westall et al., 1995; Yee et al., 2003) или отрицательно заряженные ионы кремнезёма сорбируются на положительно заряженных поверхностных функциональных группах (Urrutia, Beveridge, 1994; Westall et al., 1995). Напротив, экспериментальные результаты Heaney, Yates (1998) показали, что в насыщенных растворах аморфный кремнезем осаждается однородно, и является полимерной/коллоидной фракцией диоксида кремния, которая садится на органические поверхности. Точно так же, Walter et al. (1972) предположили, что осаждение кремнезема в горячих источниках является химическим процессом, индуцируемым быстрым охлаждением и выпариванием воды источника, и происходит независимо от микроорганизмов.

Предыдущие исследования также показали, что связь между силикатными минералами и бактериальными поверхностями не вызвана прямыми Si-бактерий взаимодействиями (Konhauser et al., 1993, 1994; Urrutia, Beveridge, 1994). Исследования Fein et al. (2002) показали, что связывание диоксида кремния на поверхности *Bacillus subtilis* слабое, и что даже при разбавленных концентрациях кремний проявляет низкое сродство к клеточной стенке бактерий.

По данным Westall et al. (1995), окремнение происходит при присоединении молекулы кремния к функциональной группе, такой как гидроксильная или карбоксильная группы органического вещества, то есть органическое вещество служит матрицей для нуклеации кремния. Если произошла начальная нуклеация,

то кремний осаждается далее путем полимеризации ортосиликата. В клетках, в некоторой степени разрушенных, фактически увеличивается число гидроксильных групп, пригодных для нуклеации кремния. Таким образом, клеточная стенка бактерий, так же как и цитоплазма и внеклеточные полисахариды (ВПС), вырабатываемые бактериями, работают всего лишь как сайты нуклеации для минерализации (Westall et al., 2001).

Лидерами среди минералов по распространению в живых организмах являются оксиды кремния, в том числе водные формы в виде опала, карбонаты кальция (ватерит, арагонит, кальцит), оксиды и гидроксиды железа (включая магнетит), а также различные формы апатита (Skinner, 2005).

Филогенетический анализ показал, что экстремальные термофильные бактерии родов *Thermus* и *Hydrogenobacter* являются доминирующими организмами в кремнистых отложениях природных микробных сообществ, образующихся в трубах и оборудовании геотермальных электростанций в Японии (Inagaki et al., 2003). Эти бактерии, вероятно, активно способствуют быстрому формированию кремнистых отложений. Исследования *in vitro* предполагают, что клетки бактерий *Thermus* вызывают осаждение пересыщенного относительно растворимости аморфного кремнезема во время экспоненциальной фазы роста, сопровождающееся образованием специфического белка (Sip) клеточной оболочки. Sip участвует во взаимодействии клеточной стенки с кремнистыми отложениями в природных геотермальных средах.

В настоящее время имеется много доказательств того, что микроорганизмы, и прежде всего археи и бактерии, играют огромную роль в геологических процессах (Намсараев и др., 2011). Микроорганизмы участвуют в процессах осаждения минералов либо непосредственно, либо косвенным путем, предоставляя твердые поверхности для гетерогенной нуклеации (Phoenix et al., 2000; Franke, Vazylinski, 2003; Поверхность и ..., 2013). Кроме собственно аккумуляции отдельных элементов и биогенного осаждения минералов, микроорганизмы создают условия благоприятные для образования минералов. Способность бактерий синтезировать свои «собственные» геологические и

биологические субстраты посредством микробно-индуцированной минерализации и утилизации метаболитов, позволяет этим системам адаптироваться к широкому спектру экологических условий, которые преобладали на протяжении всей истории Земли.

1.6. Заключение к литературному обзору

В Байкальском регионе широко распространены щелочные гидротермы, которые отличаются большим разнообразием физико-химических условий. Места выхода геотермальных вод на земную поверхность характеризуются интенсивным развитием микробных сообществ. Органотрофные термофильные бактерии различных физиологических групп широко распространены в источниках Байкальской рифтовой зоны (Намсараев, 2011). Они представляют большой интерес с точки зрения приспособленности к экстремальным физико-химическим параметрам окружающей среды и являются перспективными объектами для биотехнологии. Изучение распространения аэробных органотрофных бактерий, а также выделение новых видов позволяет глубже понять экологию распространения бактерий, физиологию и биотехнологический потенциал бактерий.

Органотрофные бактерии группы *Deinococcus-Thermus* являются одними из самых распространенных в составе домена *Bacteria*. Группа включает термотолерантные виды, найденные в надземных и подземных горячих источниках, а также в горячих искусственных средах обитания. Эти бактерии являются первичными декстректорами в микробном сообществе и проявляют высокую устойчивость к экстремальным условиям, таким как температура окружающей среды, ионизирующее и ультрафиолетовое излучения.

Сочетание молекулярно-экологических и геохимических методов показало, что термофильные (гипертермофильные) микроорганизмы участвуют в формировании биоминералов и создают благоприятные условия для их образования (Заварзин, 1984; Намсараев и др., 2011; Татаринев и др., 2005).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2. Объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объектами нашего исследования служили микробные сообщества воды, микробных матов, донных осадков термальных источников Алла, Гарга, Сеюя, Умхей, Горячинск. Исследуемые гидротермы характеризовались различным температурным режимом (от 34 до 77 °С) и различной – от слабо-щелочной до сильно-щелочной реакцией среды.

Для исследования были отобраны пробы воды, донных осадков и микробных матов в летне-осенний период с 2013 по 2015 г.г. на выходе источников и различных станциях по ручью, образованного постоянно изливающейся водой.

Источник **Алла** расположен по берегам реки Алла в районе ее выхода из Баргузинского хребта в 7 км на запад от села Алла Курумканского района Республики Бурятия. Выходы воды наиболее сконцентрированы в нижней части долины и расположены по обоим берегам, где образуют ручей, впадающий в р. Алла. Часть выходов, при высоком уровне воды в реке, заливается. Выход приурочен к месту пересечения Баргузинского разлома с северо-западным разрывом, по которому заложена долина р. Алла. Исследователями описано 46 выходов горячей сульфатно-гидрокарбонатной воды, разбросанных по всей долине. Выходы термальных вод периодически меняют свое местоположение. Основными причинами являются изменение русла реки при наводнениях, засыпка грунтом и илом выходов термальных вод (Борисенко, Замана, 1978). Левобережный источник находится на каменистой отмели около подножья террасы. Наиболее горячие ключи, с температурой 70 °С, выходят по правому берегу реки. Значение рН воды варьирует от 8,9-9,9.

Кучигерские источники находятся у северо-западного борта Баргузинского хребта, на территории Курумканского района, в 11 км от с. Улюнхан. Кучигерские источники представлены группой родников, образующих две линии.

Родники первой линии окаймляют неглубокое (0.2-0.3 м) озеро, дно которого покрыто зеленовато-серым илом, с зелеными слизистыми водорослями по поверхности. Во второй линии насчитывается 10 выходов. Основная разгрузка термальных вод происходит в современных отложениях на территории 500 x 200 м². Общий дебит источников составляет 10-11 л/сек. с температурой наиболее горячих выходов 40-50 °С, рН 9,8. Вода сульфатно-гидрокарбонатная натриевая. Характерная особенность этих источников – множество выходов термальной воды с общим расходом 10-11 л/с, наличие сероводорода до 29 мг/л и его разгрузка в толщу илистых отложений с образованием значительных запасов лечебной сероводородной грязи.

Источники **Умхэй** выходят в северной части Баргузинской впадины на острове площадью около 8 га, образованным рекой Баргузин. Образуют семь групп, большинство выходов горячих и теплых источников сосредоточено на острове, в центральной части которого образуется озеро. Вода сульфатно-гидрокарбонатная натриевая (дебит 5-7 л/с, температура до 46 °С, рН 9,1, минерализация 0,5 мг/л). Значительно содержание сероводорода до 31 мг/л.

Гидротерма **Гарга** находится в Курумканском районе Республики Бурятия в долине реки Гарга (левого притока реки Баргузин) при выходе из гор Икатского хребта. Термальная сульфатно-натриевая вода изливается со скоростью 5 л/с в небольшую пещеру, расположенную на правом берегу реки, на высоте около 100 м от уреза воды. Вода, стекая по ручью, образует травертину высотой 1,5-2 м. Содержание сероводорода составляет 0,46 мг/л. Термальная сульфатно-натриевая вода гидротермы Гарга имеет один выход и изливается в небольшой грот, расположенный на правом берегу р. Гарга, на высоте около 100 м от уреза воды (674 м над уровнем моря). Температура воды на выходе достигает 74 °С. Вода, стекая по ручью, образует травертин длиной до 50 м и шириной до 25 м. Состав травертинов практически полностью карбонатно-кальциевый, с высоким содержанием SiO₂.

Гидротерма **Сеюя** находится в Курумканском районе Республики Бурятия у северо-восточного замыкания Баргузинской долины на правом берегу реки Сеи, в

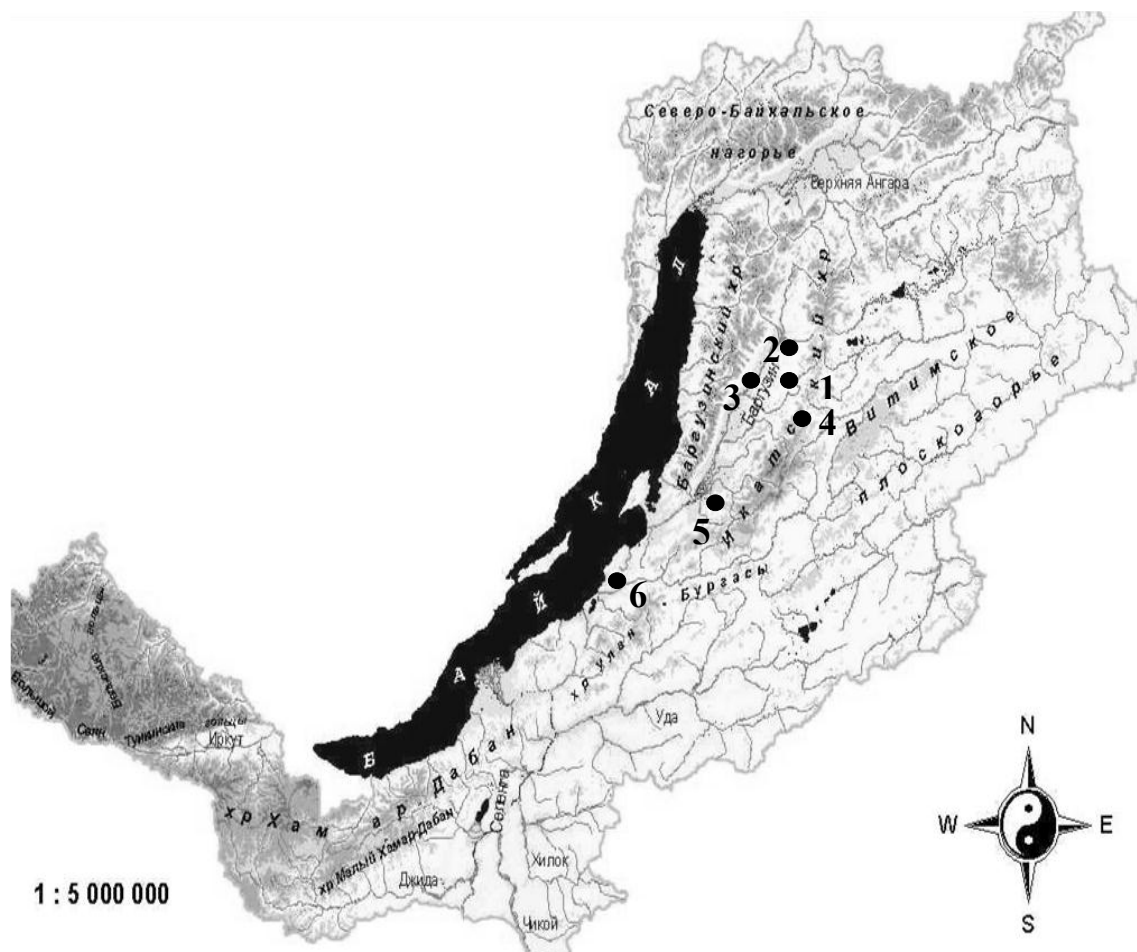


Рисунок 2. Карта расположения минеральных источников Байкальской рифтовой зоны: 1 - Сея, 2- Умхэй, 3 – Алла, 4 – Гарга, 5 – Гарга, 6 – Горячинск

4 км от ее устья. Выход терм расположен у подножья террасы высотой 10-12 метров, сложенной мелкозернистым песком. Выход термальной гидрокарбонатно-сульфатно натриевой воды представляет собой воронкообразное углубление – озеро диаметром 4х5 м, глубиной до 1,5 м, со дна которого бьют многочисленные грифоны с температурой воды до 55 °С (Ломоносов, 1974). Температура на выходе горячей воды 49 °С, рН 9,7.

Источник **Горячинск** выходит на поверхность на восточном берегу озера Байкал, в 1,5 км от береговой линии, в широкой долине между Котковским и Туркинским хребтами. Разгрузка терм происходит в верхней части небольшого песчаного оврага, промытого горячей водой. Самоизливающийся выход источника находится в закрытом павильоне, из которого вода поступает в

бетонный колодец и далее вытекает в ваннные помещения. Избыток ее стекает в пруд, образованный небольшой дамбой, из него часть воды попадает в Байкал. Рядом с колодцем имеется второй выход, вода из которого также сбрасывается в пруд. В овраге, вдоль зоны разрывных нарушений на протяжении 180 м имеется ряд мелких источников, часть из которых имеет периодическое функционирование.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Физико-химические методы

Образцы микробных матов и донных осадков отбирали в стерильную посуду. Фиксацию проб для химических и микробиологических определений проводили сразу после отбора проб. Для молекулярно – генетического анализа пробы фиксировали 70% спиртом. Для изучения отложения минералов микробные маты упаковывались с сохранением структуры, а в лабораторных условиях разделялись на слои и сушились при комнатной температуре. До проведения анализов пробы хранили при +4 °С.

В местах отбора проб измеряли температуру, pH, окислительно-восстановительный потенциал (Eh), TDS (общее количество растворенных веществ). Температуру измеряли сенсорным электротермометром Prima (Португалия), pH и Eh определяли при помощи портативного pH/ORP-метра (HANNA, Румыния). Общее количество растворенных веществ определяли с помощью TDS-Meter Hi96301 (HANNA, Бангладеш). Содержания гидрокарбонатов, карбонатов, хлоридов, катионов кальция определяли титрованием (Резников и др., 1970), сульфатов турбидиметрически (Аринушкина, 1980), сульфидов, кремния колориметрически (Практикум ..., 2005). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре SECIL-1021 (Великобритания).

2.2.2. Методы учета численности и выделения чистых культур микроорганизмов

Учет численности и выделение органотрофных бактерий проводили методом предельных разведений и посева на агар на модифицированной среде Пфеннига (Кузнецов, Дубинина, 1989) состава (г/л): NH_4Cl – 0,4; KH_2PO_4 – 0,4; MgCl_2 – 0,4; KCl – 0,2; NaCl – 0,5. В качестве субстрата использовали три варианта состава (г/л): 1) пируват и ацетат – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,5; 2) соетон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; 3) сахароза – 5,0; дрожжевой экстракт – 0,1; для целлюлозолитиков – полоску фильтровальной бумаги. Отдельно вносили CaCl_2 – 0,1; раствор микроэлементов по Липперту, Витману – 1 мл; витамин В12 – 10 мкг. Для агаризованных сред добавляли 1,5–2 % агар. Выделение чистых культур производили путем последовательных пересевов, с последующим выделением колоний на агаризованной среде Пфеннига. рН среды доводили бикарбонатно-карбонатным буфером до 8,5–9,5, температура инкубации 55 °С.

2.2.3. Методы изучения культуральных и физиолого-биохимических свойств бактерий

Культуральные и физиолого-биохимические свойства выделенных культур исследовали по стандартным методикам (Методы ..., 1984; Практикум ..., 2005). Температурные диапазоны развития бактерий устанавливали в градиентном термостате от 20 до 80 °С. Диапазон рН устанавливали с разными концентрациями бикарбоната и карбоната натрия (от 6,0 до 11,0). Способность к использованию различных источников углерода проверяли на минеральной среде, в которую вносили испытуемые источники углерода в концентрации 0,5 – 1 % от объема среды. Биомассу бактерий определяли по изменению оптической плотности культуры при длине волны 660 нм. Исследование образования сульфата из тиосульфата в условиях стационарной культуры проводили по Резникову (Резников и др., 1970). Концентрацию тиосульфата в среде определяли титриметрически с I_2 и крахмалом, сульфата – турбидиметрически. Пигментный состав бактерий исследовали в препаратах целых клеток в ацетон-метанольных

экстрактах. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре ЛОМО СФ 56 (Санкт-Петербург) в диапазоне волн от 350 до 1100 нм.

2.2.4. Электронно-микроскопические методы

Морфотипы бактерий, размеры, подвижность и спорообразование изучали микроскопированием образцов с помощью электронного микроскопа Olympus (Япония) в фазовом контрасте при 100-кратном увеличении объектива. Изучение минералов в составе микробного мата проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Hitachi TM 1000 (Япония) с рентгеноспектральным анализатором SwiftED-TM EDX. Для изучения ультраструктуры микроорганизмов бактериальные клетки фиксировали и заключали в смесь эпоксидных смол Epon 812. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB 4800 Ultratome Nova (Швеция). Срезы помещали на сеточки, покрытые формваровой пленкой, контрастировали 0,2% водным раствором уранилацетата. Затем контрастировали свинцом по методу Рейнольдса (Reynolds, 1963). Просмотр ультратонких срезов и тотальных препаратов осуществляли на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) Jeol JEM 100C (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

2.2.5. Методы определения внеклеточной протеолитической активности

Для анализа культуральную жидкость отбирали каждые 12 часов роста культуры. Биомассу отделяли центрифугированием (15000 g, 15 мин). Для предотвращения развития патогенной микрофлоры и роста культуры добавляли 0,0025 % азида натрия. Внеклеточную протеолитическую активность культуральной жидкости определяли согласно методу Эрлангера (Erlanger et al., 1961) с помощью микропланшетного фотометра StatFax 2100 при длине волны 405 нм с дифференциальным фильтром 492 нм на следующих субстратах:

- *общую протеолитическую активность* определяли по белковому субстрату азоказеину. Готовили смесь: 50 мкл культуральной жидкости, 150 мкл 0,5 % водного раствора азоказеина, 100 мкл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,0). В

качестве контроля использовали смесь, состоящую из 150 мкл азоказеина и 150 мкл буфера. Образцы инкубировали при 37 °С в течение 12 ч. На следующий день реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10 % трихлоруксусной кислоты, и выдерживали 30 мин при 4 °С. Образовавшийся осадок оставшегося белка удаляли центрифугированием со скоростью 8-10 тыс. g в течение 6-8 мин. Отбирали 400 мкл супернатанта, добавляли 400 мкл свежеприготовленного 0,5 М NaOH. Интенсивность окраски полученных образцов измеряли на спектрофотометре при длине волны 440 нм.

- *специфическую протеолитическую активность* определяли, используя синтетические субстраты для эндопептидаз: специфичных для субтилизинов (GlpAALpNA), трипсина (ВАРА) и аминопептидаз - (L-лейцил-*n*-нитроанилид), (L-фенилаланил-*n*-нитроанилид). Готовили растворы в диметилформамиде с концентрацией 0,1 М для GlpAALpNA, LpNA, FpNA и 0,02 М для субстрата ВАРА.

Для определения пептидазной активности смешивали 700 мкл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0), 10 мкл раствора субстрата и 50 мкл культуральной жидкости. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. Интенсивность окраски определяли при длине волны 410 нм. Нулевой момент измеряли сразу после приготовления реакционной смеси.

Если активность ферментов в культуральной жидкости была очень низкой (меньше 0,1) или отсутствовала, то инкубацию продолжали в течение ночи с той целью, чтобы выяснить, развивается ли данная активность за более продолжительное время, остается незначительной либо полностью отсутствует.

2.2.6. Рентгенофазовый анализ микробных матов

Минерально-фазовый состав образцов микробных матов определяли с помощью рентгенофазового анализа на дифрактометре D-8 Advance фирмы BRUKER AXS (CuK_α-излучение, графитовый монохроматор). Пробы микробных матов были высушены в лабораторных условиях. Высушенный образец

тщательно перетирали в агатовых ступках. Навеску (~1 г.) помещали в кювету и снимали дифрактограммы. Интенсивности отражений оценивали из дифрактограмм по высоте пиков.

2.2.7. Методы определения углеводного состава

Моносахаридный состав микробных матов и полисахаридных фракций определяли после гидролиза с 2 М трифторуксусной кислотой (ТФУ) с последующим ВЭЖХ анализом гидролизатов в виде производных с 1-фенил-3-метил-5-пиразолоном (PMP). Содержание маннита в биомассе определяли методом ВЭЖХ после дериватизации с 4-нитробензоил хлоридом (Kiyoshima et al., 2002), уроновые кислоты – спектрофотометрическим методом по реакции с 3,4-диметилфенолом и серной кислотой (Usova et al., 1995). Для гель-хроматографии применяли КХ на Sephacryl® 400 HR (1.6×60 см, Sigma-Aldrich Inc., Германия), соединенную с автоматическим коллектором фракций, рефрактометрическим и спектрометрическим детекторами. Элюент 0.25 М NaCl, скорость 500 мкл/мин, температура колонки 25°C. Колонку градуировали с использованием стандартов декстранов (12-2000 кДа, Fluka, Швейцария). Объем выхода полисахаридов определяли рефрактометрическим методом при 260 нм. Для получения полисахаридов высушенный и измельченный образец микробного мата экстрагировали 80% ацетоном (1:10) трижды при 45 °С в течение 40 мин в УЗ-ванне (Сапфир, Россия). Далее остаток сырья обрабатывали водой (1:15) при 70 °С в течение 50 мин в УЗ-ванне дважды. Водный экстракт отфильтровывали, объединяли, концентрировали в вакууме до 1/20 от исходного объема и осаждали ацетоном (1:10). Выпавший осадок отделяли центрифугированием (3000 g, 15 мин), переосаждали дважды, диализовали против воды в диализных тубах (cut-off 2 kDa, SigmaAldrich) и удаляли белок по Севага (Olennikov, Rokhin, 2013). В результате была получена фракция водорастворимых полисахаридов SeN-WPS с выходом 2,35 % от массы воздушно-сухого сырья. Для выделения доминирующего полимера (Se-WSPS-07) применяли препаративную гель-проникающую хроматографию (ГПХ). Использовали стеклянную колонку,

заполненную Sephacryl 400 HR (Sigma-Aldrich, USA) и соединенную с автоматическим коллектором фракций и спектрометрическим детектором. В результате разделения 1 г Se-WSPS было получено 445 мг гомогенного полимера Se-WSPS-07. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре ФТ-801 (Симекс, Новосибирск, Россия) в интервале $4000-600 \text{ см}^{-1}$ в таблетке с бромидом калия (1:100). Изучение активностей полисахарида проводились с помощью: антиоксидантная – перекисной деструкции β -каротина (CBA) (Olennikov et al., 2011), Fe^{2+} -хелатирующая – о-фенантролинового метода (Fe-CA) (Olennikov et al., 2014); мембраностабилизирующая – гипотонической стойкостью мембран эритроцитов (ORE); антиатерогенная – связывания атерогенных липопротеидов плазмы крови (AtA) (Olennikov, Tankhaeva, 2007) противовоспалительная – ингибирования термической денатурации альбумина (TDA) (Saso et al., 2011). В качестве образца сравнения использовали альгиновую кислоту (SigmaAldrich).

2.2.8. Методы молекулярно - генетического анализа

Выделение ДНК из образцов матов и из культур проводили по методике описанной Wilson K. (Wilson K., 2011) с модификациями. Для проведения ПЦР и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система. Оценку качества продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1% агарозном геле в 1x TAE-буфере (40 mM Трис; 20 mM ацетат; 1 mM ЭДТА, pH 7.4). Документирование результатов электрофореза проводили при помощи системы «BioDoc II» (Biometra, Германия). Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, проводили по методу Сэнгера с соавт. (Sanger et al, 1977) с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA). Тотальную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов «ДНК-сорб» (АмплиСенс, Россия) и «Bacterial Genomic DNA kit» (Ахуген, США). Метагеномный анализ V3-V4 переменных районов 16S рРНК проведен на секвенаторе «MiSeq» (Illumina, США) в центре коллективного пользования «Геномика» (г. Новосибирск). Полученные

последовательности сравнивали с последовательностями базы данных «GenBank» с помощью программы «BLAST» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Редактирование и выравнивание последовательностей проводили с помощью программы «BioEdit». Построение дендрограммы проводили с помощью программного пакета «MEGA 5.0».

Для идентификации нуклеотидных последовательностей генов RuBisCo (cbbL – большая субъединица гена) в чистых культурах *Meiothermus* и *Thermus* были использованы праймерные группоспецифические системы. Данные праймерные системы были использованы для ПЦР и для последующего секвенирования полученных продуктов. Сравнительный анализ полученных de novo последовательностей с последовательностями из базы данных GenBank проводили с помощью программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.2.9. Методы статистической обработки данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета XLSTAT в Excel 2010. Для полученных данных рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Экологические условия среды обитания микробного сообщества гидротерм Байкальской рифтовой зоны

На рост и активность микроорганизмов, а также структуру, функциональное разнообразие микробного сообщества влияет несколько факторов, в том числе температура, окислительно-восстановительный потенциал и другие абиотические факторы среды обитания.

Температура и pH воды при выходе на поверхность термальных источников варьировались в пределах от 39,0 – 58,0 °С и 9,0 – 10,1 (таблица 2). Значения окислительно-восстановительного потенциала (Eh) изменялись от -333 до +55 мВ. Окисленные условия наблюдались в водах гидротермы Гарга (+55 мВ). Для остальных гидротерм характерны восстановленные условия термальных вод. Минерализация (TDS) воды термальных источников не превышала 1000 мг/дм³. Максимальные концентрации минеральных солей отмечены в источнике Гарга (744 мг/дм³).

Таблица 2

Физико-химические параметры воды источников БРЗ

Источник	Станция	T °С	pH	Eh, мВ	TDS мг/дм ³
Алла	Al-1	64,4	9,7	-297	270
	Al-3	58,1	9,6	-267	238
	Al-5	34,4	9,26	-250	184
Умхэй	Um-2	44,1	10	-310	270
Сеюя	Se-1	50	9,95	-270	260
	Se-2	53,5	9,85	-270	260
Кучигер	Ku-1	39	10,1	-333	333
Гарга	Ga-2	55,2	9,0	+55	744
Горячинск	Gor-14	49,5	9,5	-32	464

Концентрации основных ионов, таких как натрий, калий, кальций, сульфат, хлорид, нитрат, карбонат / бикарбонат были различными (таблица 3). Анализ основных компонент физико-химических параметров показал, что состав воды источников Умхэй и Кучигер был относительно сходен с отличием в содержании магния и сульфида, и небольшими отклонениями в концентрации гидрокарбоната, сульфата, натрия и калия (рисунок 3). В гидротерме Гарга зафиксирована самая высокая водная концентрация хлорида, сульфата, натрия и калия, а также общая минерализация. В источнике Сеюя содержание основных ионов было самым низким. Две основных компоненты описывают 68,7 % от общего расхождения. Первая компонента отделяет высокотемпературные источники Гарга и Горячинск от других. Второй компонент объясняет лишь 21 % наблюдаемых параметров.

Изучение катионного состава минеральных вод гидротерм показало, что в них преобладают щелочные металлы. Содержание ионов магния колеблется от 0,3 до 14,6 мг/дм³. Содержание ионов кальция в водах источников варьирует в пределах 4-31 мг/дм³. Максимальное содержание кальция отмечено в термальных источниках Алла и Гарга.

Исследование анионного состава показало, что в воде большинства источников гидрокарбонаты и сульфаты преобладали над остальными ионами.

Высокое содержание гидрокарбонатов определено в источнике Умхэй, концентрация которых составила 130,5 мг/дм³. В азотных термах присутствие карбонат-иона резко сдвигает величину рН в щелочную сторону. Содержание сульфатов в гидротермах изменялось от 50,0 мг/дм³ (Сеюя) до 520 мг/дм³ (Гарга). Концентрация хлоридов минеральных вод колеблется от 8,0 мг/дм³ до 44 мг/дм³. Следует отметить, что в гидротерме Гарга отмечено высокое содержание хлоридов и сульфатов (таблица 3).

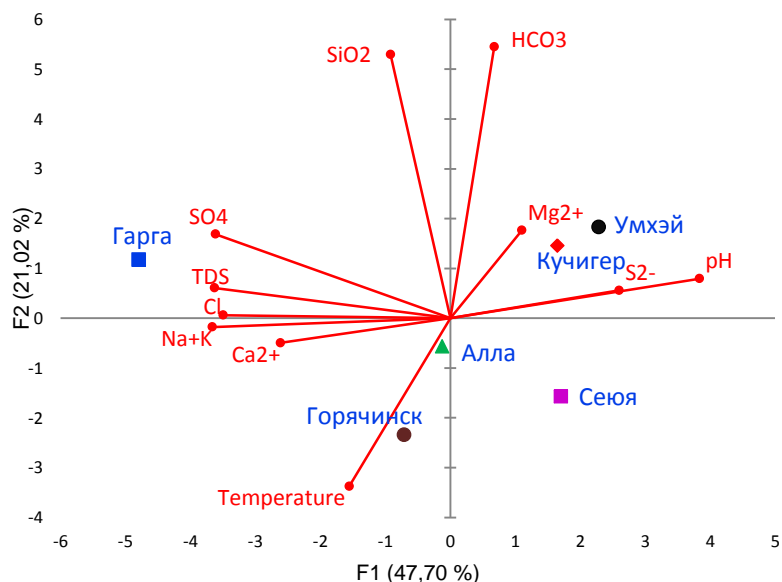


Рисунок 3. Biplot анализа основных компонент (PCA) 11 физико-химических параметров

Характерной особенностью гидротерм является присутствие сероводорода, концентрация которого варьировала от 0,02 мг/дм³ до 12,75 мг/дм³.

Таблица 3

Гидрохимический состав воды гидротерм БРЗ, мг/дм³

Источник	Алла	Умхей	Гарга	Кучигер	Сеюя	Горячинск
HCO_3^-	73,2	130,5	90	95,2	53,0	48,8
CO_3^{2-}	0	0	66,0	0	0	0
Cl^-	16,0	14,2	44	17,7	8,0	34,6
SO_4^{2-}	70,0	65,0	520	92,2	50,0	126,0
S^{2-}	5,5	12,75	0,02	3,0	4,7	5,9
NO_3^-	21,4	46,0	1,8	5,7	14,1	5,0
NO_2^-	0,004	0,016	0	0,002	0,01	0,002
SiO_2	101	126	144	118	89,0	48,0
Ca^{2+}	31,0	8,0	24	4,0	1,6	16,0
Mg^{2+}	1,1	0	0,3	14,6	0,25	2,43
$\text{Na}^+ + \text{K}^+$	122,5	86,4	287,2	136,2	97,5	211,2

Для азотных терм характерно присутствие кремнекислоты в форме диссоциированной и молекулярной ортокремниевой кислоты (H_4SiO_4) и молекул

SiO₂, концентрация которых варьировала от 89 мг/дм³ (Сеюя) до 144 мг/дм³ (Гарга).

Такие наблюдаемые различия или сходства обусловлены географическими особенностями территории, вещественным составом водовмещающих горных пород, климатическими и другими условиями.

3.2. Филогенетическое разнообразие микробного сообщества гидротерм Байкальской рифтовой зоны

Метагеномное секвенирование ДНК микробного сообщества позволяет охарактеризовать состав и структуру микробных сообществ в природных средах, выявить доминирующие физиологические группы микроорганизмов, определить метаболический потенциал микроорганизмов и сообщества в целом.

Разнообразие микробного сообщества термального источника Алла

Гидротерма Алла имеет свыше 46 выходов горячей сульфатно-гидрокарбонатной сероводородной воды, температура которых достигает 75 °С. В зависимости от физико-химических факторов (температура, pH, освещенность, наличие окислителей и восстановителей, содержание газов) происходит дифференциация микробных сообществ в теплых ручьях по изливу и формируются разные биологические зоны. С использованием высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS) гена 16S рРНК было получено 3486, 14446 и 14223 нуклеотидных последовательностей в воде, микробном мате и иловых отложениях гидротермы Алла соответственно. Всего выявлено 17 филумов домена Bacteria и 2 – домена Archaea.

Сравнительный анализ филогенетического разнообразия микробного сообщества матов трех станций гидротермы Алла, отличающихся физико-химическими характеристиками местообитания и по внешнему виду (окраска, толщина) выявил некоторые особенности (рисунок 4). Значение температуры воды в местах развития микробных матов варьировала от 34,4 до 64 °С, в иловых отложениях температура повышалась до 64,2 °С. Значения pH воды варьировали от 9,2 до 9,7, содержание сульфидов – от 2,25 до 13,25 мг/л.

Микробное сообщество мата на станции 1 состояло на 99,9 % из эубактерий (всего 11549 последовательностей).

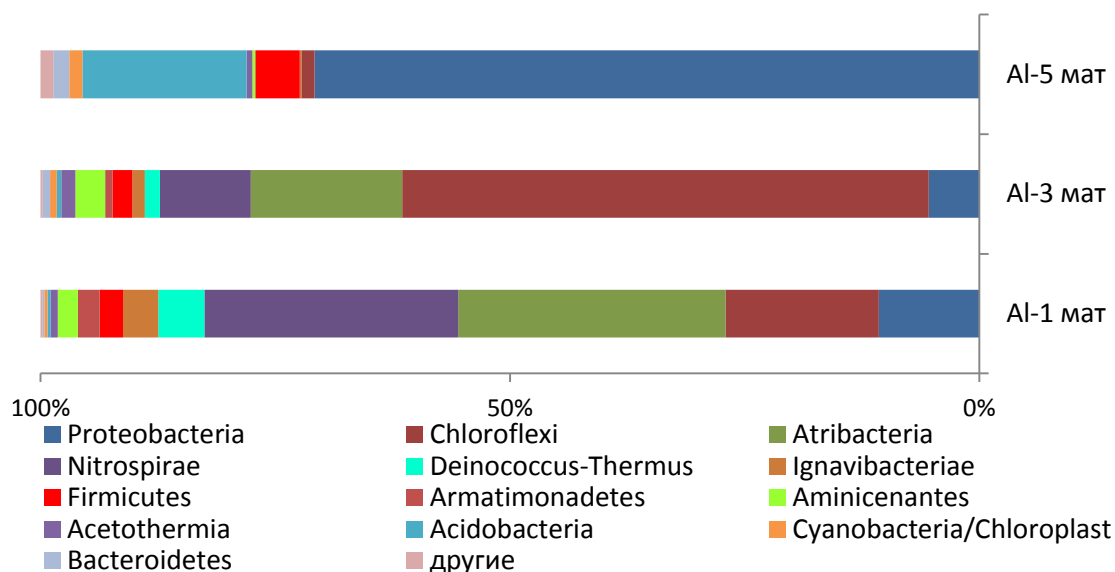


Рисунок 4. Филогенетическое разнообразие сообщества микробных матов гидротермы Алла (станция 1, станция 3, станция 5).

От всех обнаруженных последовательностей наибольшую долю составили представители филума *Atribacteria* (28,4 %) и *Nitrospirae* (27%) и фотосинтезирующие *Chloroflexi* (16,3 %). Последовательности типа *Proteobacteria* не превышали 10,7 %. Далее по распространенности были термофильные *Deinococcus-Thermus* (4,9 %), *Ignavibacteriae* (3,8 %) и в равном количестве представлены *Firmicutes* (2,5 %), *Armatimonadetes* (2,3%), *Aminicenantes* (2,2 %). Минорными компонентами были *Acetothermia*, *Acidobacteria* и *Cyanobacteria*, содержание которых не превышало 0,7%. Архей выявлено не более 0,1% от всего сообщества (рисунок 4, Al-1). Большое количество филогенетически разнообразных групп, из которых ни одна не доминирует, говорит о том, что это хорошо сбалансированное сложное сообщество, где каждая группа занимает свою экологическую нишу. Такое сообщество может рассматриваться как модель первичных экосистем древней Земли и служить объектом дальнейших более детальных исследований (Гумеров и др., 2011).

На станции Al-3, 55 (рисунок 4) в сообществе микробного мата доминировали представители *Chloroflexi* (56 % от всех обнаруженных

последовательностей), которые были представлены на 97 % родом *Roseiflexus*, а бактерии рода *Chloroflexus* не превышали 1,3 %. Последовательности типа *Atribacteria* составляли 16,1 %, *Nitrospirae* представлены только одним родом *Thermodesulfovibrio* - 9,7 %. Далее по распространенности – фила *Proteobacteria* - 5,6 %, *Aminicenantes* (3,2 %) *Firmicutes* (2,1 %), *Acetothermia* (1,5 %). *Deinococcus-Thermus* (1,6 %) представлен термофильными *Meiothermus* sp. (201 последовательность) и *Thermus* sp. (1).

Поверхность микробного мата на станции 5 (A1-5), где происходит смешение термальной воды с речными водами, была покрыта белым слоем элементной серы. Здесь при щелочных значениях pH 9,26 отмечена более низкая температура и концентрация сульфидных ионов (32,8-34,4 °C, S²⁻ - 2,25 мг/дм³). Филогенетический анализ показал, что более 2/3 сообщества составляли представители филума *Proteobacteria* (70,8 %). Следующими были представители филумов *Acidobacteria* (17,5 %) и *Firmicutes* (4,8 %). *Bacteroidetes* и *Cyanobacteria* были малочисленны и составили 1,7 % и 1,4 %, соответственно. В качестве минорных компонентов выступали *Acetothermia* (0,7 %), *Aminicenantes* (0,3 %), *Ignavibacteriae* (0,2 %), *Verrucomicrobia*. Представители *Archaea* не выявлены.

Таблица 4

Видовое богатство и индекс разнообразия в источнике Алла

Источник	Образец, станция	Дистанция	Количество последовательностей	Количество OTU	Индекс Шеннона (H)
Алла	A1-1 мат	0.03	11549	396	3,2
	A1-3 мат	0.03	7510	356	3,9
	A1-5 мат	0.03	652	85	3,4

Видовое богатство и разнообразие было меньше в микробном мате станции A1-1 при температуре 64°C и увеличивалось по мере уменьшения температуры (таблица 4).

На станции 3, где развивался микробный мат, была изучена структура микробного сообщества в различных биотопах (вода, микробный мат, донный осадок).

Сообщество водного слоя над микробным матом состояло на 99,9 % из эубактерий. Наибольшую долю в микробном сообществе воды (рисунок 5, Al-3w) составили фототрофные организмы *Cyanobacteria* - 70,8 % от всех обнаруженных последовательностей. Последовательности типа *Proteobacteria* составляли 11,6 %, *Chloroflexi* - 4,6 %, *Deinococcus-Thermus* - 2,85 %, *Acetothermia* - 1,8 %, *Firmicutes* - 1,7 %, *Actinobacteria* - 1,6 %. Архей выявлено не более 0,1 % от всего сообщества. В иловых отложениях под микробным матом 2/3 сообщества составили некультивируемые представители '*Acetothermia*' (57,9 %). Следующие по распространенности представлены филумы *Atribacteria* (11,2 %), *Aminicenantes* (9,5 %), *Chloroflexi* (6,3 %), *Nitrospirae* (4,6 %). К домену *Archaea* типа *Crenarchaeota* отнесено 4 % полученных последовательностей.

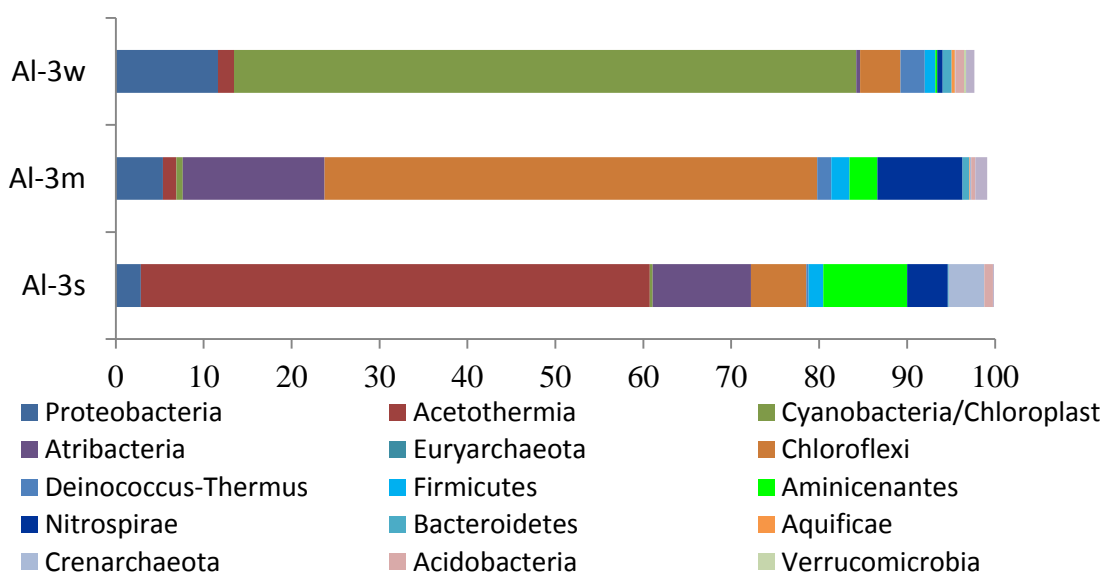


Рисунок 5. Разнообразие микробного сообщества гидротермы Алла (станции 3) в различных биотопах (Al-3w – вода; Al-3m – микробный мат; Al-3s – донный осадок)

Сравнительный анализ показал, что более половины сообществ осадков и мата составляли общие рода, при этом, это были бактерии, доминирующие в

составе сообществ: рода *Roseiflexus*, *Atribacteria*, *Thermodesulfovibrio*, *Aminicenantes*, *Meiothermus*, *Acetothermia*, *Ignavibacterium* и др.

На станции 3 в верхних освещенных слоях воды гидротермы доминируют фотосинтезирующие микроорганизмы - представители филы *Cyanobacteria*, ответственные за кислородный фотосинтез. В сообществе микробного мата преобладали *Chloroflexi* (род *Roseiflexus*). Метаболическая гибкость различных представителей филы *Chloroflexi* определяет ее матообразующим компонентом во многих исследованных горячих источниках и способствует ее конкурентноспособности за питательные вещества и физическое пространство (Miller et al. 2009; Klatt et al. 2013; Gaisin et al. 2015). В иловых отложениях, куда не проникает свет и температура выше 64 °C, доминировали представители *Acetothermia*. Термофильные бактерии *Acetothermia* обладают универсальным метаболизмом для выживания в олиготрофных горячих источниках (Mackenzie et al., 2013). Отличительной особенностью таксономического состава иловых отложений под микробным матом является достаточно количество архей типа *Crenarchaeota*, которые составляли 4 % от всех нуклеотидных последовательностей.

Сходство в таксономическом разнообразии заключалось в том, что во всех пробах от поверхности воды до иловых отложений выявлены в достаточном количестве бактерии филума *Proteobacteria*, для которых характерно большое разнообразие и высокая скорость аэробных и анаэробных метаболических путей (Madigan, 2000). Их активность способствует деструкции и быстрому повторному использованию органических веществ (Thibault et al., 2010). *Firmicutes* и *Acidobacteria* обнаружены во всех пробах.

Представители *Deinococcus-Thermus*, осуществляющие аэробную деструкцию органического вещества, были характерны как для сообщества поверхностной воды (2,8 % от всех последовательностей), так и мата (1,6 %), а *Nitrospirae* характерны для микробного мата (9,75 %) и иловых отложений (4,6 %). Следует отметить присутствие как в микробных матах (1,3 % от всех последовательностей), так и в воде (0,9 %) *Ignavibacteriae*, анаэробных

фотолитотрофов, которые используют восстановленные соединения серы и молекулярный водород в качестве доноров электронов.

Видовое разнообразие сообщества микробного мата и донных осадков ст. 3 источника Алла было больше, чем в сообществе воды (таблица 5).

Таблица 5

Видовое богатство и индекс разнообразия в источнике Алла

Источник	Образец	Дистанция	Количество последов-й	Количество OTU	Индекс Шеннона (H)
Алла	А1-3 вода	0.03	2685	267	3,6
	А1-3 мат	0.03	7510	256	3,9
	А1-3 ил	0.03	8159	304	3,9

Филогенетическое разнообразие микробного сообщества гидротермы Гарга.

Нами было изучено разнообразие микробного сообщества в различных биотопах на станции Ga-2 (55 °C, pH 7,8).

Доминирующими группами бактерий в микробном сообществе воды источника (рисунок 6, Ga-2 вода) являлись представители филумов *Deinococcus-Thermus*, *Proteobacteria*, *Aquificae*, *Firmicutes*, а доля остальных филумов не превышала в среднем 4,0 %. Представители *Deinococcus-Thermus* являлись наиболее многочисленной группой бактерий и составляли около 50 % всего микробного сообщества. Большинство *Deinococcus-Thermus* представлено бактериями рода *Thermus* (94,6 %), рода *Meiothermus* и *Truepera* составляли 5,2 % и 0,1 %, соответственно. Бактерии филума *Proteobacteria* составляли 20 % микробного сообщества. Доминирующими родами в воде были *Enhydrobacter* (12,2 %, класс *Gamma*proteobacteria), *Acinetobacter* (2,6 %, класс *Gamma*proteobacteria). Филум *Aquificae*, доля которого в сообществе составляла 10,8 %, был представлен родом *Hydrogenobacter*. Бактерии этого рода являются облигатными хемлитавтотрофами, окисляющими водород и характерны для различных термальных экосистем. В минорных количествах были обнаружены

представители *Chloroflexi* (1,3 %), *Cyanobacteria* (1,56 %), *Bacteroidetes* (1,87 %), *Actinobacteria* (1,4 %).

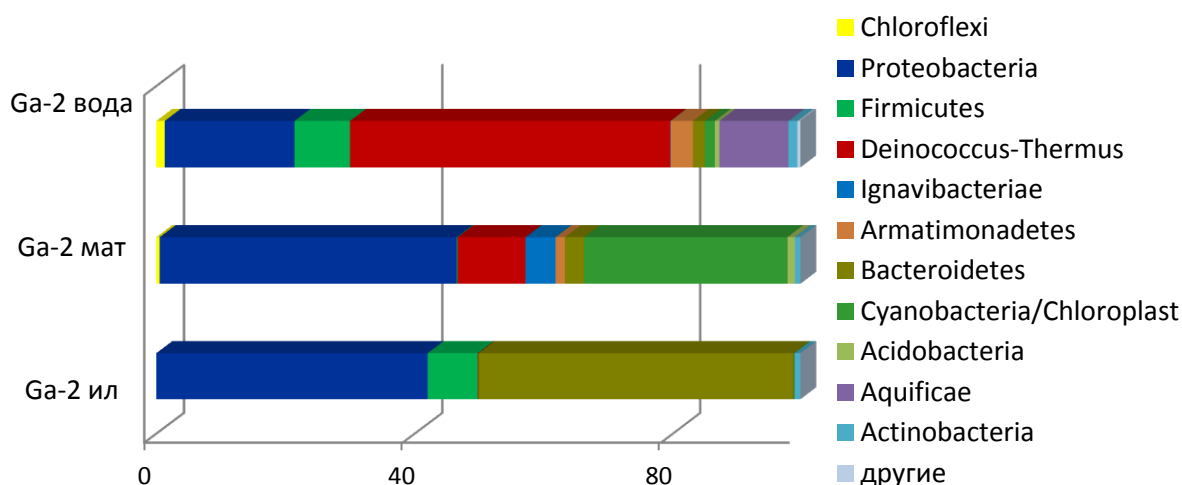


Рисунок 6. Разнообразие микробного сообщества термального источника Гарга в различных биотопах станции Ga-2

Филогенетический анализ сообщества микробного мата (рисунок 6, Ga-2 мат), развивающегося в горячем ручье по изливу, показал, что в сообществе доминировали представители трех филумов: *Proteobacteria* (46 %), *Cyanobacteria* (31,7 %) и *Deinococcus-Thermus* (10,6 %). Среди представителей *Proteobacteria* преобладают аэробные хемоорганотрофные бактерии рода *Sandaracinobacter* (12,2 %, класс *Alphaproteobacteria*) и термофильные хемолитоавтотрофные бактерии рода *Elioraea* (5,7 %, класс *Alphaproteobacteria*). В филуме *Deinococcus-Thermus* доминировали термофильные органотрофные бактерии рода *Meiothermus* (99 %). Среди представителей других филумов преобладали факультативно-анаэробные и облигатные органотрофные бактерии *Ignavibacterium* sp. (15,1 %, класс *Ignavibacteria*), а также аэробные термогалофильные представители класса *Sphingobacteriia - Sediminibacterium* sp. (4,7 %).

В микробном сообществе ила наиболее широко были распространены филумы *Proteobacteria* (42 %) и *Bacteroidetes* (49 %). *Alphaproteobacteria* составляли 33,4 % сообщества. Они были представлены бактериями рода *Caulobacter* (20,2 %), широко распространенными в олиготрофных пресноводных озерах и ручьях, хемогетеротрофными облигатно аэробными бактериями

Sphingomonas sp. (9,1 %), а также азотфиксирующими бактериями *Bradyrhizobium* sp. (1,4 %).

Класс *Gamma*proteobacteria (6,0 %) представлен аэробными гетеротрофными галобактериями *Halomonas* sp. (2,5 %), способными окислять Fe^{2+} , факультативно анаэробными Fe(III)- и Mn(IV)- восстанавливающими бактериями *Shewanella* sp. (1,6%). Филя *Bacteroidetes* была на 95 % представлена родом *Sediminibacterium* (семейство *Chitinophagaceae*).

Видовое разнообразие микробного сообщества воды и мата ст. 2 источника было больше, чем в сообществе донных осадков (таблица 6).

Таблица 6

Видовое богатство и индекс разнообразия в источнике Гарга

Источник	Образец	Дистанция	Количество последов-й	Количество OTU	Индекс Шеннона (H)
Гарга	Га-2 вода	0.03	1925	232	3,9
	Га-2 мат	0.03	14140	356	3,8
	Га-2 ил	0.03	29238	304	3,3

Разнообразие микробного сообщества гидротермы Сеюя

В микробном мате наибольшую долю в сообществе по количеству всех бактериальных последовательностей составила филя *Chloroflexi* (76 %), представленная 3 классами *Chloroflexi_c*, *Anaerolineae* и *Caldineae* (рисунок 7).

Филя *Proteobacteria* включала 4 класса, состоящих из Alpha (22,2 %), Beta (20,6 %), Gamma (53,8 %) и Delta (3,4 %) классов. Класс *Alphaproteobacteria* представлена в источнике Сеюя тремя порядками *Rhodospirillales* (96 %), *Rhizobiales* (2 %) и *Sphingomonadales* (2 %). В классе *Betaproteobacteria* доминируют некультивируемые бактерии *Thiobacillus_f* (1.67 %). Класс *Deltaproteobacteria* включает, в основном, некультивируемые виды бактерий, отнесенных к трем семействам: *Sandaracinaceae*, *Polyangiaceae*, *Мухосoccales_uc* порядка *Мухосoccales*. В класс *Deltaproteobacteria* входят как аэробные, так и

анаэробные бактерии. Большинство анаэробов способно использовать неорганические акцепторы электрона, осуществляя таким образом анаэробное дыхание. Представители класса играют важную роль в круговороте элементов в природе.

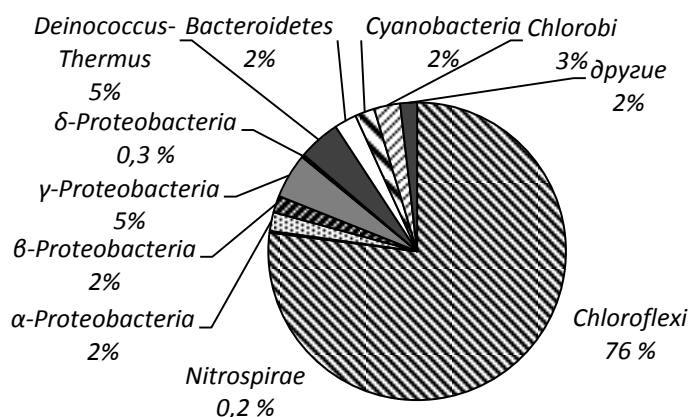


Рисунок 7. Разнообразие бактериального сообщества микробного мата гидротермы Сеоя

Филум *Deinococcus-Thermus* (4,5 %) в микробном мате Сеоя представлен родом *Meiothermus*. Филум *Chlorobi* составляют облигатно анаэробные фотолитотрофы, которые используют восстановленные соединения серы и молекулярный водород в качестве доноров электронов. Филадельфия *Bacteroidetes* представлена в сообществе классами: *Cytophagia*, *Flavobacteria* и *Sphingobacteria*. Следует отметить, что большинство последовательностей этого филума (85 %) отнесены к некультивируемым и неклассифицированным бактериям, что, возможно, указывает на эндемичность данного микробного сообщества. Филадельфия *Bacteroidetes* включает гетеротрофные бактерии с разнообразными метаболическими функциями. Представители филы *Cyanobacteria* составляют около 2,1 % исследуемого сообщества. Другие представители сообщества являются минорными компонентами микробного мата и составляли менее 2 % всех последовательностей.

Разнообразие микробного сообщества источника Умхэй

В микробном мате источника Умхэй станции 2 доминирующими группами бактерий являлись представители филума *Proteobacteria* (67 %), 18,9 % составили

неклассифицируемые на уровне филума последовательности, далее по распространенности шли – филы *Bacteroidetes* и *Cyanobacteria* (рисунок 8). Представители *Deinococcus-Thermus* содержались в минорных количествах.

Среди доминирующих родов выявлены представители класса *Betaproteobacteria* - *Hydrogenophaga* 41 %, *Thiobacillus* 6,0 %, а также бактерии рода *Flavobacterium* (около 5,5 %). Новый род *Methyloversatilis* с типовым штаммом *Methyloversatilis universalis* в семействе *Rhodocyclaceae* был представлен на 1,6 %. Класс *Alphaproteobacteria* включает аэробные азотфиксирующие бактерии рода *Rhizobium* (1,3 %), *Brevundimonas* (0,95 %), а *Gamma**proteobacteria*

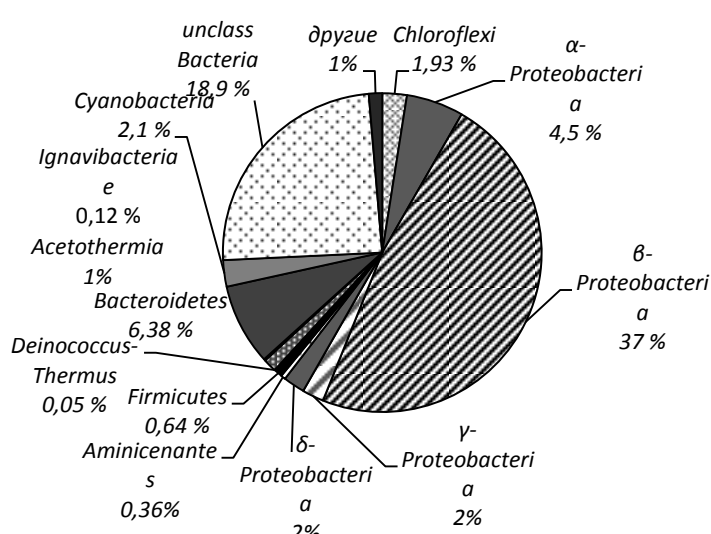


Рисунок 8. Таксономическое разнообразие бактерий микробного мата источника Умхэй

– рода *Pseudomonas* (1,1 %).

Представители *Proteobacteria* являлись наиболее многочисленной группой бактерий в микробном сообществе матов источника Умхэй и составляли около 84 % всего микробного сообщества (рисунок 8). Класс

Alphaproteobacteria был самым многочисленным, и представлен семейством *Caulobacteraceae* с доминирующим родом *Brevundimonas* (95 % последовательностей). Среди остальных родов были представители *Hydrogenophaga*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*. Доля неклассифицируемых последовательностей на уровне филума составила 5 %. Бактерии филума *Bacteroidetes* составляли 4 % микробного сообщества. Филум *Chloroflexi*, доля которого в сообществе составила 2,6 %, был представлен неклассифицируемыми *Chloroflexi* и семейством *Anaerolineaceae*. Доли филумов *Acetothermia*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Ignavibacteriae*, *Aminicenantes*, *Deinococcus-Thermus*, *Acidobacteria* не превышали 1 %.

Разнообразие микробного сообщества источника Горячинск

В горячем источнике Горячинск наибольшую долю в сообществе (27 % всех последовательностей 16S рНК) составляли представители филы *Proteobacteria* (рисунок 9). Далее по распространенности были микроорганизмы филумов *Cyanobacteria* (17,3 %), *Chloroflexi* (11,5 %), *Planctomycetes* (10,3 %). В качестве субдоминирующих выявлены представители *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Chlorobi*. В минорных количествах представлены филумы *Firmicutes*, *Nitrospirae*,

Armatimonadetes, *Actinobacteria*.

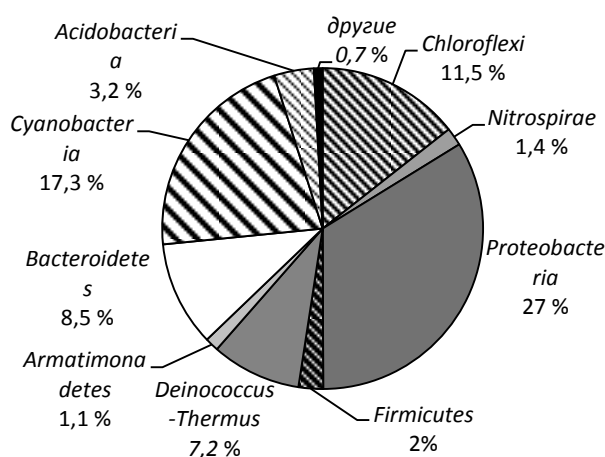


Рисунок 9. Таксономический состав бактериального сообщества микробного мата источника Горячинск

Таксономическое разнообразие микробных сообществ гидротерм БРЗ

Нами было изучено филогенетическое разнообразие микробного сообщества в микробных матах, отличающихся по температуре станций разных гидротерм БРЗ (рисунок 10). В зависимости от температуры воды выявлено доминирование отдельных филумов. Так, *Nitrospirae* и *Deinococcus-Thermus* были преобладающими в сообществе при температуре 65 °С, тогда как *Chloroflexi* и *Atribacteria* были доминирующими типами при температурах 53-58 °С. В интервале температур 53-58 °С начинало преобладать *Chloroflexi*-содержащее сообщество (Сеюя, Алла – станция 3). Сообщество микробного мата на станции 1 источника Алла (55 °С) филогенетически разнообразное, в котором ни один филум не доминирует. Это говорит о том, что это хорошо сбалансированное сложное сообщество, где каждая группа занимает свою экологическую нишу. При понижении температуры до 45-50 °С доминирующим филумом были *Proteobacteria* (гидротермы Горячинск, Гарга). В качестве содоминирующей являлись представители *Cyanobacteria*, количество последовательностей которых

отрицательно коррелировало с филумом *Chloroflexi*. Известно, что в сообществе микробных матов, где присутствуют фотосинтезирующие *Chloroflexi* и *Cyanobacteria*, бактерии *Chloroflexi* обычно переключаются на фотогетеротрофный метаболизм за счет органических соединений, синтезируемыми *Cyanobacteria*, а не конкурируют с *Cyanobacteria* за неорганический углерод. Это особенно характерно для микробных матов щелочных гидротерм, где содержание CO₂ в воде ограничено (van der Meer et al., 2003).

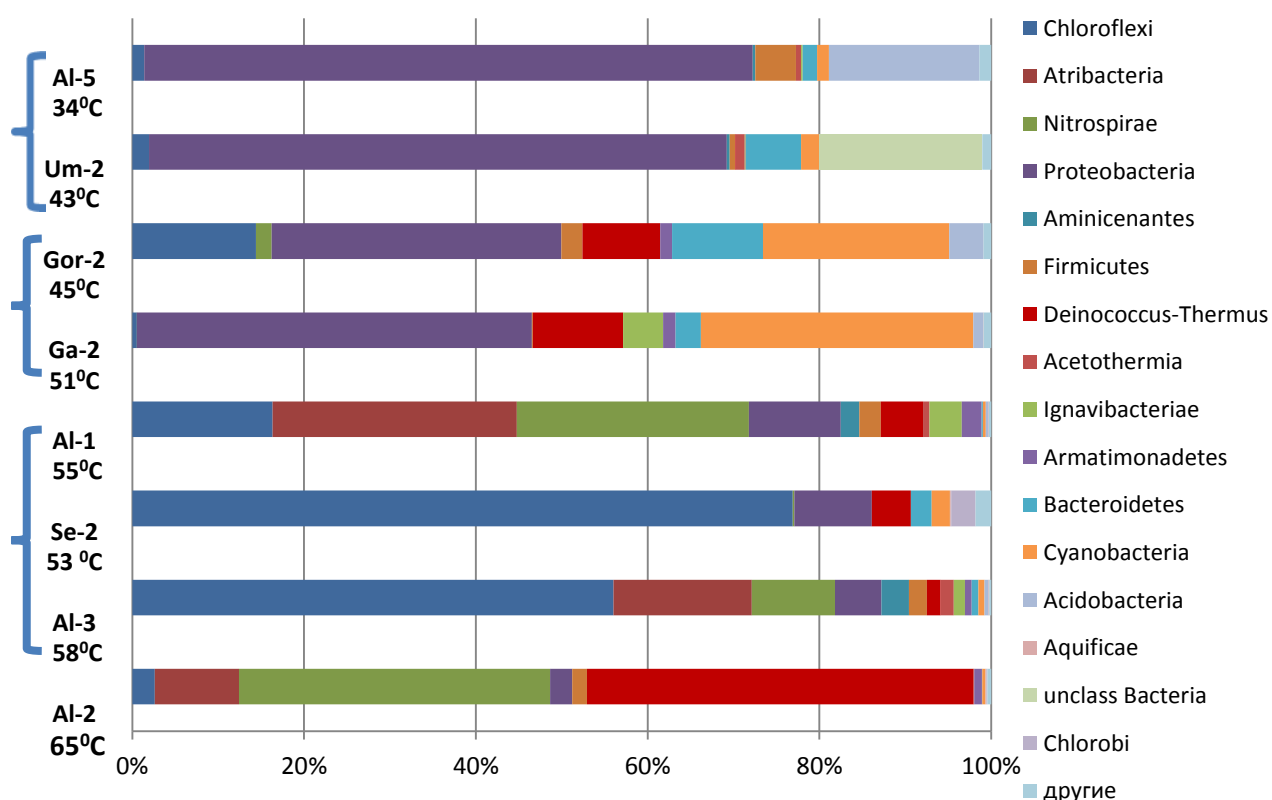


Рисунок 10. Таксономическое разнообразие микробных матов гидротерм БРЗ, полученное по результатам метагеномного анализа ампликона гена 16S рРНК

При температуре воды источников 34 °С (Алла, станция 5) доля представителей *Proteobacteria* составляла примерно 70 % от всего сообщества. Филум *Aquificae* обнаружен в минорных количествах почти во всех микробных матах источников, за исключением источников - Горячинск (45 °С), и Умхэй (43 °С), а также низкотемпературной зоны источника Алла (станция 5, 34 °С). Известно, что в эту группу входят экстремально термофильные бактерии,

способные размножаться при температурах до 95 °С. Бактериальное сообщество станций гидротерм с мезофильными температурами (34-43 °С) характеризуется появлением и увеличением количества гетеротрофных бактерий филумов *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Planctomycetes* (рисунок 10).

Сравнительный анализ состава доминирующих таксонов показал существенные различия в зависимости от места отбора пробы и выявил пространственную стратификацию сообщества. Сообщества в микробных матах, развивающиеся при более высокой температуре (53 - 58 °С) были близки по качественному и количественному таксономическому составу. Тогда как сообщество микробного мата при температуре 34-51 °С сильно отличалось от высокотемпературных областей. Так, если в высокотемпературной области преобладали филогенетически разнообразные группы *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*, то при понижении температуры – доминировали *Proteobacteria*. В низкотемпературном мате не выявлены термофильные представители таких филумов как *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Deinococcus-Thermus*, характерные для сообщества высокотемпературных матов.

Анализ соответствий (СА) позволил определить влияние физико-химических параметров на распространение филумов в соответствии с местообитанием (рисунок 11). Температура, рН, содержание кремниевой кислоты и сульфатов главным образом влияли на распространение представителей филумов *Acetothermia* и *Firmicutes* в источнике Умхэй. Содержание сероводорода и гидрокарбонатов положительно коррелировало с распространением представителей филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* в гидротерме Умхэй. Высокое обилие филумов *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi* и *Aminicenantes* в микробном мате гидротермы Алла обусловлено концентрациями магния и кальция. Распространение бактерий филумов *Deinococcus-Thermus*, *Ignavibacteriae*, *Cyanobacteria* тесно связано с минерализацией в источнике Гарга.

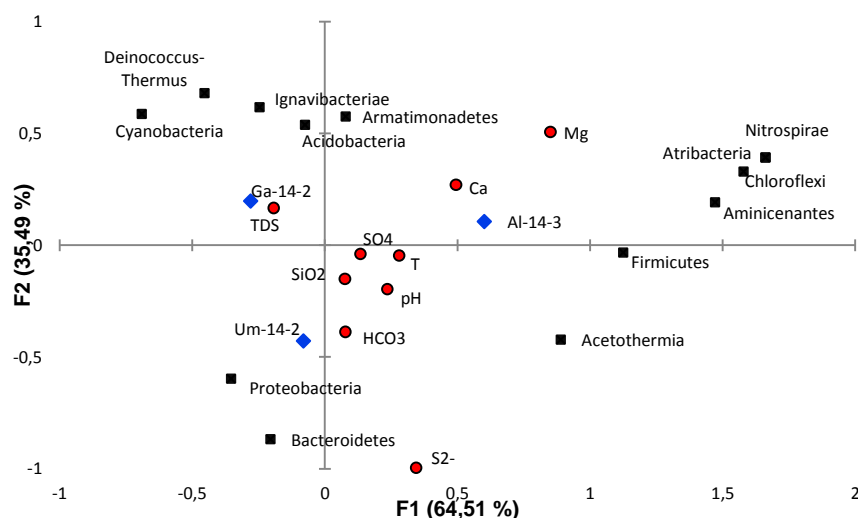


Рисунок 11. Анализ соответствий доминирующих филумов в микробном сообществе гидротерм от физико-химических параметров

3.2.1 Распространение бактерий филума *Deinococcus-Thermus* в щелочных гидротермах БРЗ

Филогенетический анализ сообществ микробных матов, донных осадков и воды термальных источниках Байкальской рифтовой зоны показал, что филум *Deinococcus-Thermus* представлен 3 родами: *Meiothermus*, *Thermus* и *Truepera*.

В источнике Алла доля филы *Deinococcus-Thermus* составила от 1,6 до 5,0 %. Интересно, что представители рода *Thermus* преобладали на ст. 1 (температура 55 °С) источника, а при температуре 58 °С были доминирующими бактерии *Meiothermus*, как в воде источника (рисунок 13), так и в микробном мате (рисунок 12). Ранее было показано, что в гидротерме Алла (температура 65 °С) фила *Deinococcus-Thermus* являлась доминирующей (45,0 %), доля *Meiothermus* и *Thermus* составила 43,5 % и 55,8 %, соответственно.

В воде гидротермы Гарга фила *Deinococcus-Thermus* составляла почти 50 % от всех последовательностей, с доминированием бактерий рода *Thermus* (рисунок 12). В микробном мате доля *Meiothermus* составила 99 % от всего сообщества филума *Deinococcus-Thermus*. В минорных количествах выявлены представители рода *Truepera* sp. (0,1 %). В микробном мате источника Умхэй представители рода *Thermus* были доминирующими, а в гидротерме Сеюя, наоборот, преобладали бактерии *Meiothermus* (рисунок 12).

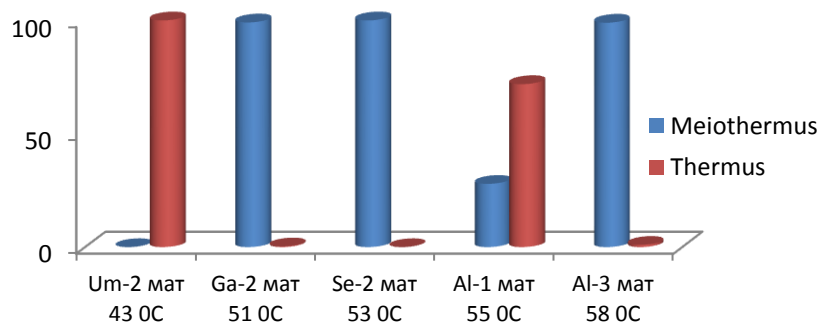


Рисунок 12. Распространение бактерий родов *Meiothermus* и *Thermus* в микробных матах гидротерм БРЗ

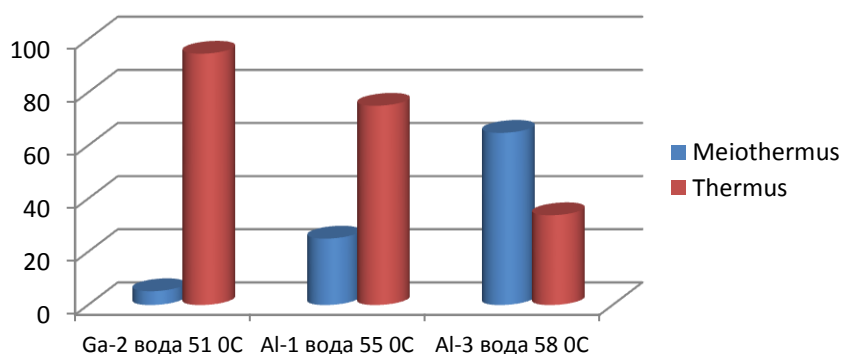


Рисунок 13. Распространение бактерий родов *Meiothermus* и *Thermus* в воде гидротерм БРЗ

Таким образом, термофильные бактерии филума *Deinococcus-Thermus* широко распространены в гидротермах с температурой от 42 до 65 °C, их доля в сообществе составляла от 1,5 до 45 %. Бактерии группы *Meiothermus-Thermus*, осуществляющие аэробную деструкцию органического вещества, были характерны как для сообщества поверхностной воды (до 49,6 %), так и мата (до 10,5 %). В иловых отложениях бактерии этой группы не выявлены. Как правило, в микробных матах в основном преобладали бактерии рода *Meiothermus*, а в сообществе воды гидротерм были распространены представители *Thermus*.

3.3 Распространение органотрофных бактерий щелочных гидротерм БРЗ

Формирование микробных сообществ и характер микробиологических процессов в минеральных источниках тесно связаны с экологической обстановкой среды обитания, физическими и химическими свойствами поступающих вод.

На начальных стадиях деструкции органического вещества минеральных источников участвуют гидролитические микроорганизмы, разлагающие

высокополимерные соединения. Нами была определена численность аэробных протеолитических, сахаролитических и целлюлолитических бактерий в микробных матах и донных осадках изучаемых источников (таблица 7).

Таблица 7

Численность аэробных гетеротрофных бактерий в гидротермах, кл/мл

Источник	Т, °С	Численность термофильных аэробных бактерий					
		Протеолитики		Сахаролитики		Целлюлолитики	
		м.м	д.ос.	м.м	д.ос.	м.м	д.ос.
Алла	64,4	10 ³	10	10	10 ²	10	10
	38,9	10 ³	10	10 ³	10 ³	10	10
	58,1	10 ⁴	10	10 ⁵	10 ³	10 ²	10
	40,1	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ³	10	10
Умхэй	47	10 ⁷	-	10 ⁵	-	10 ²	10
	43,4	10 ⁷	-	10 ⁴	-	10	10
	39,7	10 ⁸	-	10 ⁵	-	10 ²	10 ²
Сеюя	50	10 ⁵	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ²	10
	53,5	10 ⁵	10 ³	10 ⁵	10 ²	10	10
Гарга	73,6	-	-	-	-	-	-
	55,2	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ²	-
	51,5	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10	-
Кучигер	39	10	10 ²	10 ²	10 ³	10 ²	10
	38,7	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	10	10

Наибольшее количество протеолитических бактерий выявлено в микробных матах источников Умхэй, Сеюя и Гарга. Количество бактерий, гидролизующих углеводы, варьировало от 10 до 100 тыс. кл/мл. Наибольшее число бактерий-сахаролитиков (100 тыс. кл/мл) выявлено в микробных матах источников Сеюя и Умхэй. Во всех источниках, кроме Кучигер, численность сахаролитических гидролитиков была на порядок выше в микробных матах, чем в донных отложениях. Количество бактерий-целлюлолитиков, колебалось от 10 до 100 кл/мл как в микробных матах, так и в донных осадках. На поверхности фильтровальной бумаги культуры образовывали характерный рост в виде размытых зон темно-желтого цвета.

Из проб микробных матов и донных осадков термальных источников Прибайкалья было выделено 32 штамма аэробных и факультативно-анаэробных органотрофных бактерий. Для получения накопительных культур использовали

модифицированную среду Пфеннига, в которую вносили различные источники углерода: ацетат, пируват, соетон или сахарозу. Инкубирование проводили при 50-55 °С, рН среды устанавливали 9,0-9,5.

Клетки бактерий представлены неспорообразующими грамотрицательными палочками, размеры которых варьировали в пределах от 0,3-1,0 x 0,6-10,0 мкм в зависимости от субстрата (рисунок 14, 15, 16). Палочки образовывали нити.

На питательной агаризованной среде изоляты образовывали круглые или ризоидные гладкие колонии, пигментированные: розовые, красные, желтые. Края колоний ровные, у некоторых слегка волнистые. Структура колоний мелкозернистая, реже однородная. Профиль колоний плоский реже выпуклый, а также встречались вросшие в агар.



Рисунок 14. Фото культур гетеротрофных бактерий (субстрат-соетон), шкала 1 мкм, электронный микроскоп: а – Se-14-2 (донный мат), б – Um-14-2; с – Gor-14-1



Рисунок 15. Фото культур гетеротрофных бактерий (субстрат-ацетат, пируват), шкала 1 мкм, электронный микроскоп: а – Al-14-3 (на ацетате, пирувате); б – Ku-14-2; с – Ga-14-3

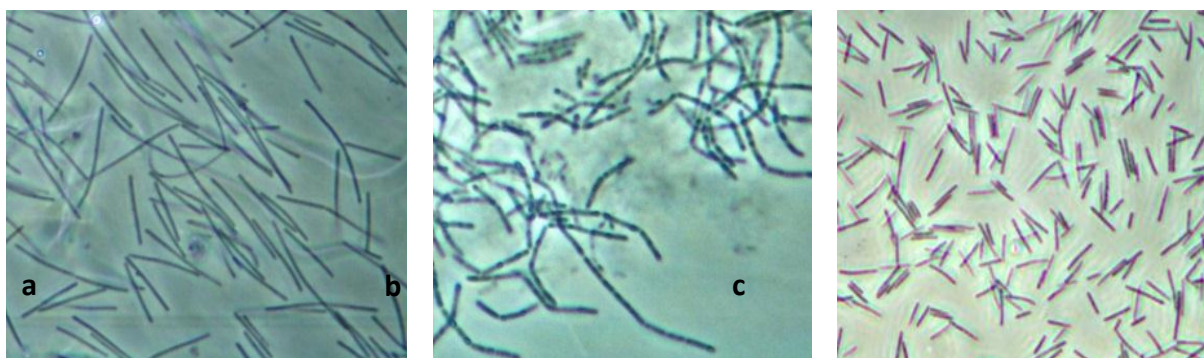


Рисунок 16. Фото культур гетеротрофных бактерий (субстрат-сахароза), шкала 1 мкм, электронный микроскоп: а – А1-14-3 (на сахарозе); б – Gog-14; с – А1-15 (желт. колонии)

Выделенные накопительные культуры морфологически были близки к представителям рода *Meiothermus*.

3.4. Характеристика органотрофных бактерий, выделенных из термальных источников БРЗ

3.4.1. Морфологическая характеристика культур

Из микробного мата источников Алла, Умхэй и Гарга было выделены пять чистых культур аэробных органотрофных бактерий: А1-14-3, А1-15-1р., А1-15-1ж., Um-14-2, Ga-14-2.

Гидротерма Алла

Чистые культуры (А1-14-3, А1-15-1р., А1-15-1ж.) были выделены на среде с добавлением ацетата и пирувата в качестве источника углерода. Морфологически они представляли собой неспорообразующие, неподвижные прямые удлиненные палочки толщиной 0,5-0,7 мкм и длиной 2,0-8,0 мкм, выстраивающиеся в нити (рисунок 17). Рост на поверхности твердой среды в чашке Петри происходил в виде розовых, красных и желтых округлых, гладких мелких колоний. На жидкой среде рост происходил недостаточно стабильно.

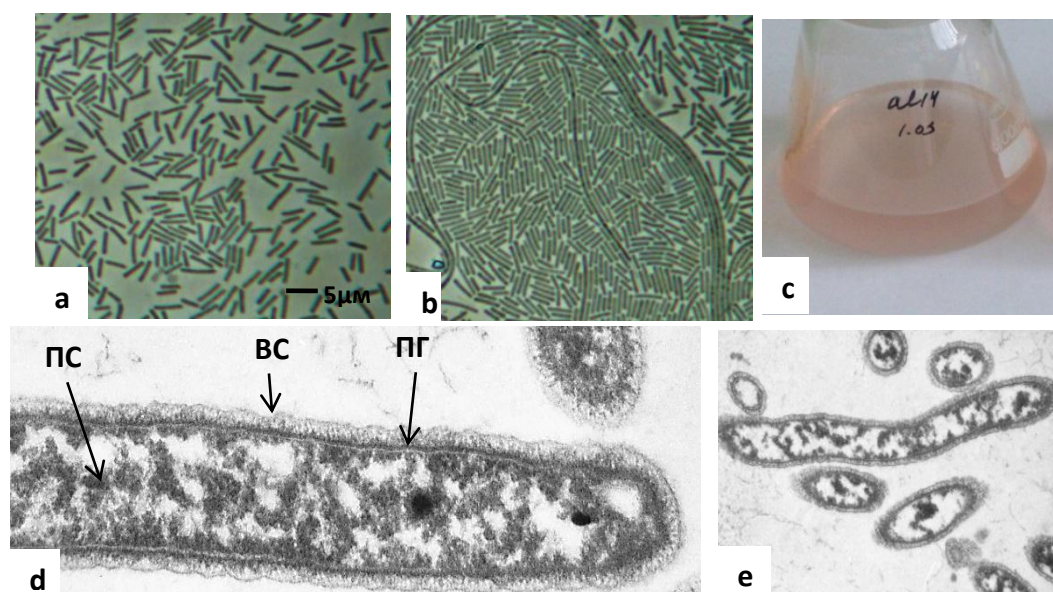


Рисунок 17. Фазово-контрастная микроскопия клеток штамма Al-14-3 (a, b). Культура на жидкой среде (c). Трансмиссионная электронная микроскопия: (d,e) – ультратонкие срезы: ПГ — пептидогликан, ВС — внешний слой, ПС— включения полисахаридов.

Культура Al-14-1

Из микробного мата источника Алла выделена нитчатая бактерия (штамм Al-14-1), которая образовывала в аэробных условиях на поверхности агаризованной среды колонии мелкие оранжевого цвета, блестящие. Культура имеет нитчатое строение, длина клеток колеблется от 1 до 3 мкм, ширина 0,7-1,0 мкм, с включениями по всей длине, которые, по-видимому, являются гранулами полибетаоксимасяной кислоты (рисунок 18). Факультативный аэроб. Наилучший рост штамма наблюдался в пробирках с агаром в микроаэробной зоне (1 см от поверхности плотной среды с 1,5% агаром). Культура Al-14-1 имела оптимум роста 50 °С. Наиболее активный рост был отмечен при pH 8.0-8.5.

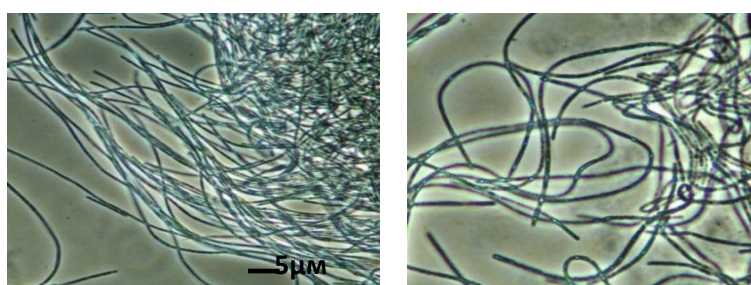


Рисунок 18. Морфология нитчатой зеленой бактерии Al-14-1 из гидротермы Алла. Фото световой микроскоп

Гидротерма Умхэй

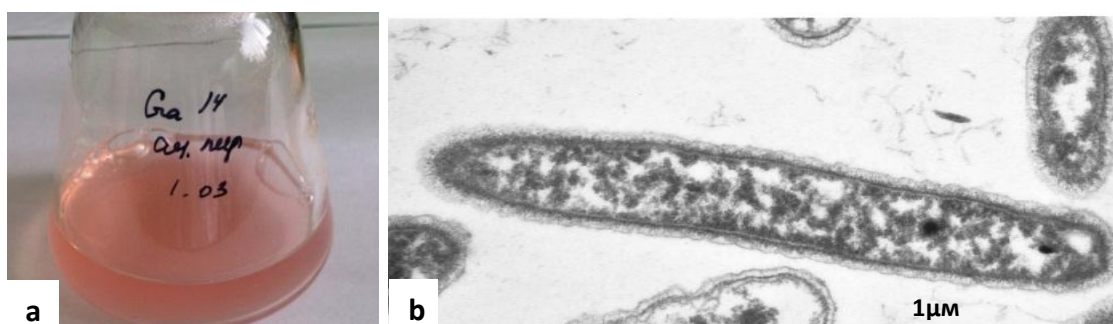
Из гидротермы Умхэй с температурой 42,0 °С была выделена культура (Um-14-2) аэробной гетеротрофной бактерии. Клетки представляли собой прямые или слегка изогнутые палочки, неспорообразующие, 0,3-0,4 x 8-10 мкм. На агаризованной среде образовывали круглые гладкие неблестящие колонии от розового цвета до оранжевого цвета (рисунок 19). В качестве источника углерода использовали соетон и сахарозу.



Рисунок 19. Культура Um-14 на жидкой среде (а). Фазово-контрастная микроскопия клеток штамма (б). Трансмиссионная электронная микроскопия: (с) – ультратонкие срезы

Гидротерма Гарга

Из микробного мата Гаргинского источника с температурой 55,2 °С был выделен штамм аэробной гетеротрофной бактерии. Клетки представляли собой прямые палочки, неспорообразующие, 0,3-0,6 x 3-6 мкм. На агаризованной среде образовывали круглые мелкозернистые колонии светло-розового цвета (рисунок 20). В качестве источника углерода культура использовала ацетат, пируват и сахарозу. Рост на соетоне не наблюдался.



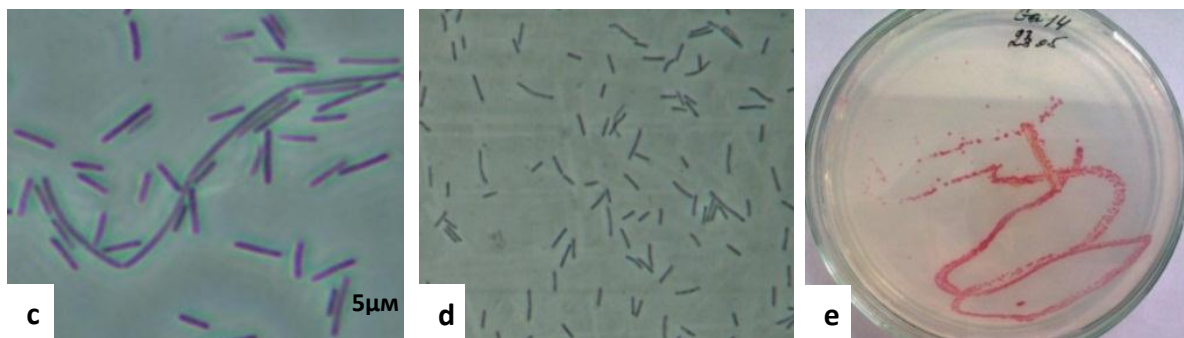


Рисунок 20. Культура Ga-14 на жидкой среде (а) и на агаризованной (е). Трансмиссионная электронная микроскопия: (b) – ультратонкие срезы. Фазово-контрастная микроскопия клеток штамма (с, d)

3.4.2. Генотипические свойства и филогенетическое положение культур

Анализ гена 16S рРНК штаммов Al-14-3, Al-15-1, Um-14-2 показал, что они относятся к семейству *Thermaceae*, порядку *Thermales*, филуму *Deinococcus-Thermus*, и являются представителями рода *Meiothermus*. По результатам BLAST-анализа наиболее близким к исследуемым штаммам оказался вид *Meiothermus ruber* strain 16105 (Y13596.1) (рисунок 21). Уровень сходства последовательностей для штамма Al-14-3, Al-15-1 р. и Um-14-2 составил 100%. Уровень сходства последовательностей штамма Ga-14-2 со штаммами *Meiothermus ruber* strain 16105, *Meiothermus cerbereus* strain GI-1 (Y13594), *Meiothermus cateniformans* strain LI-1 (EU247891) составлял 99%. Но, как видно из дендрограммы, штамм Ga-14-2 кластеризуется с типовым штаммом *Meiothermus ruber*. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что данные изоляты являются **штаммами вида *Meiothermus ruber***. Штамм Al-15-1ж. был отнесен к роду *Thermus*, наиболее близким (100 % сходство) к нему оказался штамм *Thermus* sp. Y55-10 (рисунок 21). Уровень сходства с ближайшим валидно описанным видом *Thermus igniterrae* strain GE-2 (Y18408.1) составил 99 %.

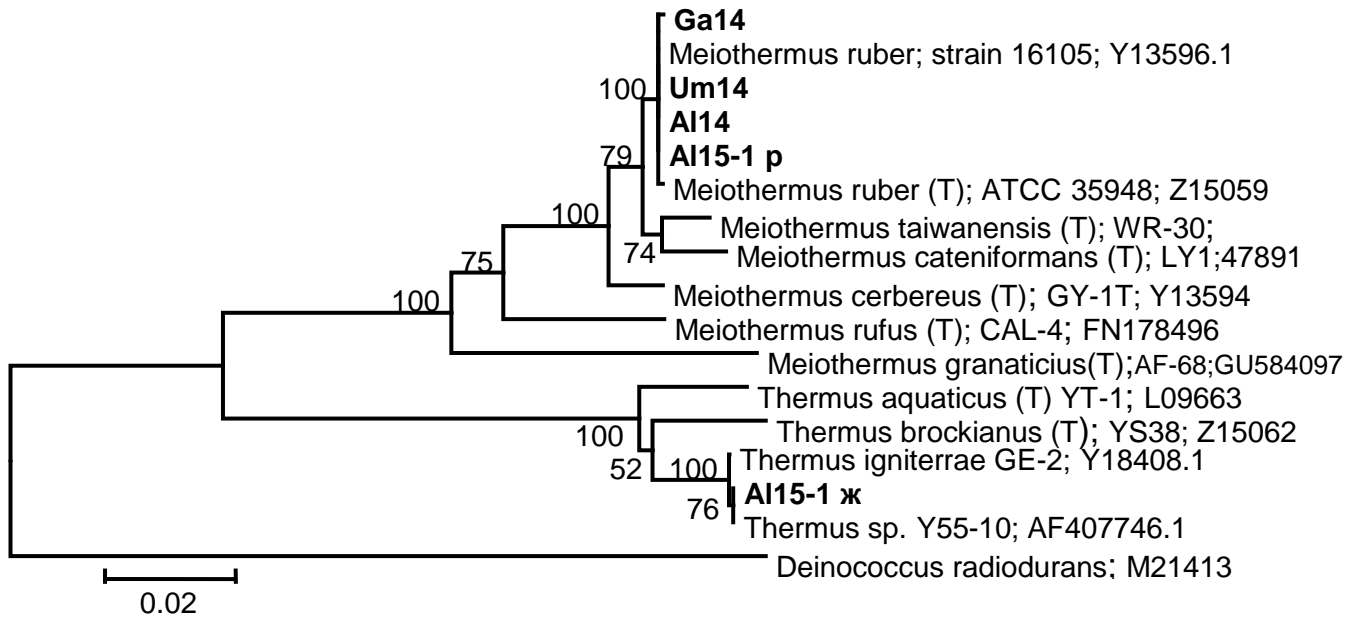


Рисунок 21. Филогенетическое положение исследуемых штаммов. Построено на основе анализа фрагмента гена 16S рРНК с использованием метода “neighbor-joining”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%)

Для штамма Al-14-1 также была определена последовательность гена, кодирующего 16S рРНК. Анализ показал, что он относится к представителям рода *Chloroflexus*. Наибольшее сходство у культуры Al-14-1 выявлено с типовым видом этого рода *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl (99 %) (рисунок 22).

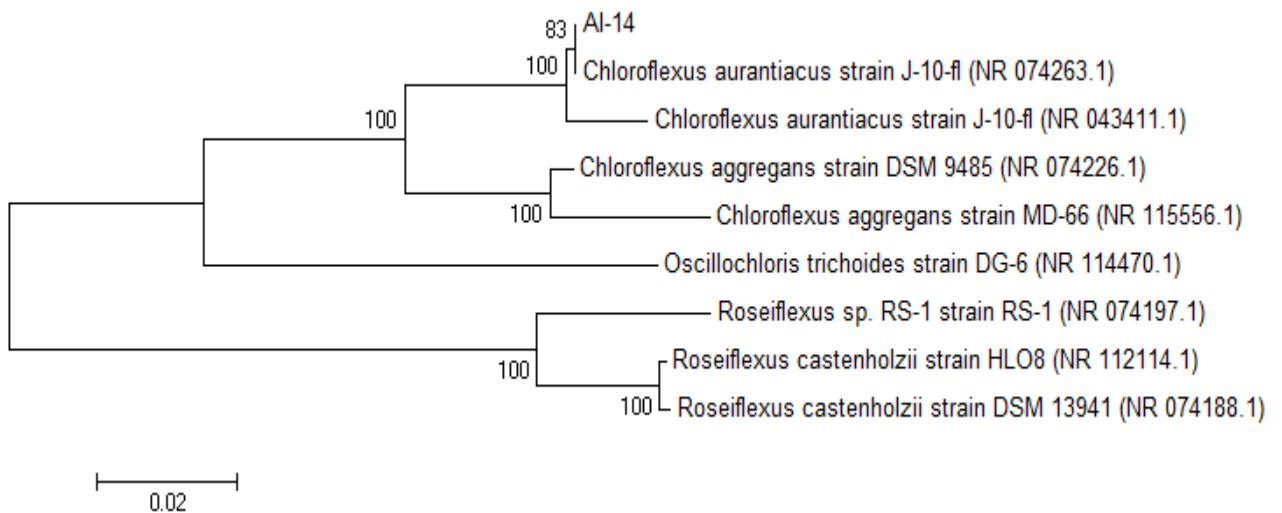


Рисунок 22. Филогенетическое дерево штаммов Al-14-1, построенное на основе анализа фрагмента гена 16S рРНК с использованием метода “neighbor-joining”

Уровень ДНК-ДНК гомологии у 4-х выделенных штаммов *Meiothermus* с типовым штаммом *Meiothermus ruber* В-1258 составил от 71 до 98% (таблица 8). Таким образом, выделенные нами штаммы могут быть отнесены к одному виду.

ДНК-ДНК гомология выделенных штаммов с типовым Таблица 8

№	Штамм	Г+Ц, (мол. %)	Гомология (%)				
			М. ruber В-1258	Al-14-1	Al-15-1 (роз.)	Ga-14	Um-14
1	<i>Meiothermus ruber</i> В-1258	61,1	—	87	83	98	71
2	Al-14-1	62,3	87	—			
3	Al-15-1 (роз.)	61,1	83		—		
4	Ga-14	63,3	98			—	
5	Um-14	63,4	71				—

3.4.3. Экофизиологические свойства выделенных культур

Исследование экофизиологии выделенных культур показало, что они способны развиваться в широком диапазоне температур (30-60 °С) (рисунок 23). Штаммы являются умеренными термофилами, аэробами или микроаэрофилами.

Температурный диапазон развития для штамма *Meiothermus* Al-14-3 составил 30-60 °С, оптимум 50 °С, диапазон рН – от 6,5 до 9,5, оптимум 8,5. Для культуры *Meiothermus* Ga-14-2 оптимальная температура роста была 45 °С, с максимальной температурой роста 60 °С, диапазон рН от 6,5 до 9,5, с оптимумом 8,0. Диапазон роста для *Meiothermus* Um-14-2 составил 35-60 °С с оптимумом 45 °С. Диапазон рН составил от 6,0 до 9,5, оптимум 8,5.

Культура *Thermus* Al-15-ж. имела хороший рост при температурах от 45-60 °С, с оптимумом 55 °С, в диапазоне рН от 6,5 до 9,5.

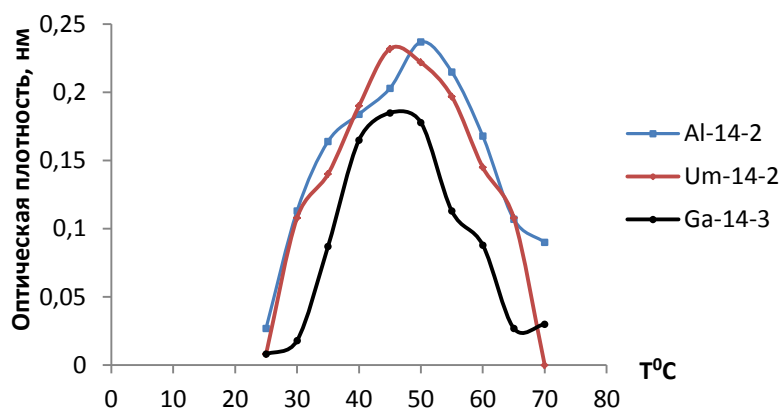


Рисунок 23. Температурный диапазон роста выделенных культур рода *Meiothermus*

В аэробных условиях штаммы использовали широкий ряд субстратов, среди сахаров культуры утилизировали глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу, целлобиозу, лактозу, D-ликсозу, L-ликсозу, D-арабинозу, L-арабинозу, крахмал, а среди спиртов – Um-14 потреблял адонитол, сорбитол, эскулин, инозитол, штамм Ga-14 утилизировал маннитол, эскулин (таблица 9). Оба штамма не использовали для роста глицерин, эритритол, дульцитол, сорбитол, адонитол, амигдалин, салицин, инулин, гликоген, ксилитол. Среди сахаров оба штаммы не использовали для роста рибозу, сорбозу, рамнозу, мальтозу, меллибиозу, сукрозу, меллицитозу, трегалозу, гентобиозу, D-ликсозу, D-тагатозу. Дифференцирующие характеристики типового штамма *Meiothermus ruber* и выделенных культур приведены в таблице 10.

	Штаммы						
	Um-14-2	Ga-14-2	Al-14-3	M.ruber DSM 1279 ^T	M.cerbereus GY-1 ^T	M.granaticus AF-68 ^T	M. silvanus DSM9946
Моносахара:							
D-арабиноза	+	+/-	+/-	Н.д.	Н.д.	-	Н.д.
L-арабиноза	+	+	+	+	-	+	-
Рибоза	-	-	-	-	Н.д.	+	Н.д.
D-ксилоза	+	+	+	+	-	+	+
Галактоза	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
фруктоза	+	+/-	+	Н.д.	+	+	+
манноза	+	+	+	Н.д.	+	+	+
рамноза	-	-	-	Н.д.	-	-	-
целлобиоза	+	+	+	+	+	+	-
мальтоза	-	-	+	+	+	+	+
лактоза	+	+	+	Н.д.	+	+	+
меллибиоза	-	-	+	Н.д.	+	Н.д.	+
сукроза	-	-	-	Н.д.	+	+	-
трегалоза	+/-	-	+/-	+	+	+	-
мелицитоза	-	+/-	+	+	Н.д.	-	Н.д.
раффиноза	+	-	-	+	-	-	-
крахмал	+	+	+	-	-	+	+
Спирты							
Глицерин	-	-	-	+	-	-	+
Эритритол	-	-	-	Н.д.	Н.д.	-	-
маннитол	-	+	+	+	-	+	+
арбутин	-	-	-	Н.д.	+	+	Н.д.
эскулин	+	+	+/-	+	+	+	Н.д.
инозитол	+	-	-	+	-	+	-

+положительный рост; - отрицательный рост; +/- слабый рост; Н.д.-нет данных

Таблица 10

Дифференцирующие свойства типового штамма *Meiothermus ruber*
и изучаемых штаммов органотрофных бактерий

Признак	<i>M.ruber</i> ^T	Al-14-3	Ga-14-2	Um-14	Al-15-1 ж.
Морфология	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки
Ширина кл., мкм	0,5-0,8	0,5-0,7	0,3-0,6	0,3-0,4	0,5-0,8
Длина кл., мкм	3-6	6-8	3-6	8-10	5-8
Подвижность	-	-	-	-	-
Цвет колоний	Темно-красный	розовый	светло-розовый	Розовый, оранжевый	желтый
T ⁰ °C диапазон	35-68	30-60	30-60	35-60	55-70
Оптимум T ⁰ °C	60	50	45	45	65
pH роста	6,5-7,5	6,5-9,5	6,5-9,5	6,5-9,5	7,5-8,5
Оптимум pH	Н.д.	8,5	8,0	8,5	8,0
Восст-ние NO ₃ ⁻ до NO ₂ ⁻	-	-	-	+	Н.д.
Субстраты:					
Ацетат	+	+	+	+	+
Пируват	+	+	+	+	Н.д.
Соедон	Н.д.	+	-	+	-
ДНК, Г+Ц, %	61	62,3	63,3	63,4	66,1
Ближайший гомолог, % сходства	-	<i>Meiothermus ruber</i> st.16105 100	<i>Meiothermus ruber</i> st.16105, <i>M.cerbereus</i> st. GI-1, <i>M. cateniformans</i> st. LI-1 99	<i>Meiothermus ruber</i> st. 16105 100	<i>Thermus igniterrae</i> GE-2 Y18408.1 99

+положительный рост; - отрицательный рост; +/- слабый рост; Н.д.-нет данных

3.4.4. Пигменты клеток

Нами были изучены спектральные характеристики ацетон-метанольных экстрактов клеток исследуемых штаммов. Основные максимумы поглощения зарегистрированы в двух диапазонах длин волн (479-483 нм, 504-507 нм), соответствующие поглощению β -каротина и зеаксантина - каротиноидов, которые, видимо, выполняют защитную роль всего микробного сообщества от супероксидных радикалов и окислительного стресса (рисунок 24). В качестве неферментативных антиоксидантов они могут быть вовлечены в механизм резистентности клеточных клеток к неблагоприятным факторам окружающей среды, в частности к воздействию активных форм кислорода, и выполнять роль дополнительных фотосинтезирующих пигментов.

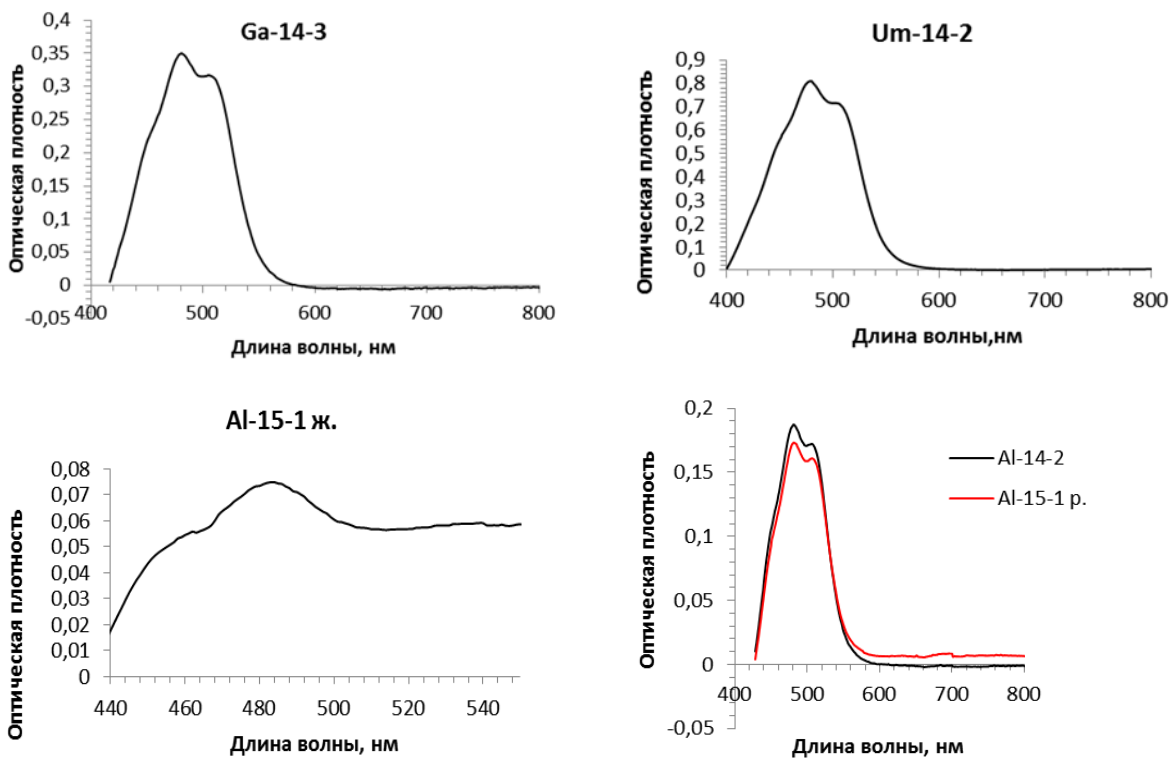


Рисунок 24. Спектр поглощения пигментов экстрактов клеток штаммов *Meiothermus* и *Thermus*

3.4.5. Определение ключевого фермента RuBisCO цикла Кальвина

Микроорганизмы группы *Meiothermus-Thermus* широко распространены в географически удаленных гидротермах, однако их роль в составе микробных

сообществах практически не исследована. Недавно установлено, что некоторые виды этого рода способны окислять тиосульфат при наличии органических субстратов (Chung et al., 1997; Намсараев, 2003). В то же время появилась информация, что в геноме некоторых видов родов *Meiothermus* и *Thermus* обнаружены гены ответственные за синтез фермента рибулозо-бифосфат-карбоксилаза (RuBisCO), ключевого фермента фиксации CO₂. Несколько лет назад ген, кодирующий большую субъединицу RuBisCO формы I (*cbbL*), был выбран в качестве функционального маркера для исследования экологии микроорганизмов, фиксирующих CO₂ (Videmsek et al., 2009).

Сотрудниками Центра Биоинженерии ФИЦ Биотехнологии были сконструированы праймеры для подтверждения присутствия большой «красной» субъединицы гена - *cbbL*. Полученные результаты подтверждают наличие этого гена в бактериях рода *Meiothermus* и *Thermus*. Эти гены были обнаружены в геноме выделенных нами штаммов Al-14-2, Al-15-1р, Al-15-1ж, Ga-14, Um-14.

Зарегистрировано, что все штаммы *Meiothermus*, несмотря на фенотипические отличия (цвет культуры, субстратная специфичность), по составу аминокислот гена *cbbL* имеют 100 % идентичность. Однако они значительно удалены от ближайшего вида *Meiothermus rufus* (рисунок 25). *Meiothermus ruber* вообще отсутствует на построенной дендрограмме, несмотря на то, что у штаммов *Meiothermus ruber* DSM 1279 и *Meiothermus silvanus* DSM 9946 установлено наличие генов RuBisCO (Muller et al., 2016). Таким образом, выделенные нами штаммы, по данным анализа гена 16S рРНК идентичные *Meiothermus ruber*, содержат ген *cbbL* и, таким образом, потенциально способны к автотрофной фиксации CO₂.

Аналогичный тип CbbI штамма *Thermus* (Al-15-1ж.) имеет заметные отличия в аминокислотной последовательности от представителей рода *Meiothermus*. Выделенный нами штамм кластеризуется с *Thermus igniterrae* и другими исследованными в этом отношении видами рода *Thermus* (рисунок 25).

Отметим, что гены *cbbL* группы *Thermus* – *Meiothermus* формируют обособленный кластер от других организмов, осуществляющих фиксацию углекислоты через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама. Этот факт указывает на

независимую эволюционную тенденцию распространения данного цикла фиксации углекислоты среди бактерий.

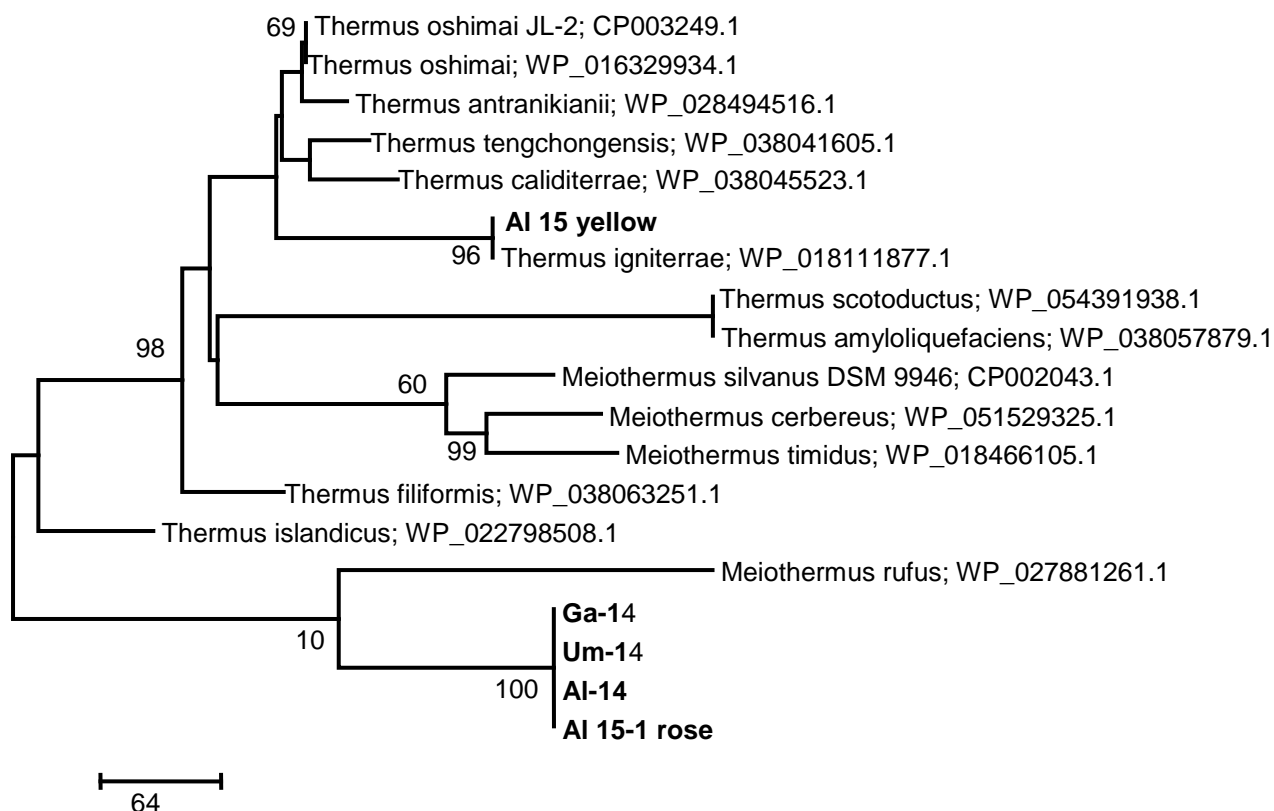


Рисунок 25. Филогенетическое дерево изучаемых штаммов и представителей рода *Meiothermus* и *Thermus*. Построено на основе анализа аминокислотных последовательностей фрагмента гена *cbbL* с использованием метода “neighbor-joining”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap” анализа

3.4.6. Исследование окислительной способности культур

У двух штаммов, отнесенных к роду *Meiothermus* и *Thermus* была исследована способность окислять тиосульфат (рисунок 26). Установлено, что штаммы способны использовать тиосульфат как источник энергии в аэробном метаболизме с образованием единственного продукта – сульфата. Способность к окислению тиосульфата, а также восстановлению элементной серы и ряда металлов была обнаружена у представителей рода *Thermus*, кроме *Thermus oshimae* (Kieft et al, 1999; Skirnisdottir et al., 2001). Аналогичные данные были получены ранее Намсараевым З. Б. (Намсараев, 2003). Таким образом, установлено вероятное участие представителей группы *Meiothermus-Thermus* в окислительной фазе цикла серы в микробных матах термальных источников.

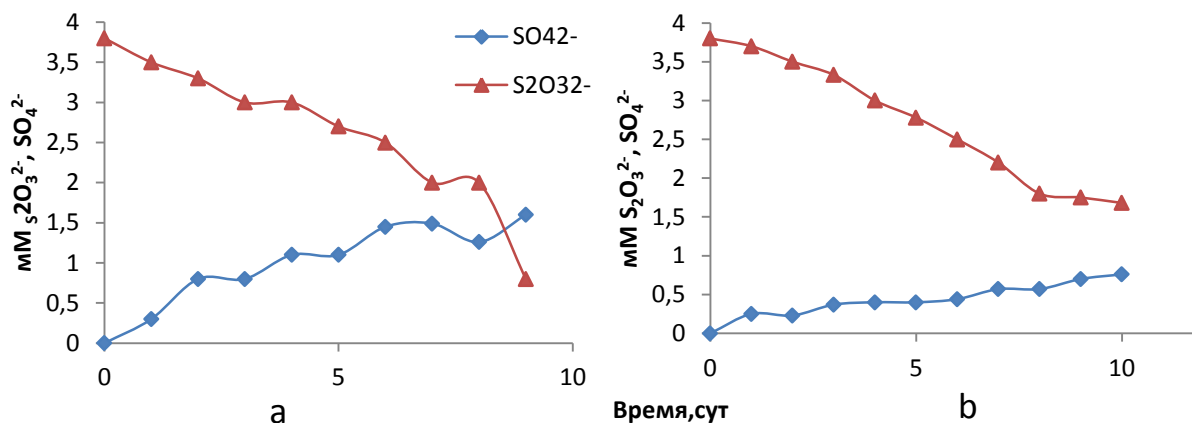


Рисунок 26. Образование сульфата SO_4^{2-} штаммами Al-14 (а) и Um-14 (b) из тиосульфата

Таким образом, можно предположить, что термофильные бактерии родов *Meiothermus* и *Thermus* играют важную роль, как в круговороте серы, так и углерода.

3.4.7. Протеолитическая активность выделенных культур

Внеклеточная протеолитическая активность органотрофных бактерий

Термостабильные ферменты, в частности субтилизин-подобные сериновые пептидазы, обладающие кератинолитической активностью, обнаружены у бактерий *Deinococcus-Thermus* (*Deinococcus* spp., *Thermus* spp., *Meiothermus* spp.) (Matsui et al., 2009; Kornilłowicz-Kowalska, Bohacz, 2011; Kuo et al., 2012; Wu et al., 2017).

Нами проведено изучение секреции внеклеточных пептидаз в зависимости от источника углерода (пептон, глюкоза) и времени культивирования (от 12 до 168 ч) на внеклеточную протеолитическую активность.

В качестве источников секретируемых внеклеточных пептидаз использовали культуральные жидкости 4 штаммов: Al-14-3, Ga-14-2, Um-14-2 и Al-15-1ж.

Установлено, что максимальная активность по азоказеину у всех изучаемых культур проявляется на среде с пептоном на 120-144 ч культивирования.

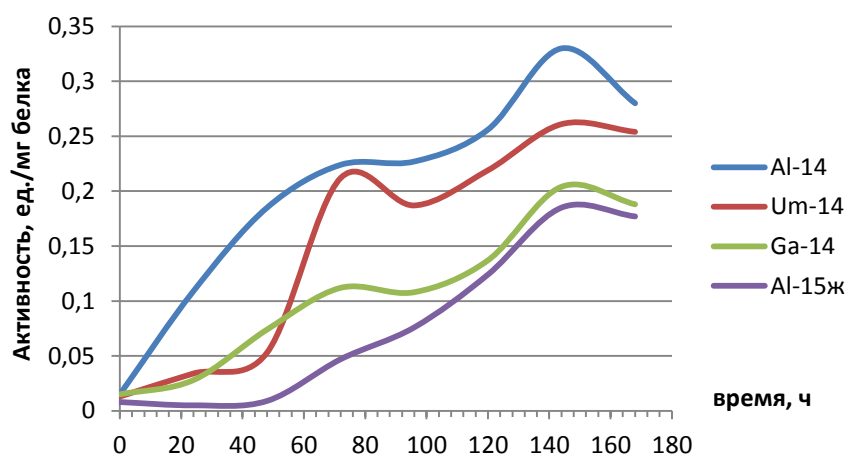


Рисунок 27. Общая пептидазная активность культур по азоказеину

При росте на глюкозе значения пептидазной активности варьировали от 0,01 до 0,28 ед.

Изучение субстратной специфичности органотрофных бактерий

Нами были проведены эксперименты по изучению активности ферментов изучаемых культур в отношении субстратов, специфичных для субтилизинов (GlpAALpNA), трипсина (ВАРА) и аминопептидаз - LpNA (L-лейцил-n-нитроанилид), FpNA (L-фенилаланил-n-нитроанилид).

Максимальная активность для трипсин-подобных пептидаз по субстрату ВАРА обнаружена на 48 ч культивирования у штаммов бактерий Um-14-2 и Al-14-3, выращенных на пептоне, а при росте на глюкозе наибольшая активность выявлена у штаммов Um-14-2 и Ga-14-2 на 120 и 48 ч роста (рисунок 28).

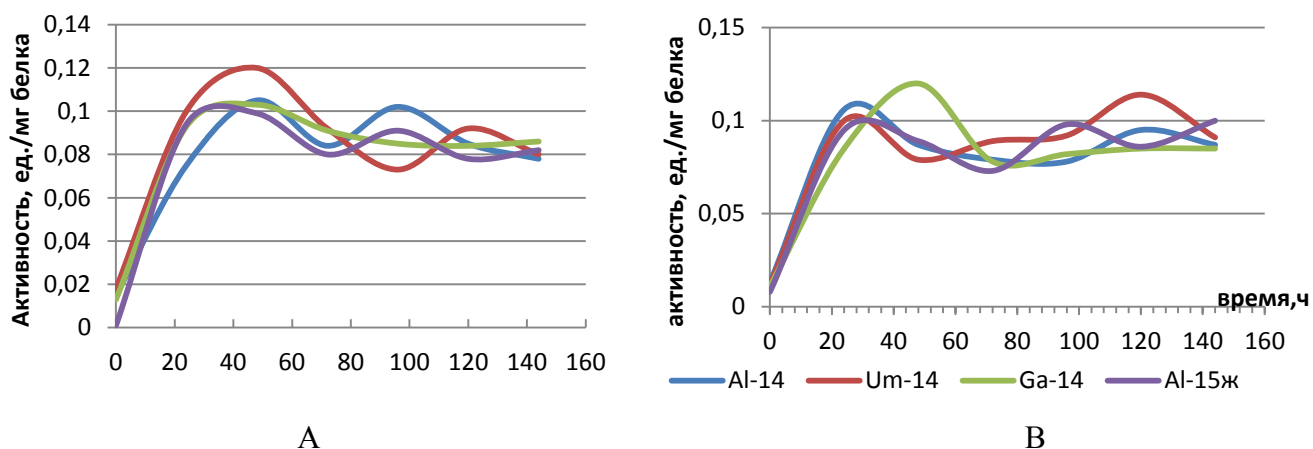


Рисунок 28 Активность пептидаз по субстрату ВАРА:
А- рост на пептоне; В- рост на глюкозе

Изучение пептидазной активности на специфичном для субтилизин-подобных пептидаз субстрате – GIpAALpNa показало наличие у штаммов Al-14-3 и Ga-14-2 наиболее высокой внеклеточной протеолитической активности, как при росте на пептоне, так и на глюкозе, но на разных стадиях роста культур (рисунок 29). Показано, что кроме активности по субстрату GIpAALpNa, изучаемые культуры гидролизуют субстраты аминопептидаз – LpNA, FpNA. Максимум активности по субстрату LpNA были определены на 24 ч культивирования для штамма Ga-14-2. Значения активности штаммов Al-14-3, Um-14-2, Al-15-1ж варьировали от 0,013 до 0,255 ед. (рисунок 30).

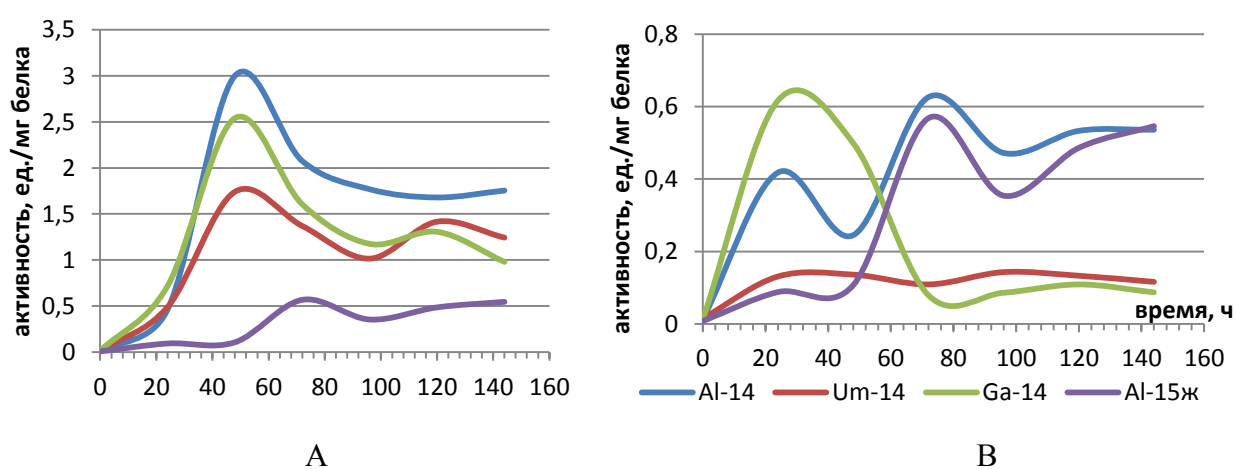


Рисунок 29. Активность пептидаз по субстрату GIpAALpNa:
А- рост на пептоне; В- рост на глюкозе

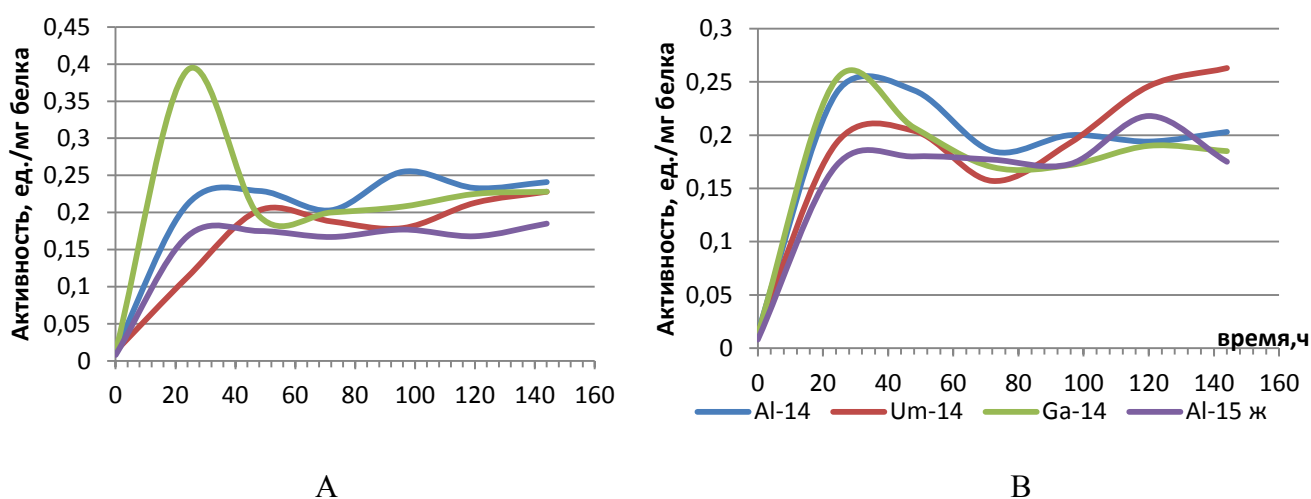


Рисунок 30. Активность пептидаз по субстрату LpNA:
А -рост на пептоне; В- рост на глюкозе

Изучение физико-химических свойств ферментов

Так как исследуемые культуры бактерий способны расти в экстремальных условиях, представляло интерес выяснить, насколько адаптированы к экстремальным условиям секретируемые ими ферменты. С этой целью было изучено влияние температуры и pH на активность и стабильность внеклеточных пептидаз.

Определение температурного оптимума и стабильности пептидаз

Определение температурного оптимума и стабильности ферментов проведены для диапазона 20-80 °С. Практически у всех культур исследуемые пептидазы стабильны до 80 °С.

Внеклеточные пептидазы штаммов Al-14 и Ga-14 имели оптимум активности при 50 °С (рисунок 31, 32), тогда как культуры Al-15-1ж. и Um-14 при 40 °С.

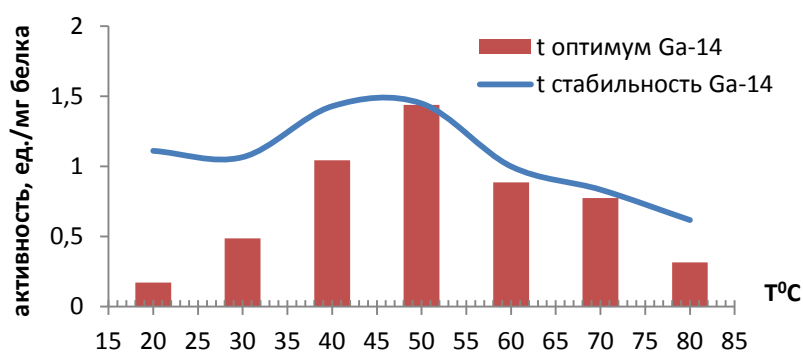


Рисунок 31. Температурные оптимум и стабильность субтилизин-подобной пептидазы GlpAALpNa штамма Ga-14-2

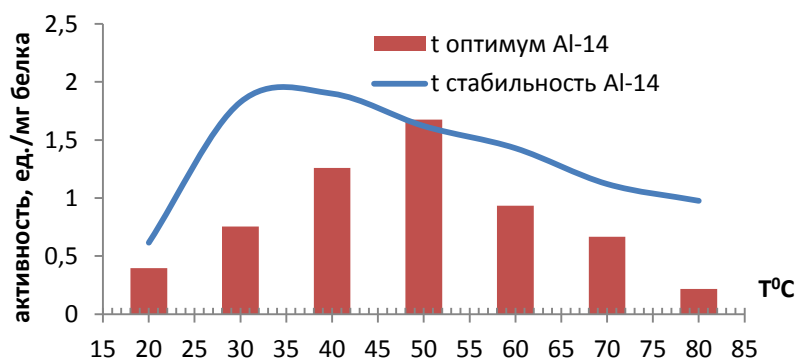


Рисунок 32. Температурные оптимум и стабильность субтилизин-подобной пептидазы GlpAALpNa штамма Al-14-3

Определение pH оптимума и стабильности пептидаз

Исследование pH оптимума и стабильности проведены в диапазоне pH от 1,98 до 12 для культур - продуцентов субтилизин-подобных пептидаз. Исследуемые ферменты стабильны в интервале pH 4,0 - 10,4. Ферменты штаммов Um-14 и Ga-14 активны в относительно узком щелочном диапазоне pH: активность, превышающая 50%, была выявлена на участке pH от 9,91 до 12 с максимумом при pH 11,8 (рисунок 33). Пептидаза штамма Al-14 сохраняла стабильность в диапазоне pH от 6,82 до 9,9 с оптимумом активности при pH 11,8 (рисунок 34).

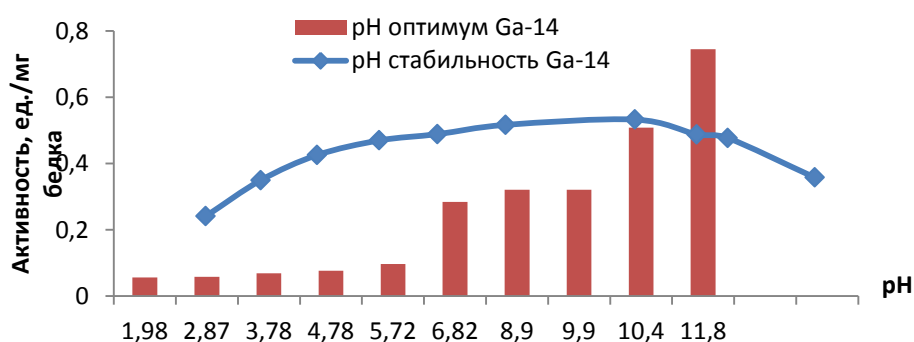


Рисунок 33. pH оптимум и стабильность субтилизин-подобной пептидазы GlpAALpNa штамма Ga-14-2

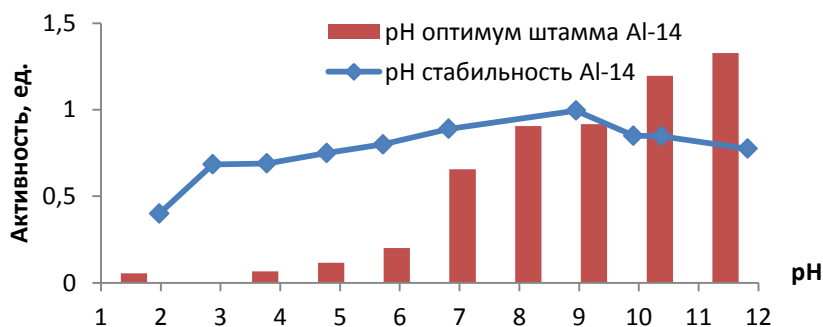


Рисунок 34. pH оптимум и стабильность субтилизин-подобной пептидазы GlpAALpNa штамма Al-14-3

Исследование pH оптимума и стабильности аминокпептидаз исследуемых культур показал более широкий диапазон стабильности фермента. Так, пептидазы штамма Um-14 проявляли максимальную активность при pH 10,4 и были стабильны в интервале pH от 5,0 до 8,9 (рисунок 35). Пептидазы культуры Ga-14

сохраняли стабильность в интервале рН от 4,0 до 10,4 с оптимумом активности при 11,8 (рисунок 33).

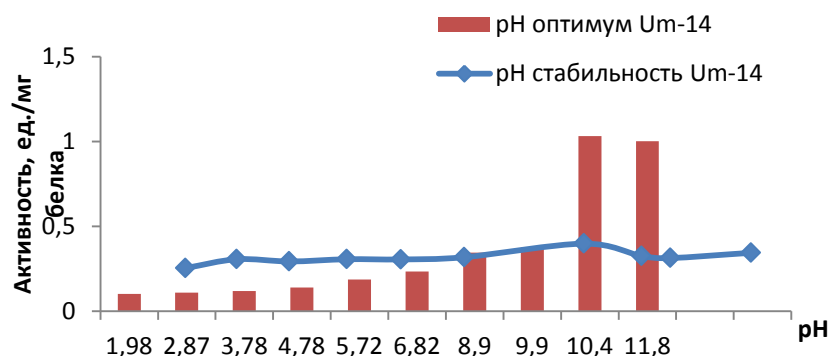


Рисунок 35. pH оптимум и стабильность аминокатазы LpNA штамма Um-14-2

Таким образом, наиболее высокая внеклеточная протеолитическая активность была зарегистрирована у штаммов Al-14-3 и Ga-14-2 на специфичном для субтилизин-подобных пептидаз субстрате – GlpAALpNa при росте на пептоне.

3.5. Минералообразование в микробных матах термальных источников

Филогенетический анализ 16S rРНК, выделенной из кремниевых чешуек, показал, что термофильные бактерии рода *Thermus* и *Hydrogenobacter* являются доминирующими организмами в кремнистых отложениях природных микробных сообществ. Было показано, что представители *Thermus* оказали большое влияние на осаждение кремнистых отложений пересыщенного относительно растворимости аморфного кремнезема в экстремальных условиях (Inagaki et al., 2003). Культура *Thermus sp.* осаждала кремнезем во время экспоненциальной фазы роста, при этом в клетках синтезировался белок (Sip – silica induced protein), появлявшийся только в присутствии коллоидного кремния. В связи с этим было изучено минералообразование в микробных матах изучаемых источников.

С помощью рентгенофазового анализа (РФА) и сканирующей электронной микроскопии определены минералы, осаждающиеся на выходе горячих источников. Среди минералов выявлены карбонатные (кальцит, арагонит) и оксиды кремния (кристобаллит, кварц, опал).

Анализ дифрактограммы показал, что в микробном сообществе гидротермы Алла осаждался кальцит CaCO_3 (рисунок 36). Кристаллы кальцита либо хорошо ограненные: кубические или призматические, либо эллипсоидальной формы (рисунок 37).

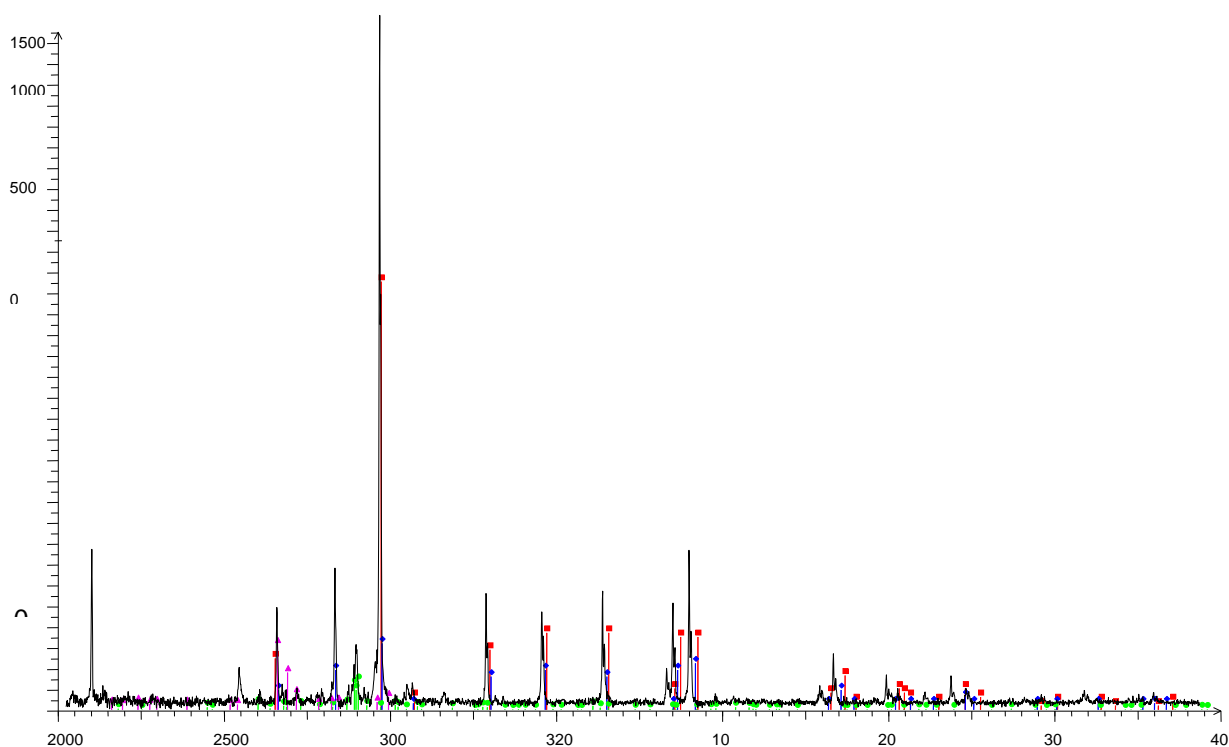


Рисунок 36. Дифрактограмма образца мата источника Алла

■ Кальцит, *syn* - CaCO_3 ■ Анортит - $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$

◆ Кальцит $\beta\text{-CaCO}_3$ ▲ Натрий-алюминиевый силикат - $\text{Na}_{1.82}\text{Al}_2\text{Si}_5\text{O}_{10}7.91$

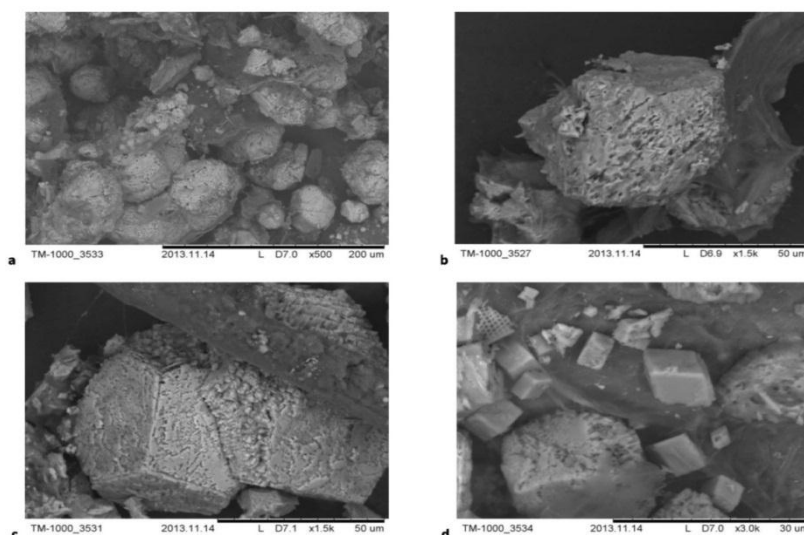


Рисунок 37. Минералы кальцита, формирующиеся в микробном мате источника Алла
 a – эллипсоидальные кристаллы кальцита; b – минералы неправильной формы; c, d –
 ограненные кристаллы; Фото: сканирующий микроскоп, шкала x30-200 мкм

В микробном мате источника Гарга были идентифицированы отложения кальцита и кремнистые отложения (опал). Кристаллы кальцита имели овальную форму с отпечатками нитей цианобактерий (рисунок 38).

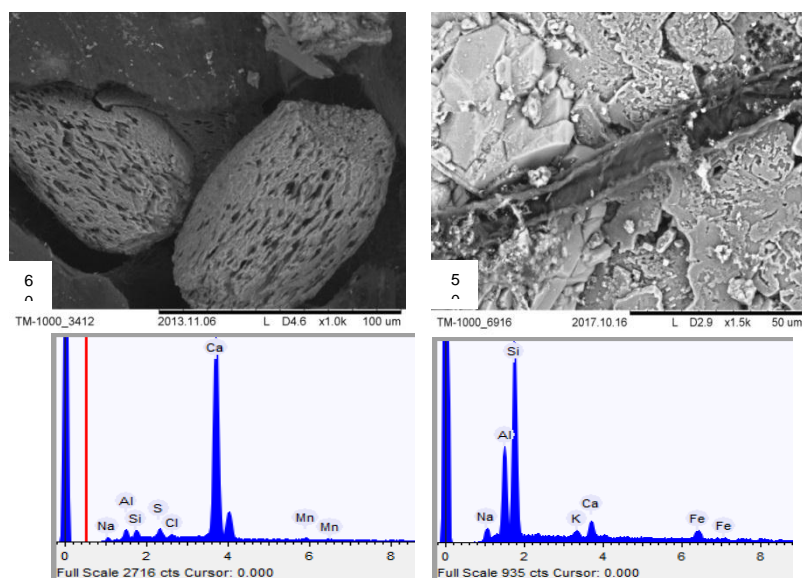


Рисунок 38. Отложения кальцита и опала в цианобактериальном мате гидротермы Гарга
 а – зерна кальцита с прорезями от нитей цианобактерий; б – плотный слой, состоящий из опала (аморфного кремнезема) и их химический состав; фото: сканирующий микроскоп

Главными условиями для образования карбоната кальция являются активная деятельность цианобактерий, которые в процессе своей жизнедеятельности могут повышать рН среды, и поступление необходимого количества ионов Ca^{2+} . Лазарева и др. (2010) считают, что содержание кальция в микробных сообществах Байкальской рифтовой зоны напрямую зависит от образования кальцита, формирование которого в микробном мате происходит в том случае, когда в среде содержание кальция превышает 10 мг/л. Воды Умхейского и Сеюйского источников содержат не более 8 мг/л Ca^{2+} , а Гаргинского и Аллинского – 23 и 31 мг/л соответственно. Наилучшие условия для этого создаются под слоем активно растущих цианобактерий в связи с появлением локальных зон с высоким рН и подтоком раствора, несущего Ca^{2+} и CO_3^- снизу (Намсараев и др., 2011). Таким образом, за счет метаболической активности микроорганизмов создаются микросреды, в которых происходит осаждению кальцита.

Отличительной особенностью азотных терм является присутствие кремнекислоты. В исследованных источниках общее количество кремния достигало значений 120 мг/л (Алла). Более низкие концентрации кремния зафиксированы в источниках Гарга (69 мг/л) и Сеюя (64 мг/л), в воде Умхей содержалось 86 мг/л кремния. В микробных матах гидротерм БРЗ встречены кремнистые образования биогенного происхождения – кремнистые чехлы на нитях цианобактерий и створки диатомовых водорослей. Отложение кремнезема наблюдается в микробном мате гидротерм Гарга, Сеюя, Умхэй. Происходит окремнение чехлов цианобактерий, образуются плотные сплошные слои кремнезема (гейзерит) (рисунок 39).

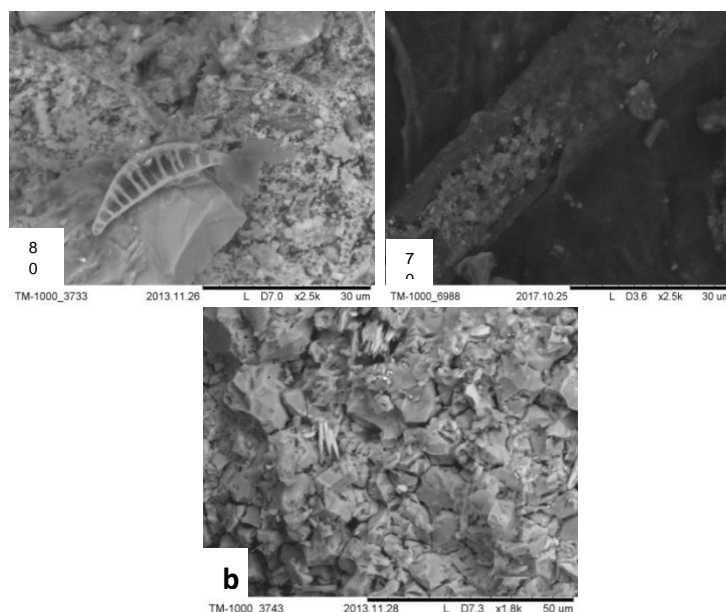


Рисунок 39. Окремнение в цианобактериальном мате гидротерм
а, с – Сеюя; b – Умхэй; Фото: сканирующий микроскоп, шкала x30-50 мкм

По данным РФА в гидротермах Умхэй и Сеюя, воды которых выходят в северной части Баргузинской впадины и образуют озеро, диоксид кремния осаждался в различных модификациях - кварц, β -кварц, кристобаллит (SiO_2) (рисунок 40). В микробном сообществе сероводородных источников Умхэй и Кучигер отмечается образование сульфида железа.

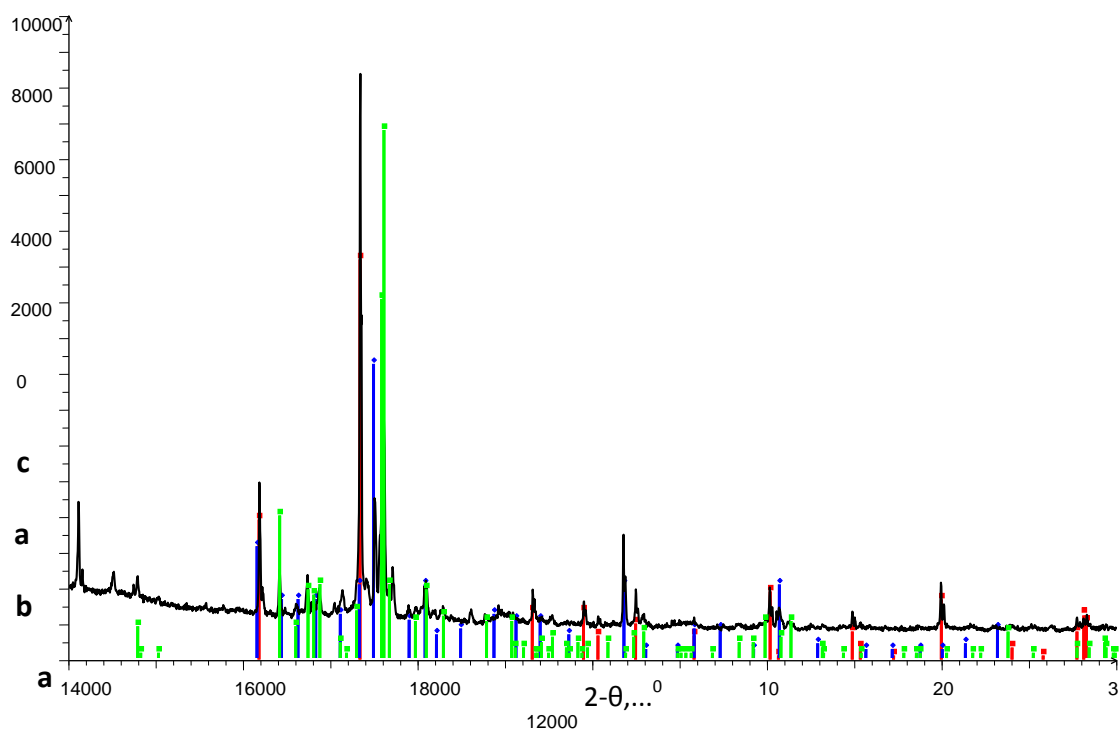


Рисунок 40. Дифрактограмма образца мата гидротермы Умхэй

■ Альбит, состава $(\text{Na,Ca})\text{Al}(\text{Si,Al})_3\text{O}_8$ ■ Кварц $\alpha\text{-SiO}_2$ ◆ Микроклин KAlSi_3O_8

Наличие сероводорода (до 31 мг/л) в источниках обусловлено деятельностью, в том числе сульфатредуцирующих бактерий, которые восстанавливают сульфаты, используя в качестве энергетического материала органическое вещество.

В процессе микроскопических исследований были обнаружены фрамбоиды пирита в толще микробного мата или на поверхности. Как видно, фрамбоиды пирита «растут» на поверхности обломков панцирей диатомовых водорослей, а также встречены россыпи отдельных кристаллитов (рисунок 41). Появление подобных фрамбоидов пирита в земных условиях происходит при трансформации органического вещества в бескислородных условиях в присутствии сульфатредуцирующих бактерий. Примером доказательства биогенного происхождения фрамбоидов пирита является их присутствие в живых альгобактериальных матах горячих источников о-ва Кунашир (Федорова и др., 1988).

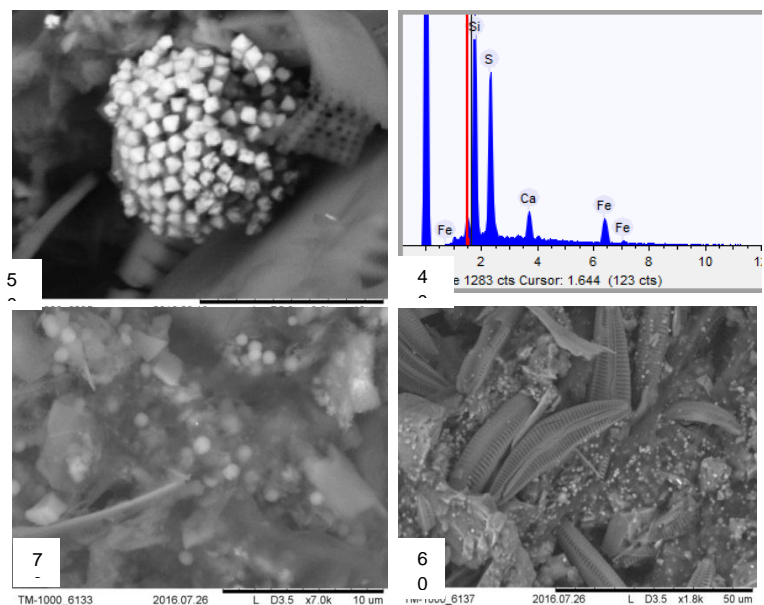


Рисунок 41. Отложения пирита в гидротермах: а – фрамбоид пирита в микробном мате источника Кучигер; б – его химический состав; в, д – россыпи отдельных кристаллитов пирита в микробном мате Умхэя. Фото: сканирующий микроскоп, шкала x10-50 мкм

Изучение минералов микробных матов термальных источников Байкальской рифтовой зоны показало, что при участии микробного сообщества образуется кальцит, аморфный кремнезем и опал. Цианобактерии непосредственно участвуют в осаждении кальцита за счет создания микрозон с высоким рН, и образования гликокаликса, поглощающего ионы Ca^{2+} . Бактериальные экзополисахариды могут служить матрицей для нуклеация кремния из раствора. В сероводородных источниках Умхэй и Кучигер выявлены отложения сульфида железа (фрамбоидов пирита), образовавшихся в результате метаболической деятельности микроорганизмов.

3.6. Исследование углеводного состава микробного сообщества

С применением метода ВЭЖХ был исследован моносахаридный состав биомассы микробных матов, дополнительно было установлено содержание маннита. В составе моносахаридов было выявлено присутствие доминирующих соединений – фукозы и глюкозы, и минорных - галактозы, маннозы и ксилозы (таблица 11).

Углеводный состав биомассы микробных матов,
мг/г от массы возд.-сухого сырья

Образец	Маннит	UA [*]	Моносахариды в гидролизате						
			Ara	Gal	Glc	Fuc	Man	Rha	Xyl
Сея(В)	6.72	9.27	<0.01	2.02	2.45	0.39	4.83	<0.01	1.42
Сея(Н)	3.40	15.85	<0.01	2.66	2.00	0.74	6.45	<0.01	1.63
Гарга(В)	7.25	1.15	<0.01	12.98	11.67	<0.01	9.45	<0.01	2.12
Гарга(Н)	2.59	2.08	<0.01	14.24	8.81	1.73	18.03	<0.01	5.18
Алла(В)	5.41	6.21	<0.01	4.47	5.09	0.23	5.89	<0.01	1.18
Алла(Н)	2.72	10.63	<0.01	14.96	32.04	0.30	25.22	<0.01	3.06
Умхэй	1.93	12.54	<0.01	56.56	45.96	2.40	78.86	<0.01	10.53

*UA – уроновые кислоты; (В)-верхний слой; (Н)-нижний слой

Для верхних и нижних слоев микробных матов выявлено различное распределение отдельных углеводных классов. Наибольшая концентрация маннита обнаружена в верхних слоях (5.41–7.25 мг/г), наименьшая – в нижних слоях (2.59–3.40 мг/г). Напротив, максимальная концентрация уроновых кислот в биомассе была установлена в нижних слоях (2.08–15.85 мг/г). В составе нейтральных моносахаридов к числу основных были отнесены галактоза, глюкоза, фукоза, манноза и ксилоза; в следовых количествах присутствовали арабиноза и рамноза. Преобладание маннозы в составе нейтральных моносахаридов было отмечено для большинства изученных образцов, кроме образцов Гарга(В), в котором доминировала галактоза, и Алла (Н) с глюкозой в качестве основного моносахарида. В составе нейтральных моносахаридов к числу основных были отнесены галактоза, глюкоза, манноза; в следовых количествах присутствовали арабиноза и рамноза. Наибольшее количество моносахаров содержалось в микробных матах гидротерм Умхэй и Алла (Н). Преобладание галактозы в составе нейтральных моносахаридов было отмечено для большинства изученных образцов

микробных матов. Известно, что галактозамин входит в состав пептидогликана цианобактерий (Adhikary et al., 1986). Выявленные особенности накопления отдельных углеводных компонентов являются следствием того, что таксономические спектры бактерий, образующих микробный мат, отличаются для различных источников.

Исследован моносахаридный состав биомассы 3 выделенных чистых культур, которые являются представителями рода *Meiothermus*. В составе моносахаридов было выявлено присутствие доминирующих соединений – маннозы и глюкозы, и минорных – галактозы, фукозы и ксилозы (таблица 12). Содержание маннозы и глюкозы в биомассе культуры Al-15 ж. было больше, чем в культуре Al-15 роз. в 4-5 раз. Высокое содержание глюкозы, видимо, связано с тем, что данный моносахарид является важным структурным и метаболическим компонентом клетки (Гусев, Никитина, 1979; Елинов, 1984).

Таблица 12

Углеводный (моносахариды) состав в биомассе культур
(в гидролизате), мг/г возд.-сухого образца

Культура	Манноза	Глюкоза	Галактоза	Ксилоза	Фукоза
Al-15 ж.	13,28	23,17	1,06	<1.0	<1.0
Al-15 роз.	3,98	4,49	<1.0	<1.0	<1.0
Ga-14	7,00	7,59	<1.0	<1.0	<1.0

На примере трех образцов микробных матов из гидротерм БРЗ было показано присутствие четырех полисахаридов (таблица 13). Наибольшее содержание маннита – 5,42 мг/г, фукоидана – 15,37 мг/г отмечено в микробном мате из источника Алла (Al-15), альгиновой кислоты – 12,54 мг/г, ламинарана – 11,51 мг/г в источнике Умхей (Um-15-2). Следует отметить, что доминирующим полисахаридом микробного мата из гидротермы Гарга (Ga-13) является ламинаран, из гидротермы Умхей – альгиновая кислота, из гидротермы Аллла – фукоидан. Подобное «неравномерное» распределение полисахаридных групп в различных образцах микробных матов, вероятно, обусловлено отличиями в

экологических условиях и таксономическим составе присутствующих прокариот. Известно, что маннит и ламинараны в водорослях являются резервными компонентами, в то время как альгиновые кислоты и фукоинданы определяются как компоненты клеточных стенок и межклеточного пространства.

Таблица 13

Содержание экзополисахаридов в образцах
микробных матов, мг/г (\pm SD)

Образец	Маннит	Фукоидан	Альгиновая кислота	Ламинаран
Ga-13 (нижний)	2.61 \pm 0.08	5.38 \pm 0.14	2.08 \pm 0.05	7.16 \pm 0.22
Um-15-2	1.86 \pm 0.06	6.21 \pm 0.18	12.54 \pm 0.37	11.51 \pm 0.41
Al-15 (скалы)	5.42 \pm 0.15	15.37 \pm 0.40	6.21 \pm 0.17	9.09 \pm 0.29

Для образца микробного мата Умхей (Um-15-2) проведено фракционирование углеводного комплекса микробного мата по методу Усовой с соавт (Usova et al., 1995). В результате, предварительно было показано, что доминирующей группой полисахаридов микробного мата является альгиновая кислота (рисунок 42).

Для выделения полисахаридов был использован образец микробного мата из гидротермы Сеюя (48 °С, рН 9,5). Микробный мат обладал достаточной биомассой, в результате экстракции и концентрирования была получена фракция водорастворимых полисахаридов SeN-WPS с выходом 2,35% от массы воздушно-сухого сырья. В составе SeN-WPS присутствовало не менее семи полимеров с молекулярными массами (м.м.) 122-1700 кДа.

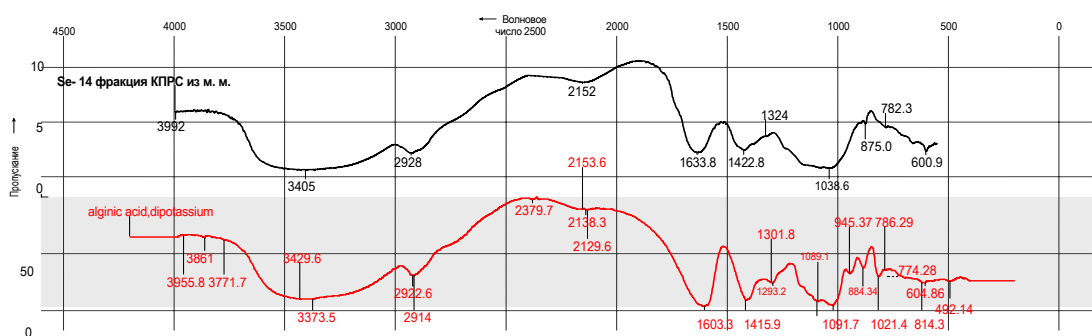


Рисунок 42. ИК-спектр стандартного образца альгиновой кислоты (2) и суммарной фракции КПРС из образца Se-14 (1)

Доминирующим компонентом является полимер SeN-WPS-07 с м.м. 122 кДа, содержание которого в смеси составило 64,6%. На долю минорных полисахаридов пришлось не более 35,3 %. Полимер SeN-WPS-07 был выделен с применением препаративной ГПХ с выходом 44.5% от массы SeN-WPS. Содержание уроновых кислот в SeN-WPS-07 составило 14.67%, дезоксисахаров – 1.24%, белка – 5.92%, присутствие остатков аminosахаров и сульфата не обнаружено. Согласно данным ВЭЖХ в составе нейтральных моносахаридов в SeN-WPS-07 выявлены фукоза, рамноза, арабиноза, манноза, глюкоза, галактоза в соотношении 1:2.2:3.4:8.1:13.0:14.0. ИК-спектр SeN-WPS-07 содержал полосы, вызванные колебаниями свободных карбоксильных групп (1629 см⁻¹) и белковых компонентов (1549 см⁻¹). Таким образом, полимер SeN-WPS-07 представлял собой гетерополисахарид с высоким содержанием галактозы, глюкозы, маннозы и уроновых кислот.

В ходе биологических экспериментов полисахарид SeN-WPS-07 был изучен на наличие следующих видов активности: антиоксидантная; Fe²⁺-хелатирующая; мембраностабилизирующая; антиатерогенная; противовоспалительная. В качестве образца сравнения использовали альгиновую кислоту (SigmaAldrich). В результате проведенных исследований было установлено, что, несмотря на слабовыраженные антиоксидантные свойства у SeN-WPS-07 (IC₅₀ >100 мкг/мл), его растворы обладали способностью к связыванию ионов Fe²⁺, а также мембраностабилизирующим, антиатерогенным и противовоспалительным действием, сравнимым с активностью альгиновой кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ состава доминирующих таксонов выявил существенные различия микробного сообщества БРЗ и пространственную стратификацию сообщества в зависимости от физико-химических условий.

По результатам высокопроизводительного секвенирования в сообществе микробных матов, развивающиеся при температуре 53 - 65 °С преобладали филогенетически разнообразные группы *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*. Бактериальное сообщество станций гидротерм с мезофильными температурами (34 – 43 °С) характеризуется появлением и увеличением количества гетеротрофных бактерий филумов *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Planctomycetes*. При температуре источников 34-51 °С доминировали филумы *Proteobacteria* и *Cyanobacteria* и не выявлены термофильные представители таких филумов как *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Deinococcus-Thermus*, характерные для сообщества высокотемпературных матов.

Термофильные органотрофные бактерии филума *Deinococcus-Thermus* широко распространены в гидротермах с температурой от 42 до 65 °С, их доля в сообществе составляла от 1,5 до 45 %. Бактерии группы *Meiothermus-Thermus*, осуществляющие аэробную деструкцию органического вещества, были характерны как для сообщества поверхностной воды (до 49,6 % от всех последовательностей), так и мата (до 10,5 %). В чистую культуру выделены и охарактеризованы органотрофные бактерии группы *Meiothermus-Thermus*, четыре из них являются штаммами вида *Meiothermus ruber*, один отнесен к *Thermus igniterrae*.

Впервые в геноме выделенных культур органотрофных бактерий родов *Meiothermus* и *Thermus* обнаружены гены, кодирующие большую субъединицу фермента рибулозо-бифосфат-карбоксилазы (RuBisCO) формы I (*cbbL*), ключевого фермента фиксации CO₂ цикла Кальвина-Бенсона-Бассама. Штаммы способны использовать тиосульфат как источник энергии в аэробном метаболизме с образованием сульфата. Таким образом, установлено вероятное участие

представителей группы *Meiothermus-Thermus* в окислительной фазе цикла серы и углерода в микробных матах гидротерм БРЗ.

Изучение минералов микробных матов термальных источников Байкальской рифтовой зоны показало, что при участии микробного сообщества образуется кальцит, аморфный кремнезем и опал. Микроорганизмы участвуют в процессах осаждения минералов либо непосредственно, либо косвенным путем, предоставляя твердые поверхности для гетерогенной нуклеации (Phoenix et al., 2000; Franke, Vazylinski, 2003; Поверхность и ..., 2013). В частности показано, что клетки бактерий *Thermus* sp. вызывают осаждение пересыщенного относительно растворимости аморфного кремнезема во время экспоненциальной фазы роста, сопровождающееся образованием специфичного белка (Sip) клеточной оболочки (Inagaki et al., 2003).

ВЫВОДЫ

1. Видовое богатство и разнообразие микробного сообщества гидротерм Байкальской рифтовой зоны было выше в микробных матах и донных осадках, чем в воде. С понижением температуры в гидротермах разнообразие бактерий увеличивалось. В сообществе микробных матов, развивающихся при температуре 53-65 °С, преобладали филумы *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*. При температуре 34-51 °С доминировали представители *Proteobacteria* и *Cyanobacteria*, а также увеличивалось количество бактерий филумов *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Planctomycetes*.
2. Исследование распространения бактерий группы *Meiothermus-Thermus* выявило их значительное количество в микробных сообществах воды и матов в температурном диапазоне 42-65 °С. Было показано преобладание представителей рода *Meiothermus* в микробных матах и доминирование бактерий рода *Thermus* в сообществах воды.
3. Выделены и охарактеризованы чистые культуры бактерии группы *Meiothermus-Thermus*: 4 из них являлись штаммами вида *Meiothermus ruber*, 1 – *Thermus igniterrae*. Культуры развивались в широком диапазоне температур (30-60 °С), в качестве источника углерода и энергии использовали разнообразный спектр субстратов. В изучаемых культурах выявлены каротиноиды - β-каротин и зеаксантин.
4. Впервые установлено наличие гена *cbbL*, ключевого фермента цикла Кальвина RuBisCO, у штаммов родов *Meiothermus* и *Thermus*, что указывает на их потенциальную способность к автотрофии.
5. При участии микробного сообщества в гидротермах БРЗ образуются кальцит, аморфный кремнезем и опал. Микробное сообщество гидротерм является продуцентом углеводных групп, в том числе полисахаридов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БРЗ – Байкальская рифтовая зона

RubisCO – рибулозо-бифосфат-карбоксилаза

АФБ – аноксигенные фототрофные бактерии

КББ – Кельвин-Бассам-Бентон

ЭПС – экзополисахариды

ВПС – внеклеточные полисахариды

TDS – общее количество растворенных веществ

РФА – рентгенофазовый анализ

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп

ТЭМ – трансмиссионный микроскоп

М – минерализация;

Eh – окислительно-восстановительный потенциал;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота;

ПЦР – полимеразно-цепная реакция;

rDNA – ribosomal DNA

м.м. – микробный мат;

д.ос. – донный осадок.

ТФУ – трифторуксусная кислота

ГПХ – гель-проникающая хроматография

РСА – principal component analysis

СА – canonical analysis

ВЭЖХ – высокоэффективная хроматография

КРПС – кислоторастворимые полисахариды

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алекин, О.А. Руководство по химическому анализу вод суши / О.А. Алекин, А.Д. Семенов, Б.А. Скопинцев // Л: Гидрометеиздат, 1973. – 269 с.
2. Аринушкина, Е.В. Руководство по химическому анализу почв / Е.В. Аринушкина // М.: Наука, 1980. - 487 с.
3. Бабасанова О.Б. Аэробные органотрофные бактерии щелочных гидротерм Байкальского региона: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О.Б. Бабасанова; Бурят. гос. ун-т. - Улан-Удэ, 2007. - 21 с.
4. Бархутова Д.Д. Влияние экологических условий на распространение и активность бактерий-деструкторов в сероводородных источниках Прибайкалья: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Д.Д. Бархутова; Бурят.гос. ун-т. - Улан-Удэ, 2000. - 23 с.
5. Барабанов, Л.Н. Азотные термы СССР / Л.Н. Барабанов, В.Н. Дислер // М: Геоминвод ЦНИИ КиФ, 1968. – 120 с.
6. Бонч-Осмоловская, Е.А. Термофильные микроорганизмы: общий взгляд / Е.А. Бонч-Осмоловская // Труды Ин-та микробиологии. 2011. – Вып. 16. - С. 5-14.
7. Борисенко, И.М. Минеральные воды Бурятской АССР / И.М. Борисенко, Л.В. Замана // Улан-Удэ: Бур. кн. изд-во, 1978. - 162 с.
8. Борисенко, И.М. Состав травертинов из отложений некоторых минеральных источников Забайкалья / И.М. Борисенко, Ю.Ч. Очиров, Р.М. Сусленкова // Труды геологического института БФ СО АН СССР (Улан-Удэ). - 1976. - Вып. 7 (15). - С. 36-52.
9. Булыгина, Е. С. Изучение нуклеотидных последовательностей *nitN* генов у представителей метанотрофных бактерий / Е. С. Булыгина, Б. Б. Кузнецов, А. И. Марусина, И. К. Кравченко, С. А. Быкова, Т. В. Колганова, В. Ф. Гальченко // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – № 4. – С. 500–508.

10. Брянская, А. В. Биогеохимические процессы в альгобактериальных матах щелочного термального Уринского источника / А. В. Брянская, З. Б. Намсараев, О. М. Калашникова, Д. Д. Бархутова, Б. Б. Намсараев, В. М. Горленко // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – № 5. – С. 702–712.
11. Вайнштейн, М.Б. Сульфатвосстанавливающие бактерии водоемов: экология и кластерирование / М.Б. Вайнштейн // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32. – № 1. – С. 136-143.
12. Водные системы Баргузинской котловины / Б.Б. Намсараев, В.В. Хахинов, Е.Ж. Гармаев, Д.Д. Бархутова, З.Б. Намсараев, А.М. Плюснин. – Улан-Удэ: Издательство Бурятского госуниверситета, 2007. – 154 с.
13. Гумеров, В. М. Молекулярный анализ биоразнообразия микроорганизмов в источнике Заварзина, Кальдера Узон, Камчатка / В. М. Гумеров, А. В. Марданов, А. В. Белецкий, Е. А. Бонч-Осмоловская, Н. Н. Равин // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – № 2. – С. 258–265.
14. Гусев, М.В. Цианобактерии (физиология и метаболизм) / М.В. Гусев, К.А. Никитина. – М.: Наука, 1979.- 228 с.
15. Горленко В.М. Влияние температуры на распространение фототрофных бактерий в термальных источниках / В.М. Горленко, Е.И. Компанцева, Н.Н. Пучкова // Микробиология. - 1985. - Т. 54. - №5. - С. 848-853.
16. Горленко, В.М. Активность сульфатредуцирующих бактерий в донных осадках содовых озер Юго-Восточного Забайкалья / В.М. Горленко, Б.Б. Намсараев, А.В. Кулырова и др. // Микробиология. - 1999. - Т. 68. - №5 - С. 664-670.
17. Добрынин, Э.Г. Продукционные и микробиологические процессы в озерах Каратерень и Дауткуль / Э.Г. Добрынин // Структура сообщества гидробионтов в низовьях Амударьи. - Ташкент. – 1988. - С. 3-8.
18. Доронина М.А. Минеральные лечебные воды // В кн.: Гидрогеология СССР (Бур.АССР). - М.: Недра, 1970. - Т. XXII. - С.338-369.

19. Елинов, Н.П. Химия микробных полисахаридов / Н.П. Елинов. – М.: Высшая школа, 1984. – 256 с.
20. Заварзин Г.А. Бактерии и состав атмосферы/ Г.А. Заварзин // М.: Наука, 1984. - 199 с.
21. Заварзин, Г.А. Развитие микробиальных сообществ в истории Земли. Проблемы доантропогенной эволюции биосферы / Г.А. Заварзин // М.: Наука, 1993. - С. 212-222.
22. Заварзин, Г.А. Алкалофильное микробное сообщество и его функциональное разнообразие / Г.А. Заварзин, Т.Н. Жилина, В.В. Кевбрин // Микробиология. - 1999. - Т.68. - № 5. - С. 579-600.
23. Заварзин, Г.А. Введение в природоведческую микробиологию / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова // М.: Книжный дом “Университет”, 2001. - 256 с.
24. Заварзин, Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г.А. Заварзин // М.: Наука, 2003. - С. 67-102.
25. Зайцева С.В. Влияние экологических условий на распространение и активность бактерий-деструкторов щелочных гидротерм Северо-Восточного Прибайкалья: автореф. дис. ... канд. биол. наук / С.В. Зайцева; Бурят. гос. ун-т. - Улан-Удэ, 2004. - 19 с.
26. Замана, Л.В. О происхождении сульфатного состава азотных терм Байкальской рифтовой зоны / Л.В. Замана // Докл. РАН. - 2000. - Т. 372. - № 3. - С. 361-363.
27. Калашникова, О.М. Продукция и состав органического вещества цианобактериальных матов щелочных водных экосистем Забайкалья: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / О.М. Калашникова; Бурят. гос. ун-т. - Улан-Удэ, 2006. - 118 с.
28. Кевбрин, В.В. Разложение целлюлозы анаэробным алкалофильным микробным сообществом / В.В. Кевбрин, Т.Н. Жилина, Г.А.Заварзин // Микробиология. - 1999. - Т. 68. - С. 606-609.

29. Кевбрин, В.В. Термофильные алкалофильные микроорганизмы. Труды ин-та микробиологии им. С.Н. Виноградского / В.В. Кевбрин // М.: Наука, 2007. - Вып. XIV. – С. 374-395.
30. Красильникова, Е.Н. Рост *Chloroflexus aurantiacus* на средах с различными органическими соединениями и пути их метаболизма / Е. Н. Красильникова, Е.Н., Кеппен, О.И., Горленко, В.М., Кондратьева // Микробиология – 1986. – Т. 55 – № 3 – С. 425–430.
31. Кубланов, И.В. Термофильные микроорганизмы, разлагающие биополимеры / И.В. Кубланов, О.А. Подосокорская // Труды Ин-та микробиологии им. С.Н. Виноградского. М.: Наука, 2011. - Вып. XVI. - 315-342.
32. Кузнецов, С. И. Методы изучения водных микроорганизмов / С. И. Кузнецов, Г. А. Дубинина. – М.: Наука, 1989. – 288 с.
33. Куликов Г.В. Минеральные лечебные воды СССР: справочник / Г.В. Куликов, А.В. Жевлаков, С.С. Бондаренко // М.: Недра, 1991. - 399 с.
34. Лазарева, Е.В. Минералообразование в цианобактериальных матах щелочных гидротерм Баргузинской впадины Байкальской рифтовой зоны / Е. В. Лазарева, А. В. Брянская, С. М. Жмодик, С. З. Смирнов, О. П. Пестунова, Д. Д. Бархутова, Е. В. Полякова // Доклады Академии Наук. – 2010. – Т. 430. - № 5. – С. 675–680.
35. Логинова, Л.Г. Новые формы термофильных бактерий / Л.Г. Логинова, Л.А. Егорова // М.: Наука, 1977. - 175 с.
36. Ломоносов, И.С. Геохимия и формирование современных гидротерм Байкальской рифтовой зоны / И.С. Ломоносов // Новосибирск: Наука, 1974.
37. Ломоносов, И.С. Минеральные воды Прибайкалья / И.С. Ломоносов, Ю.И. Кустов, Е.В. Пиннекер // Иркутск: Восточно-Сибирское книжное изд-во, 1977. - 224 с.
38. Намсараев, Б. Б. Геохимическая деятельность микроорганизмов

- гидротерм Байкальской рифтовой зоны // Б. Б. Намсараев, Д. Д. Бархутова, Э. В. Данилова, А. В. Брянская, С. П. Бурюхаев, Е. Ж. Гармаев, В. М. Горленко, О. П. Дагурова, В. Б. Дамбаев, С. В. Зайцева, Л. В. Замана, А. М. Зякун, Е. В. Лаврентьева, З. Б. Намсараев, А. М. Плюснин, А. В. Татаринев, А. В. Турунхаев, В. В. Хахинов, Д. Д. Цыренова, Л. И. Яловик; под ред. В. М. Вайнштейна. – Новосибирск: Академическое издательство «Гео», 2011. – 302 с.
39. Намсараев, Б.Б. Бактериальное образование метана в содовых озерах Юго-Восточного Забайкалья / Б.Б. Намсараев, Т.Н. Жилина, А.В. Кулырова, В.М. Горленко // Микробиология. - 1999. - Т. 68. - № 5. - С. 664-670.
40. Намсараев, Б.Б. Водные системы Баргузинской котловины / Б.Б. Намсараев, В.В. Хахинов, Е.Ж. Гармаев, Д.Д. Бархутова, З.Б. Намсараев, А.М. Плюснин. – Улан-Удэ: Издательство Бурятского госуниверситета, 2007. – 154 с.
41. Намсараев З.Б. Микробные сообщества щелочных гидротерм: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / З.Б. Намсараев; Ин-т микробиол. – Москва, 2003. - 23 с.
42. Намсараев, З.Б. Микробные сообщества щелочных гидротерм / З.Б. Намсараев, В.М. Горленко, Б.Б. Намсараев, Д.Д. Бархутова // Новосибирск. – Изд-во СО РАН. – 2006. – 111 с.
43. Нетрусов А.И. Экология микроорганизмов: учебн. для студ вузов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко и др.; под ред. А.И. Нетрусова. - М.: Издательский центр «Академия», 2004. - 272 с.
44. Перельман А.И. Геохимия природных вод / А.И. Перельман. –М.: Наука. 1982. – 235 с.
45. Плюснин, А.М. Особенности формирования травертинов из углекислых и азотных термальных вод в зоне Байкальского рифта / А.М. Плюснин, А.П. Суздальницкий, А.А. Адушинов, А.Г. Миронов // Геология и

- геофизика. - 2000. - Т.41. - №4. - С. 564-570.
46. Поверхность и межфазные границы в окружающей среде. От наноуровня к глобальному масштабу / П. Морис. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 540 с.
 47. Практикум по микробиологии: учеб. пос. для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; под ред. А.И. Нетрусова. - М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
 48. Раднагуруева, А. А. Органотрофные бактерии горячих источников Байкальской рифтовой зоны / А. А. Раднагуруева, Е. В. Лаврентьева, В.Г. Будагаева, Д. Д. Бархутова, Я. Е. Дунаевский, Б.Б. Намсараев // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 3. – С. 347–360.
 49. Резников, А.А. Методы анализа природных вод / А.А. Резников, Е.П. Муликовская, И.Ю. Соколов // 3-е изд. М.: Недра, 1970.
 50. Розанова, Е.Л. Новые данные о сульфатвосстанавливающих и метанобразующих бактериях / Е.Л. Розанова // Успехи микробиологии. – 1978. – Т. 13. – С. 164-187.
 51. Татаринов, А.В. Роль бактериальных матов в петрогенезисе и образовании рудных минералов травертинов азотных гидротерм Байкальской рифтовой зоны / А.В. Татаринов, Л.И. Ялович, З.Б. Намсараев // Докл. РАН. - 2005. - Т. 403. - № 5. - С. 678-681.
 52. Толстихин, Н.И. Минеральные воды / Н.И. Толстихин, Е.В. Посохов // Л.: Изд-во ЛГИ, 1975. - 171с.
 53. Трошин, Ю.П. Химический состав и условия формирования современных гидротерм центральной части Байкальской рифтовой зоны / Ю.П. Трошин, И.С. Ломоносов // География и природные ресурсы. – 2005. - № 2. – С. 39-46.
 54. Федорова, Т.А. Микроминеральные выделения в термофильных цианобактериальных сообществах / Т.А. Федорова, Л.М. Герасименко, Р.А. Бочко, Г.А. Заварзин // Вулканонология и сейсмология. – 1988. – №. 1.

- C. 101-104.
55. Adhikary, S.P. Isolation and Chemical Characterization of the Sheath from the Cyanobacterium *Chroococcus minutus* SAG B.41.79 / S.P. Adhikary, J. Weckesser, U.J. Jurgens, J.R. Golecki, D. Borowiak // *Microbiology*. – 1986. – V. 132. – P. 2595-2599.
 56. Albuquerque, L., Ferreira, C., Tomaz, D., Tiago, I., Verhssimo, A., da Costa, M.S., Nobre, M.F. (2009) *Meiothermus rufus* sp. nov., a new slightly thermophilic redpigmented species and emended description of the genus *Meiothermus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 306–313.
 57. Albuquerque, L. The Family *Thermaceae* / L. Albuquerque, M.S. da Costa // In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. *The Prokaryotes*. – 2014. – P. 955–987.
 58. Albuquerque, L. *Meiothermus granaticius* sp. nov., a new slightly thermophilic redpigmented species from the Azores / L. Albuquerque, F. A. Rainey, M. F. Nobre, M. S. da Costa // *Syst Appl Microbiol.* – 2010. – V. 33. – P. 243–246.
 59. Albuquerque, L. *Truepera radiovictrix* gen. nov., sp. nov., a new radiation resistant species and the proposal of *Trueperaceae* fam. nov. / L. Albuquerque, C. Simoes, M.F. Nobre // *FEMS Microbiol. Letters*. – 2005. – V. 247. – P. 161–169.
 60. Alfredsson G.A. Ecology, distribution and isolation of *Thermus* / *Thermus* / G.A. Alfredsson, J.K. Kristjansson // *Species: Biotechnology Handbooks Series*. – London: Plenum Press, 1995. - P. 43-66.
 61. Armitage, D.W. Millimeter-scale patterns of phylogenetic trait and diversity in a salt marsh microbial mat / D.W. Armitage, K.L. Gallagher, N.D. Youngblut // *Front Microbiol.* – 2012. – V. 3. – N. 293. – P. 1-16.
 62. Badhai, J. Taxonomic and functional characteristics of microbial communities and their correlation with physicochemical properties of four geothermal springs in Odisha, India / J. Badhai, T.S. Ghosh, K.S. Das // *Frontiers in*

Microbiology. – 2015. – V. 6. – № 1166.

63. Battista, J.R. Phylum BIV. "*Deinococcus-Thermus*" Family 1. *Deinococcaceae* / J.R. Battista, F.A. Rainey // Brooks and Murray, 1981, 356, vp emend. Rainey et al., 1997, 513. In: Boone DR and Castenholz RW (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. – 2001. – P. 395–414.
64. Bauld, J. Ecological studies of *Chloroflexus*, a gliding photosynthetic bacterium / J. Bauld, T.D. Brock // *Arch. Microbiol.* – 1973. – V. 92. – P. 267-284.
65. Baumgartner, L. K. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries / L. K. Baumgartner, R. P. Reid, C. Dupraz, A. W. Decho, D. H. Buckley, J. R. Spear, K. M. Przekop, P. T. Visscher // *Sedimentary Geology*. – 2006. – V. 185. – P. 131 -145.
66. Bolhuis, H. Molecular ecology of microbial mats / H. Bolhuis, M.S. Cretoiu, L.J. Stal // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2014. – V. 90. – P. 335 –50.
67. Bowen De Leon, K. Archaeal and bacterial communities in three alkaline hot springs in Heart Lake Geyser Basin, Yellowstone National Park / K. Bowen De Leon, R. Gerlach, B. M. Peyton, M.W. Fields // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. V. 4. – N330.
68. Brock, T.D. Microorganisms adapted to high temperatures / T.D. Brock // *Nature*. - 1967. - Vol. 214. - P. 882-885.
69. Brock, T.D. *Thermus aquaticus* gen. nov., a nonsporulating extreme thermophile / T.D. Brock, H. J. Freeze // *Bacteriol.* – 1969. – V. 98. – P. 289–297.
70. Jones, B. High-temperature (>90°C) calcite precipitation at Waikite Hot Springs, North Island, New Zealand / B. Jones, R.W. Renaut, M.R. Rosen // *Journal of the Geological Society*. – 1996. – V. 153. – P. 481-496.
71. Bryanskaya, A.V. *Geobacillus icigianus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring / A.V. Bryanskaya, A.S. Rozanov, N.M. Slynko, S.V. Shekhovtsov, S.E. Peltek // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2015. – V. 65. –

- N. 3. – P. 864-869.
72. Callegan, R.P. Description of four novel psychrophilic, ionizing radiation-sensitive *Deinococcus* species from alpine environments / R.P. Callegan, M.F. Nobre, P.M. McTernan // *Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – V. 58. – P. 1252–1258.
 73. Camacho C. BLAST+: architecture and applications / C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, T.L. Madden // *BMC Bioinformatics.* - 2009. - Dec 15. – 10. P. 421.
 74. Canaveras, J.C. Microorganisms and microbially induced fabrics cave walls / J.C. Canaveras, S. Sacchez-Moral, V. Soler // *Geomicrobiology Journal.* – 2001. – V. 18. – P. 223-240.
 75. Chen, M.Y. *Meiothermus taiwanensis* sp. nov., a novel filamentous, thermophilic species isolated in Taiwan / M.Y. Chen, G.H. Lin, Y.T. Lin, S.S. Tsay // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. – P. 1647–1654.
 76. Chen, L. Bacteria-mediated synthesis of metal carbonate minerals with unusual morphologies and structures / L. Chen, Y.H. Shen, A.J. Xie, B. Huang, R. Jia, R.Y. Guo, W.Z. Tang // *Crystal Growth & Design.* – 2009. – V. 9. – P. 743–754.
 77. Chi, Z. Exopolysaccharides from Marine Bacteria / Z Chi, Y. Fang // *Journal of Ocean University of China.* – 2005. – V. 4. – N. 1. – P. 67-74.
 78. Chia Sing, C. Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing / C. Chia Sing., C. Kok-Gan, T. Yea-Ling, C. Yi-Heng, G. Kian Mau / *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6. – N. 177.
 79. Chou, C.-W. Biocalcification of sand through ureolysis / C.-W. Chou, E.A. Seagren, A.H. Aydilek, M. Lai // *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering.* – 2011. – V. 137. – N. 12. – P. 1179–1189.
 80. Chung, A.P. *Meiothermus cerbereus* sp. nov., a new slightly thermophilic

- species with high levels of 3-hydroxy fatty acids / A.P. Chung, F. Rainey, M.F. Nobre, J. Burghardt, M.S. da Costa // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1997. – V. 47. – P. 1225–1230.
81. Chung A.P. *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland / A.P. Chung, F.A. Rainey, M. Valente, M.F. Nobre, M.S. da Costa // *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.* - 2000. - V. 50. - P. 209-217.
82. Coman, C. Archaeal and bacterial diversity in two hot spring microbial mats from a geothermal region in Romania / C. Coman, B. Druga, A. Hegedus, C. Sicora, N. Dragos // *Extremophiles.* – 2013. – V. 17. – P. 523-534.
83. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // *Science.* – 1999. – V. 284. – P. 1318–1322.
84. Cox, M.M. *Deinococcus radiodurans* – the consummate survivor / M.M. Cox, J.R. Battista // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2005. – V. 3. – P. 882–892.
85. Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // *Microbiol Mol Biol R.* – 2000. – V. 64. – N. 4. – P. 847-867.
86. Degryse, E. A comparative analysis of extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus* / E. Degryse, N. Glansdorff, A. Piérard // *Arch Microbiol.* – 1978. – V. 117. – N. 2. – P. 189-196.
87. DeJong, J.T. Bio-mediated soil improvement / J.T. DeJong, B.M. Mortensen, B.C. Martinez, D.C. Nelson // *Ecological Engineering.* – 2010. – V. 36. – P. 197–210.
88. Denman, S. Isolation of strains of *Thermus aquaticus* from the Australian Artesian Basin and a simple and rapid procedure for the preparation of their plasmids / S. Denman, K. Hampson, B.K.C. Patel // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1991. – V. 82. – P. 73–78.
89. De Muynck, W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a

- review / W. De Muynck, N. De Belie, W. Verstraete // *Ecological Engineering*. – 2010. – V. 36. – P. 118–136.
90. Erlanger, B.F. The preparation and properties of two new chromo-genic substrates of trypsin / B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1961. - V.95. - P.271-278.
91. Everroad, R.C. Diversification of Bacterial Community Composition along a Temperature Gradient at a Thermal Spring / R.C. Everroad, H. Otaki, K. Matsuura, S. Haruta // *Microbes Environ.* – 2012. – V.27. – P. 374–381.
92. Fein, J. B. The effect of Fe on Si adsorption by *Bacillus subtilis* cell walls: insights into non-metabolic bacterial precipitation of silicate minerals / J. B. Fein, S. Scott, N. Rivera // *Chem. Geol.* – 2002. – V. 182. – P. 265–273.
93. Ferreira, A.C. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs Ferreira AC, Nobre MF, Rainey FA. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* – 1997. – V. 47. – P. 939–947.
94. Francis, S. On the experimental silicification of microorganisms II. On the time of appearance of eukaryotic organisms in the fossil record / S Francis, L.Margulis, E.S. Barghoorn // *Precambrian Research*. – 1978. – V. 6. – N. 1. – P. 65-100.
95. Franke, R.B. Biologically induced mineralization by bacteria / R.B. Franke, D.A. Bazylinski // *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. – 2003. – V. 54. – P. 95–114.
96. Freitas, F. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications / F. Freitas, V.D. Alves, M.A. Reis // *Trends in Biotechnology*. – 2011. – V. 29. – N. 8. – P. 388-398.
97. Gumerov, V.M. Molecular analysis of microbial diversity in the Zavarzin Spring, Uzon Caldera, Kamchatka / V.M. Gumerov, A.V. Mardanov, A.V. Beletsky, E.A. Bonch-Osmolovskaya, N.V. Ravin // *Microbiology*. – 2011. – V. 80. – P. 244–251.

98. Habib, N. *Meiothermus luteus* sp. nov., a slightly thermophilic bacterium isolated from a hot spring / N. Habib, I.U. Khan, F. Hussain, E.M. Zhou, M. Xiao, L. Dong, X.Y. Zhi // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2017. – V. 67. – P. 2910–2914.
99. Hammes, F. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation / F. Hammes, N. Boon, J. de Villiers, W. Verstraete, S.D. Siciliano // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2003. – V. 69. – P. 4901–4909.
100. Heaney, P.J. Solution chemistry of wood silicification / P.J. Heaney, D.M. Yates // *Geol. Soc. Am. Annu. Meet., Abstr. Program.* – 1998. – 30, A-375
101. Hedlund, B.P. A review of the microbiology of the Rehai geothermal field in Tengchong, Yunnan Province, China / B.P. Hedlund, J.K. Cole, A.J.W.W. Hou, E. Zhou, W. Li, H. Donget // *Geoscience Frontiers.* – 2012. – V. 3. – N3. – P. 273-288.
102. Hensel, R. Chemotaxonomic and Molecular-Genetic Studies of the Genus *Thermus*: Evidence for a Phylogenetic Relationship of *Thermus aquaticus* and *Thermus ruber* to the Genus *Deinococcus* / R. Hensel, W. Demharter, O. Kandler, R. M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1986. – V. 36. – N. 3. – P. 444-453.
103. Hirsch, P. *Deinococcus frigens* sp. nov., *Deinococcus saxicola* sp. nov., and *Deinococcus marmoris* sp. nov., low temperature and draught-tolerating, UV-resistant bacteria from continental Antarctica / P. Hirsch, C.A. Gallikowski, J. Siebert // *Syst. and Appl. Microbiol.* – 2004. – V. 27. – P. 636–645.
104. Hou, W. A comprehensive census of microbial diversity in hot springs of Tengchong, Yunnan Province China using 16S rRNA gene pyrosequencing / W. Hou, S. Wang, H. Dong, H. Jiang, B.R. Briggs, J.P. Peacock // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – N. 53350.
105. Hu, C. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain / C. Hu, Y. Liu, B.S.

- Paulsen, D.Petersen, D. Klaveness // Carbohydr. Polym. – 2003. – V. 54. – P. 33–42.
106. Huber, H. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology / H. Huber, K.O. Stetter // J. of Biotechnology. - 1998. - Vol. 64. - P. 39-52.
107. Inagaki, F. Microbial silica deposition in geothermal hot waters / F. Inagaki, Y. Motomura, S. Ogata // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2003. – V. 60. – P. 605-611.
108. Inskeep, W.P. The YNP metagenome project: environmental parameters responsible for microbial distribution in the Yellowstone geothermal ecosystem / W.P. Inskeep, Z.J. Jay, S.G. Tringe, M.J. Herrgård, D.B. Rusch // Front. Microbiol. – 2013. – V. 4. – N67.
109. Kambourova, M. Thermophiles as a Promising Source of Exopolysaccharides with Interesting Properties / M. Kambourova, N. Radchenkova, I. Tomova, I. Bojadjieva // Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges. – 2016. – P. 117-139.
110. Khan, I.U. *Thermus caldifontis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring / I.U. Khan, N. Habib, F. Hussain, W.D. Xian, A. Amin, E.M. Zhou, I. Ahmed, X.Y. Zhi, W.J. Li // Int J Syst Evol Microbiol. – 2017. – V. 67. – N. 8. – P. 2868-2872.
111. Kim, D.U. *Deinococcus metallilatus* sp. nov. and *Deinococcus carri* sp. nov., isolated from a car air-conditioning system / D.U. Kim, H. Lee, J.H. Lee // Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol. – 2015. – V. 65. – P. 3175–3182.
112. Kieft, T. L. Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate / T. L. Kieft, J.K. Fredrickson, T.C. Onstott, A. Gorby, H.M. Kostandarites // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – P. 1214–1221.
113. Kiyoshima, A. HPLC simultaneous determination of glycerol and mannitol in human tissues for forensic analysis / A. Kiyoshima, K. Kudo, N. Nishida, N. Ikeda // Forensic Sci Int. – 2002. – V. 125. – N. 2-3. – P. 127-33.

114. Klatt, C.G. Community ecology of hot spring cyanobacterial mats: predominant populations and their functional potential / C.G. Klatt, J.M. Wood, D.B. Rusch // ISME J. – 2011. – V. 5. – P. 1262–1278.
115. Klatt, J.M. Structure and function of natural sulphideoxidizing microbial mats under dynamic input of light and chemical energy / J.M. Klatt, S. Meyer, S. Hausler // ISMEJ. – 2016. – V. 10. – P. 921-933.
116. Kolari, M. Colored moderately thermophilic bacteria in papermachine biofilms / M. Kolari, J. Nuutinen, F.A. Rainey, M.S. Salkinoja-Salonen // J Ind Microbiol Biotechnol. – 2003. – V. 30. – P. 225–238.
117. Kolari, M. Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis* / M. Kolari, J. Nuutinen, M.S. Salkinoja-Salonen // J. Ind. Microbiol. Biotech. – 2001. – V. 27. – P. 343–351.
118. Konhauser, K.O. Diversity of iron and silica precipitation by microbial mats in hydrothermal waters, Iceland: implications for Precambrian iron formations / K.O. Konhauser, F.G. Ferris // Geology. – 1996. – Vol. 24. – P. 323-326.
119. Konhauser, K.O. Metal sorption and mineral precipitation by bacteria in two Amazonian river systems: Rio Solimoes and Rio Negro, Brazil / K.O. Konhauser, W.S. Fyfe, F.G. Ferris, T.J. Beveridge // Geology. – 1993. – V. 21. – P. 1103–1106.
120. Konhauser, K.O. Microbial-silica interactions in Icelandic hot spring sinter: possible analogues for some Precambrian siliceous stromatolites / K.O. Konhauser, V.R. Phoenix, S.H. Bottrell, D.G. Adams, I.M. Head // Sedimentology. – 2001. – V. 48. – P. 415-433.
121. Konhauser, K.O. Mineral precipitation by epilithic biofilms in the Speed River, Ontario, Canada / K.O. Konhauser, S. Schultze-Lam, F.G. Ferris, W.S. Fyfe, F.J. Longstaff, T.J. Beveridge // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60. – P. 549–553.
122. Kornilłowicz-Kowalska, T. Biodegradation of keratin waste: Theory and

- practical aspects / T. Kornilłowicz-Kowalska, J. Bohacz // Waste Management. – 2011. – V. 31. – P. 1689–1701.
123. Kozina, I.V. *Caldanaerobacter uzonensis* sp. nov., an anaerobic, thermophilic, heterotrophic bacterium isolated from a hot spring / I.V. Kozina, I.V. Kublanov, T.V. Kolganova, N.V. Chernyh, E.A. Bonch-Osmolovskaya // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2010. – V. 60. - P. 1372-1375.
124. Kumar, C.G. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint / C.G. Kumar, H. Takagi // Biotechnology advances 17. - 1999. - P. 561-594.
125. Kuo, J.-M. Purification and characterization of a thermostable keratinase from *Meiothermus* sp 140 / J.-M. Kuo, J.-I. Yang, W.-M. Chen, M.-H. Pan, M.-L. Tsai, Y.-J. Lai, A. Hwang, B.S. Pan, C.-Y. Lin // Int Biodeter Biodegr. – 2012. – V. 70. – P. 111–116.
126. Lau, C.Y. Highly diverse community structure in a remote central Tibetan geothermal spring does not display monotonic variation to thermal stress / C.Y. Lau, J. Hongmei, J.C. Aitchison, S.B. Pointing // FEMS Microbiol Ecol. – 2006. – V. 57. – P. 80–91.
127. Lavrentyeva E. V. Bacterial Diversity and Functional Activity of Microbial Communities in Hot Springs of the Baikal Rift Zone / E. V.Lavrentyeva, A. A. Radnagurueva, D. D. Barkhutova, N. L. Belkova, S. V. Zaitseva, Z. B. Namsaraev, V. M. Gorlenko, B. B. Namsaraev // Microbiology. – 2018. – V.87. - №2. – P. 272-281.
128. Le Costaouëc, T. Structural data on a bacterial exopolysaccharide produced by a deep-sea *Alteromonas macleodii* strain / T. Le Costaouëc, S. Cérantola, D. Ropartz, J. Ratiskol, C. Siquin, S. Collic-Jouault, C. Boisset // Carbohydr Polym. – 2012. – V. 90. – N. 1. – P. 49-59.
129. Lewin, A. Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments / A. Lewin, A. Wentzel, S. Valla // Curr. Opin. Biotechnol. – 2013. – V. 24. – P. 516–525.
130. Loginova, L.G. A new species of obligate-thermophilic nonspore forming

- bacteria belonging to the genus *Thermus* / L.G. Loginova, L.A. Egorova, R.S. Golovacheva, L.M. Seregina // *Izvestiia Akademii Nauk.* – 1975. – V. 2. – P. 305–307.
131. Loginova, L. G. *Thermus ruber* sp. nov., nom. rev. / L. G. Loginova, L. A. Egorova, R. S. Golovacheva, L. M. Seregina // *Int J Syst Bacteriol.* – 1984. – V. 34. – P. 498–499.
132. López-López, O. Hot spring metagenomics / O. López-López, M.E. Cerdán, M.I. González-Siso // *Life.* – 2013. – V. 3. – P. 308-320.
133. Mackenzie, R. Bacterial composition of microbial mats in hot springs in Northern Patagonia: variations with seasons and temperature / R. Mackenzie, C. Pedrós-Alió, B. Díez // *Extremophiles.* – 2013. – V. 17. – P. 123–136.
134. Madigan, M.T. *Bacterial Habitats in Extreme Environments* / M.T. Madigan // *Journey to Diverse Microbial Worlds.* – 2000. – P. 61-72.
135. Manaia, C.M. Characterization of halotolerant *Thermus* isolates from shallow marine hot springs on S. Miguel, Azores / C.M. Manaia, M.S. da Costa // *J. Gen. Microbiol.* – 1991. – V. 137. – P. 2643–2648.
136. Marsh, C. L. Characterization of some thermophilic bacteria from the hot springs of Yellowstone National Park / C. L. Marsh, D. H. Larsen // *J. Bacteriol.* – 1953. – V. 65. – P. 193–197.
137. Marteinson, V.T. First isolation of thermophilic aerobic non-sporulating heterotrophic bacteria from deep-sea hydrothermal vents / V.T. Marteinson, J.-L. Birrien, J.K. Kristjánsson, D. Prieur // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1995. – V. 18. – P. 163–174.
138. Masurat, P. Identification of *Meiothermus* as the dominant genus in a storage system for spent nuclear fuel / P. Masurat, E.C. Fru, K. Pedersen // *J Appl Microbiol.* – 2005. – V. 98. – P. 727–740.
139. Matsui, T. Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Meiothermus ruber* H328 / T. Matsui, Y. Yamada, H. Mitsuya, Y. Shigeri, Y. Yoshida, Y. Saito, H. Matsui,

- K. Watanabe // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2009. – V. 82. – P. 941–950.
140. McConnaughey, T. A. Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake / T.A. McConnaughey, F.F. Whelan // *Earth-Science Reviews.* – 1997. – V. 42. – P. 95–117.
141. McGee, K. A. Puhimau thermal area: a window into the upper East Rift Zone of Kīlauea Volcano, Hawaii? / K.A. McGee, A.J. Sutton, T. Elias, M.P. Doukas, T.M. Gerlach // *Pure Appl. Geophys.* – 2006. – V. 163. – P. 837–851.
142. McNevin, D. B. Differences in carbon isotope discrimination of three variants of D-ribulose-1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase reflect differences in their catalytic mechanisms / D. B McNevin, M. R. Badger, S. M. Whitney, S. von Caemmerer, G. G. Tcherkez // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 36068–36076.
143. Meyer-Dombard, D.R. Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA / D.R. Meyer-Dombard, E.L. Shock, J.P. Amend // *Geobiology.* – 2005. – V. 3. – P. 211–227.
144. Ming, H. *Meiothermus roseus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a geothermal area / H. Ming, Y.Y. Duan, Q.Q. Guo, Y.R. Yin, E.M. Zhou // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2015. – V. 108. – P. 897–905.
145. Ming, H. *Thermus caliditerrae* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a geothermal area / H. Ming, Y.R. Yin, S. Li, G.X. Nie, T.T. Yu, E.M. Zhou, L. Liu, L. Dong, W.J. Li // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2014. – V. 64. – N. 2. – P. 650-656.
146. Miroshnichenko, M.L. *Oceanithermus profundus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, facultatively chemolithoheterotrophic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent / M.L. Miroshnichenko, S. L'Haridon, C. Jeanthon // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003 a. – V. 53. – P. 747–752.

147. Miroshnichenko, M.L. *Vulcanithermus mediatlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Thermaceae from a deep-sea hot vent / M.L. Miroshnichenko, S. L'Haridon, O. Nercessian // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003 b. – V. 53. – P. 1143–1148.
148. Mori, K. *Oceanithermus desulfurans* sp. nov., a novel thermophilic, sulfur-reducing bacterium isolated from a sulfie chimney in Suiyo Seamount / T. Kakegawa, Y. Higashi // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – V. 54. – P. 1561–1566.
149. Muller, W. J. Whole Genome Comparison of *Thermus* sp. NMX2.A1 Reveals Principal Carbon Metabolism Differences with Closest Relation *Thermus scotoductus* SA-01 / W.J. Muller, N. Tlalajoe, E. D. Cason, D. Litthauer, O. Reva, E. Brzuszkiewicz, E. van Heerden // G3:Genes, Genomes, Genetics. – 2016. – Vol. 6. – P. 2791-2797.
150. Murray, R.G.E. The family *Deinococcaceae*. In: Ballows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W., Scheilefer KH. The Prokaryotes. – 1992. – P. 3732–3744.
151. Nakagawa, T. Phylogenetic characterization of microbial mats and streamers from a Japanese alkaline hot spring with a thermal gradient / T. Nakagawa, M. Fukui // J Gen Appl Microbiol. – 2002. – V. 48. – P. 211–222.
152. Namsaraev, Z.B. *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, Central Mongolia / Z.B. Namsaraev, O.B. Babasanova, Y.E. Dunaevsky, V.N. Akimov, D.D. Barkhutova, V.M. Gorlenko, B.B. Namsaraev // Microbiology. - 2010. - V. 79. - № 4. – P. 491-499.
153. Nazina T.N. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions
154. Nazina, T.N. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. / T.N. Nazina, E.V. Lebedeva, A.B. Poltaraus, T.P. Tourova, A.A. Grigoryan, D.Sh. Sokolova, A.M. Lysenko, G.A. Osipov // Int. J. Syst. Evol.

- Microbiol. - 2004. – V.54. - P. 2019-2024.
155. Neelakanta, G. The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities / G. Neelakanta, H. Sultana // *Microbiol insights.* – 2013. – V. 6. – P. 37-48.
156. Nicolaus, B. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology / B. Nicolaus, M. Kambourova, E.T. Oner // *Environmental Technology.* – 2010. – V. 31. – N. 10. – P. 1145–1158
157. Nobre M.F. Transfer of *Thermus ruber*, *Thermus silvanus* and *Thermus chiarophilus* to *Meiothermus* gen. nov. as *Meiothermus ruber* comb. nov., *Meiothermus silvanus* comb. nov. and *Meiothermus chiarophilus* comb. nov., respectively / M.F. Nobre, H.G. Trueper, M.S. Da Costa // *Int. J. Syst. Bacteriol.* - 1996. – V. 46. - P. 604-606.
158. Nold, S.C. Diverse *Thermus* species inhabit a single hot spring microbial mat / S.C. Nold, D.M. Ward // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1995. – V. 18. – P. 274–278.
159. Olennikov, D.N. A novel HPLC-assisted method for investigation of the Fe²⁺-chelating activity of flavonoids and plant extracts / D.N. Olennikov, N.I. Kashchenko, N.K. Chirikova // *Molecules.* – 2014. – V. 19. – P. 18296-18316.
160. Olennikov, D. N. Water-soluble glucans from true cardamom (*Elettaria cardamomum* White at Maton) seeds / D.N. Olennikov, A.V. Rokhin // *Applied Biochemistry and Microbiology.* – 2013. – V. 49. – N. 2. – P. 182–187.
161. Olennikov, D.N. Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. Fruit bodies / D.N. Olennikov, L.M. Tankhaeva, S.V. Agafonova // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2011. – V. 47. – P. 419-425.
162. Olennikov, D.N. Lameaceae carbohydrates. I. Pectinic substances and hemicelluloses from *Mentha piperita* / D.N. Olennikov, L.M. Tankhaeva // *Chem. Nat. Comp.* – 2007. – V. 43. – P. 501-507.

163. Pace, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere / N.R. Pace // *Science*. – 1997. – V. – 276. – P. 734–740.
164. Paerl, H.W. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments / H.W. Paerl, J.L. Pinckney, T.F. Stegge // *Environ Microbiol.* - 2000. – V. 2. – N. 1. – P. 11-26.
165. Panda, A.K. Bacterial and archeal community composition in hot springs from Indo-Burma region, North-east India / A.K. Panda, S.S. Bisht, S. De Mandal, N.S. Kumar // *AMB Expr.* – 2016. – V. 6. – N. 111.
166. Pereira, S. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly / S. Pereira, A. Zille, E. Micheletti, P. Moradas-Ferreira, R. de Philippis, P. Tamagnini // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2009. – V. 33. – P. 917–941.
167. Phoenix, V. Mechanisms of rapid silicate biomineralisation in hot springs / V. Phoenix, K. Konhauser, A. Howe // *Journals of Conference Abstracts*. – 2000. – V. 5. – N. 2. – P. 794.
168. Raveendran, S. Bacterial exopolysaccharide based nanoparticles for sustained drug delivery, cancer chemotherapy and bioimaging / S. Raveendran, A.C. Poulse, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – V. 91. – N. 1. – P. 22-32.
169. Reigstad, L.J. Diversity and abundance of Korarchaeota in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka / L.J. Reigstad, S.L. Jorgensen, C. Schleper // *ISME J.* – 2010. – V. 4. – P. 346–356.
170. Reynolds, J. The use of lead citrate of high pH as electron opaque in electron microscopy / J. Reynolds // *J. Cell. Biol.* – 1963. – V. 17. – № 1. – P. 208–218.
171. Rodriguez-Navarro, C. Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate: implication for stone conservation / C.

- Rodriguez-Navarro, F. Jroundi, M. Schiro // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – V. 78. – P. 4017-4029.
172. Rothschild, L.J. Life in extreme environments / L.J. Rothschild, R. Mancinelli // *Nature*. – 2001. – V. 409. – P. 1092–1101
173. Rossi, F. Role of Cyanobacterial Exopolysaccharides in Phototrophic Biofilms and in Complex Microbial Mats / F.Rossi, R.De Philippis // *Life*. - 2015. – V. 5. – P. 1218-1238.
174. Saiki, T. Isolation and characterization of extremely thermophilic bacteria from hot springs / T. Saiki, R. Kimura, K. Arimua // *Agri. Biol. Chem.* – 1972. – V. 36. – P. 2357–2366.
175. Sako, Y. *Marinithermus hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a strictly aerobic, thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney / Y. Sako, S. Nakagawa, K. Takai, K. Horikoshi // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53. – P. 59–65.
176. Sanger, F. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA / F.Sanger, G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, J.C. Fiddes, C.A. Hutchison, P.M. Slocombe, M. Smith // *Nature*. – 1977. – V. 265. – P. 687-690.
177. Sand, W. Microbial life in geothermal waters / W. Sand // *Geothermics*. – 2003. V. – 32. – P. 655–667.
178. Schultze-Lam, S. Mineralization of bacterial surfaces / S. Schultze-Lam, D. Fortin, B.S. Davis, T.J. Beveridge // *Chemical Geology*. – 1996. – V. 132. – N. 1–4. – P. 171-181.
179. Schürks, N. Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa* / N. Schürks, J. Wingender, H.C. Flemming, C. Mayer // *Int J Biol Macromol*. – 2002. – V. 30. – P. 105-111.
180. Seckbach, J. Microbial Mats: Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems / J. Seckbach, A. Oren // Springer Science: Dordrecht, The Netherlands, 2010.

181. Sharp R.J. Properties of *Thermus ruber* strains isolated from Icelandic hot springs and DNA: DNA homology of *Thermus ruber* and *Thermus aquaticus* / R.J. Sharp, R.A.D. Williams // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – V. 54. – P. 2049-2053.
182. Simkus, D. N. Variations in microbial carbon sources and cycling in the deep continental subsurface / D.N. Simkus, G.F. Slater, B.S. Lollar, K. Wilkie, T.L. Kieft // Geochim. Cosmochim. Acta. – 2016. – V. 173. – P. 264–283.
183. Skinner, H.C.W. Biominerals / H.C.W. Skinner // Mineralogical Magazine. – 2005. – V. 69. – N. 5. – P. 621-641.
184. Skirnisdottir, S. Isolation and characterization of a mixotrophic sulfur-oxidizing *Thermus scotoductus* / S. Skirnisdottir, G.O. Hreggvidsson, O. Holst, J.K. Kristjansson // Extremophiles. – 2001. – V. 5. – N.1. – P. 45-51.
185. Stetter, K. O. Hyperthermophiles in the history of life / K.O. Stetter // Phil. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci. – 2006. V. – 361. – P. 1837–1843.
186. Stramer, S.L. The occurrence and survival of *Thermus aquaticus* / S.L. Stramer, M.J. Starzyk // Microbios. – 1981. – V. 45. – P. 99–110.
187. Suihko, M.L. Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products / M.L. Suihko, H. Sinkko, L. Partanen, T. Mattila-Sandholm, M. Salkinoja-Salonen, L. Raaska // J Appl Microbiol. – 2004. – V. 97. – P. 1228–1235.
188. Sun Z. Chromatographia // Sun Z., C. Song, L. Xia, X. Wang, Y. Suo, J. You. – 2010. – V. 71. – P. 789.
189. Swingley, W. D. Coordinating environmental genomics and geochemistry reveals metabolic transitions in a hot spring ecosystem / W. D. Swingley, D. R. Meyer-Dombard, E. L. Shock, E. B. Alsop, H. D. Falenski, J. R. Havig // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – N. e38108.
190. Takacs-Vesbach, C. Volcanic calderas delineate biogeographic provinces among Yellowstone thermophiles / C. Takacs-Vesbach, K. Mitchell, O.

- Jackson-Weaver, A.-L. Reysenbach // *Environ Microbiol.* – 2008. – V. 10. – P. 1681–1689.
191. Tanaka, R. *Thermaerobacter litoralis* sp. nov., a strictly aerobic and thermophilic bacterium isolated from a coastal hydrothermal field / R. Tanaka, S. Kawaichi, H. Nishimura, Y. Sako // *Int J Syst Evol Microbiol.* - 2006. – V. 56. – N. 7. – P. 1531-1534.
192. Tazaki, K. Chapter 9 Clays, Microorganisms, and Biomineralization / K. Tazaki // *Article in Developments in Clay Science.* – 2006. – V. 1.
193. Tekere, M. Bacterial Diversity in Some South African Thermal Springs: A Metagenomic Analysis / M. Tekere, A. Lötter, J. Olivier, S. Venter // *Proceedings World Geothermal Congress.* – 2015. - Melbourne, Australia.
194. Tenreiro, S. *Thermus silvanus* sp. nov. and *Thermus chliarophilus* sp. nov., two new species related to *Thermus ruber* but with lower growth temperatures / S. Tenreiro, M. F. Nobre, M. S. da Costa // *Int J Syst Bacteriol.* – 1995. – V. 45. – P. 633–639.
195. Thibault, V. Metagenomic profiling of Arctic microbial mat communities as nutrient scavenging and recycling systems / V. Thibault, C. Lovejoy, A.D. Jungblut, W.F. Vincent, J. Corbeil // *Limnol. Oceanogr.* – 2010. – V. 55. – N. 5. – P. 1901-1911.
196. Tobler, D.J. Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects / D.J. Tobler, L.G. Benning // *Extremophiles.* – 2011. – V. 15. – P. 473–485.
197. Urrutia, M. M. Formation of fine-grained metal and silicate precipitates on a bacterial surface (*Bacillus subtilis*) / M.M. Urrutia, T.J. Beveridge // *Chemical Geology.* – 1994. – V. 116. – N. 3–4. – P. 261-280.
198. Usova, A. L. Polysaccharide Composition of Several Calcareous Red Algae: Isolation of Alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae) / A.L. Usova, M.L. Bilan, N.G. Klochkova // *Botanica Marina.* – 1995. – V. 38. – P. 43-51.

199. Vaishampayan, P. *Deinococcus phoenicis* sp. nov., an extreme ionizing-radiation-resistant bacterium isolated from the Phoenix Lander assembly facility / P. Vaishampayan, A.H. Roberts, A. Augustus // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2014. – V. 64. – P. 3441–3446.
200. van der Meer, M.T. Compound-specific isotopic fractionation patterns suggest different carbon metabolisms among *Chloroflexus*-like bacteria in hot spring microbial mats / M.T. van der Meer, J. S. Schouten, J.S. Sinninghe Damsté, J.W. de Leeuw, D.M. Ward // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – P. 6000-6006.
201. Vieille, C. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability / C. Vieille, G.J. Zeikus // *Microbiol. Mol. Biol.Rev.* - 2001. - V.65. - P.1-43.
202. Vu, B. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation / B. Vu, M. Chen, R.J. Crawford, E.P. Ivanova // *Molecules.* – 2009. – V. 14. – N. 7. – P. 2535-2554.
203. Walter, M.R. Siliceous algal and bacterial stromatolites in hot spring and geyser effluents of Yellowstone National Park / M.R. Walter, J. Bauld, T.D. Brock // *Science.* – 1972. – V. 178. – P. 402–405.
204. Wang, H. An overview on natural polysaccharides with antioxidant properties / H. Wang, Y.M. Liu, Z.M. Qi, S.Y. Wang, S.X. Liu, X. Li, X.C. Xia // *Current Medicinal Chemistry.* – 2013. – V. 20. – N. 23. – P. 2899-2913.
205. Wang, J. Extremophilic Exopolysaccharides: A Review and New Perspectives on Engineering Strategies and Applications / J. Wang, D.R. Salem, R.K. Sani // *Carbohydrate Polymers.* – 2019. – V. 205. – P. 8-26.
206. Wang, S. Control of temperature on microbial community structure in hot springs of the Tibetan Plateau / S. Wang, W. Hou, H. Dong, H. Jiang, L. Huang, G. Wu // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – N. e62901.
207. Ward, D.M. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities / D.M. Ward, M.J. Ferris, S.C. Nold, M.M.

- Bateson // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 1998. - V. 62. - P.1353-1370.
208. Ward, D.M. Cyanobacteria in geothermal habitats / D.M. Ward, R.W. Castenholz // The Ecology of Cyanobacteria by B. A. Whitton, M. Potts. – 2000. - Kluwer Academic Publishers. – P. 37-59.
209. Weiner, S. An overview of biomineralization and the problem of the vital effect / S. Weiner, P.M. Dove // Reviews in Mineralogy and Geochemistry. – 2003. – V. 54. – P. 1–31.
210. Wen, Z. F. Current study on genesis and formation conditions of stromatolites / Z. F. Wen., J.H. Zhong, Y. Li, Z.Q. Guo, J.B. Gao, X.L. Xu // Geological Journal China University. – 2004. – V. 10. – N. 3. – P. 418–428.
211. Westall, F. The experimental silicification of microorganisms / F. Westall, L. Boni, E. Guerzoni // Paleontology. – 1995. – V. 38. – P. 495-528.
212. Wiegel, J. Alkalithermophiles / J. Wiegel, V.V. Kevbrin // Biochem. Soc. Trans. - 2004. - Vol. 32. - part 2. - P. 193-198.
213. Williams, R.A.D. *Thermus oshimai* sp. nov., isolated from hot springs in Portugal, Iceland, and the Azores, and comment on the concept of a limited geographical distribution of *Thermus* species / R.A.D. Williams, K.E. Smith, S.G. Welch, J. Micallef // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1996. - V. 46. - P. 403-408.
214. Wilson, K. Preparation of Geomic DNA from Bacteria // Current Protocols in Molecular Biology. – 2001
215. Whitaker, R.J. Geographical barriers isolate endemic population of hyperthermophilic archaea / R.J. Whitaker D.W. Grogan, J.W. Taylor // Science. – 2003. V. 301. – P. 976–978.
216. Whitney, J.C. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gramnegative bacteria / J.C. Whitney, P.L. Howell // Trends in Microbiology. – 2013. – V. 21. – N. 2. – P. 63-72.
217. Woese, C. R. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya / C.R. Woese, O. Kandler, M. L. Wheelis // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1990. – V. 87. – P. 4576–4579.

218. Wu W.-L. The discovery of novel heat-stable keratinases from *Meiothermus taiwanensis* WR-220 and other extremophiles / Wu W.-L., M.-Y. Chen, I.-F. Tu, Y.-C. Lin, N. EswarKumar, M.-Y. Chen, M.-C. Ho, S.-H. Wu // *Nature*. – 2017. – V.7. – N. 4658.
219. Yang, L. *Thauera hydrothermalis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from hot spring / L. Yang, J.B. Muhadesi, M.M. Wang, B.J. Wang, S.J. Liu, C.Y. Jiang // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2018. – V. 68. – N. 10. – P. 3163-3168.
220. Yang, Y. *Deinococcus aerius* sp. nov., isolated from the high atmosphere / Y. Yang, T. Itoh, S. Yokobori // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. – 2009. – V. 59. – P. 1862–1866.
221. Yang, Y. *Deinococcus aetherius* sp. nov., isolated from the stratosphere / Y. Yang, T. Itoh, S. Yokobori // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. – 2010. – V. 60. – P. 776–779.
222. Yee, N. The effect of cyanobacteria on silica precipitation at neutral pH: Implications for bacterial silicification in geothermal hot springs / N. Yee, V.R. Phoenix, K.O. Konhauser, L.G. Benning, F.G. Ferris // *Chemical Geology*. – 2003. – V. 199. – P. 83-90.
223. Yuan, H. Z. Microbial autotrophy plays a significant role in the sequestration of soil carbon / H. Z. Yuan, T. D. Ge, C. Y. Chen, A. G. O'Donnell, J. S. Wu // *Appl. Environ. Microb*. – 2012 a. – V. 78. – P. 2328–2336.
224. Yuan, H. Z. Longterm field fertilization alters the diversity of autotrophic bacteria based on the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) large-subunit genes in paddy soil / H. Z. Yuan, T. D. Ge, X. H. Wu, S. L. Liu, C. L. Tong, H. L. Qin, M. N. Wu, W. X. Wei, J. S. Wu // *Appl. Microbiol. Biot*. – 2012 b. – V. 95. – P. 1061–1071.
225. Yuan, M. *Deinococcus gobiensis* sp. nov., an extremely radiation-resistant bacterium / M. Yuan, W. Zhang, S. Dai // *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol*. – 2009. – V. 59. – P. 1513–1517.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1. Карбоксисома внутри бактериальной клетки. Фиксация CO₂ с помощью фермента RuBisCO (Bonacci et al., 2011; Yeates et al., 2008)
2. Рисунок 2. Карта расположения минеральных источников Байкальской рифтовой зоны: 1 - Сея, 2- Умхэй, 3 – Алла, 4 – Гарга, 5 – Гарга, 6 – Горячинск
3. Рисунок 3. Biplot анализа основных компонент (PCA) 11 физико-химических параметров
4. Рисунок 4. Филогенетическое разнообразие сообщества микробных матов гидротермы Алла (станция 1, станция 3, станция 5).
5. Рисунок 5. Разнообразие микробного сообщества гидротермы Алла (станции 3) в различных биотопах (Al-3w – вода; Al-3m – микробный мат; Al-3s – донный осадок)
6. Рисунок 6. Разнообразие микробного сообщества термального источника Гарга в различных биотопах станции Ga-2
7. Рисунок 7. Разнообразие бактериального сообщества микробного мата гидротермы Сеюя
8. Рисунок 8. Таксономическое разнообразие бактерий микробного мата источника Умхэй
9. Рисунок 9. Таксономический состав бактериального сообщества микробного мата источника Горячинск
10. Рисунок 10. Таксономическое разнообразие микробных матов гидротерм БРЗ, полученное по результатам метагеномного анализа ампликона гена 16S рРНК
11. Рисунок 11. Анализ соответствий доминирующих филумов в микробном сообществе гидротерм от физико-химических параметров
12. Рисунок 12. Распространение бактерий родов *Meiothermus* и *Thermus* в микробных матах гидротерм БРЗ
13. Рисунок 13. Распространение бактерий родов *Meiothermus* и *Thermus* в воде гидротерм БРЗ
14. Рисунок 14. Фото культур гетеротрофных бактерий (субстрат-соетон), шкала 1 мкм, электронный микроскоп: а – Se-14-2 (донный мат), b – Um-14-2; c – Gor-14-1
15. Рисунок 15. Фото культур гетеротрофных бактерий (субстрат-ацетат, пируват), шкала 1 мкм, электронный микроскоп: а – Al-14-3 (на ацетате, пирувате); b – Ku-14-2; c – Ga-14-3
16. Рисунок 16. Фото культур гетеротрофных бактерий (субстрат-сахароза), шкала 1 мкм, электронный микроскоп: а – Al-14-3 (на сахарозе); b – Gor-14; c – Al-15 (желт. колонии)
17. Рисунок 17. Фазово-контрастная микроскопия клеток штамма Al-14-3, выделенного из Аллинского источника (а, b). Культура на жидкой среде (с). Трансмиссионная электронная микроскопия: (d,e) – ультратонкие срезы: ПГ — пептидогликан, ВС — внешний слой, ПС — включения полисахаридов.

18. Рисунок 18. Морфология нитчатой зеленой бактерии Al-14-1 из гидротермы Алла. Фото световой микроскоп
19. Рисунок 19. Культура Um-14 на жидкой среде (а). Фазово-контрастная микроскопия клеток штамма (b). Трансмиссионная электронная микроскопия: (с) – ультратонкие срезы
20. Рисунок 20. Культура Ga-14 на жидкой среде (а) и на агаризованной. Трансмиссионная электронная микроскопия: (b) – ультратонкие срезы. Фазово-контрастная микроскопия клеток штамма (b, c, d)
21. Рисунок 21. Филогенетическое положение органотрофных бактерий (штаммы Al-14-3, Al-15-1 p., Um-14-2, Ga-14-2, Al-15-1ж). Построено на основе анализа фрагмента гена 16S рРНК с использованием метода “neighbor-joining”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap” анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%)
22. Рисунок 22. Филогенетическое дерево штаммов Al-14-1, построенное на основе анализа фрагмента гена 16S рРНК с использованием метода “neighbor-joining”
23. Рисунок 23. Температурный диапазон роста выделенных культур рода *Meiothermus*
24. Рисунок 24. Спектр поглощения пигментов экстрактов клеток штаммов *Meiothermus* и *Thermus*
25. Рисунок 25. Филогенетическое дерево изучаемых штаммов и представителей рода *Meiothermus* и *Thermus*. Построено на основе анализа аминокислотных последовательностей фрагмента гена *cbbL* с использованием метода “neighbor-joining”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap” анализа
26. Рисунок 26. Образование сульфата SO_4^{2-} штаммами Al-14 (а) и Um-14 (b) из тиосульфата
27. Рисунок 27. Общая пептидазная активность по азоказеину
28. Рисунок 28. Активность пептидаз по субстрату ВАРА: А- рост на пептоне; В- рост на глюкозе
29. Рисунок 29. Активность пептидаз по субстрату GlpAALpNa: А- рост на пептоне; В- рост на глюкозе
30. Рисунок 30. Активность пептидаз по субстрату LpNA: А -рост на пептоне; В- рост на глюкозе
31. Рисунок 31. Температурные оптимум и стабильность субтилизин-подобной пептидазы GlpAALpNa штамма Ga-14-2
32. Рисунок 32. Температурные оптимум и стабильность субтилизин-подобной пептидазы GlpAALpNa штамма Al-14-3

33. Рисунок 33. рН оптимум и стабильность субтилизин-подобной пептидазы GlpAALpNa штамма Ga-14-2
34. Рисунок 34. рН оптимум и стабильность субтилизин-подобной пептидазы GlpAALpNa штамма Al-14-3
35. Рисунок 35. рН оптимум и стабильность аминопептидазы LpNA штамма Um-14-2
36. Рисунок 36. Дифрактограмма образца мата источника Алла
 ■ Кальцит, *syn* - CaCO_3 ■ Анортит - $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$ ◆ Кальцит β - CaCO_3
 ▲ Натрий-алюминиевый силикат - $\text{Na}_{1.82}\text{Al}_2\text{Si}_5\text{O}_{10}\text{H}_7.91$
37. Рисунок 37. Минералы кальцита, формирующиеся в микробном мате источника Алла: а – эллипсоидальные кристаллы кальцита; b – минералы неправильной формы; c, d – ограненные кристаллы; Фото: сканирующий микроскоп, шкала $\times 30$ -200 мкм
38. Рисунок 38. Отложения кальцита и опала в цианобактериальном мате гидротермы Гарга: а – зерна кальцита с прорезьями от нитей цианобактерий; b – плотный слой, состоящий из опала (аморфного кремнезема) и их химический состав; фото: сканирующий микроскоп
39. Рисунок 39. Окремнение в цианобактериальном мате гидротерм: а, с – Сеюя; b – Умхэй; Фото: сканирующий микроскоп, шкала $\times 30$ -50 мкм
40. Рисунок 40. Дифрактограмма образца мата гидротермы Умхэй
 ■ Альбит, состава $(\text{Na},\text{Ca})\text{Al}(\text{Si},\text{Al})_3\text{O}_8$ ■ Кварц α - SiO_2 ◆ Микроклин KAlSi_3O_8
41. Рисунок 41. Отложения пирита в гидротермах: а – фрамбоид пирита в микробном мате источника Кучигер; b – его химический состав; c, d – россыпи отдельных кристаллитов пирита в микробном мате Умхэя; Фото: сканирующий микроскоп, шкала $\times 10$ -50 мкм
42. Рисунок 42. ИК-спектр стандартного образца альгиновой кислоты (2) и суммарной фракции КРПС из образца Se-14 (1)