

**РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТ – ДЕСТРУКТОРОВ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ  
МЕСТООБИТАНИЙ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ**

**Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В., Бархутова Д.Д., Банзаракцаева Т.Г.  
Намсараев Б.Б.**

**Отв. редактор д.б.н., проф. Намсараев Б.Б.**

**Рецензенты**

**д.б.н Абидуева Е.Ю.**

**к.б.н. Данилова Э.В.**

**к.б.н. Алексеева Е.В.**

Улан-Удэ

2012

Учебное пособие: «Разнообразие экстремофильных прокариот - деструкторов экстремальных местообитаний Байкальской рифтовой зоны» составлено на основе опыта экспедиционных работ и базируется на многолетнем экспериментальном материале по изучению микроорганизмов в экстремальных местообитаниях Байкальского региона. Основной задачей при написании данного пособия авторы считали ознакомление студентов и аспирантов со свойствами, классификацией, распространением и экологической функцией гидролитических микроорганизмов экстремальных местообитаний Байкальского региона.

В первой главе представлены сведения о структуре и функционированию микробных сообществ экстремальных экосистем. Пособие знакомит с распространением и экологическими функциями гидролитических микроорганизмов в деструкции органического вещества

Во второй главе описана методика исследования экстремофильных микроорганизмов.

В третьей главе приведена морфологическая, экофизиологическая и генотипическая характеристики выделенных гидролитических бактерий. Представлен обзор биологического разнообразия микроорганизмов и состава микробных сообществ, дана функциональная характеристика составляющих компонентов микробного сообщества.

Предлагаемое Вашему вниманию учебное пособие предназначено для студентов, аспирантов и преподавателей биологических специальностей.

## СОДЕРЖАНИЕ

	<b>Стр.</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>2</b>
<b>ГЛАВА 1. Структура и функционирование микробных сообществ экстремальных экосистем</b>	<b>4</b>
<b>1.1.</b> Термофильные микроорганизмы	<b>5</b>
<b>1.2.</b> Алкалифильные микроорганизмы	<b>10</b>
<b>1.3.</b> Адаптация микроорганизмов к экстремальным условиям	<b>14</b>
<b>1.3.1.</b> Механизмы температурных адаптаций	<b>15</b>
<b>1.3.2.</b> Механизмы pH адаптаций	<b>17</b>
<b>ГЛАВА 2. Методы исследования</b>	<b>19</b>
<b>2.1.</b> Физико-химические методы	<b>19</b>
<b>2.2.</b> Методы выделения чистых культур гидролитических микроорганизмов	<b>19</b>
<b>2.3.</b> Изучение экофизиологических свойств гидролитических бактерий	<b>20</b>
<b>2.4.</b> Метод определения скорости деструкции органического веществ (ОВ)	<b>20</b>
<b>2.5.</b> Методы молекулярно-генетического анализа	<b>21</b>
<b>ГЛАВА 3. Распространение и экологические функции гидролитических микроорганизмов в деструкции органического вещества</b>	<b>23</b>
<b>3.1.</b> Изучение разнообразия экстремальных местообитаний методом пиросеквенирования	<b>26</b>
<b>3.2.</b> Характеристика гидролитических бактерий, выделенных из термальных источников Забайкалья	<b>34</b>
<b>3.2.1.</b> Морфологическая характеристика гидролитических бактерий	<b>36</b>
<b>3.2.2.</b> Генотипические свойства и филогенетическое положение выделенных культур	<b>40</b>
<b>3.2.3.</b> Экофизиологическая характеристика гидролитических бактерий	<b>45</b>
<b>Литература</b>	<b>49</b>

## **ГЛАВА 1. Структура и функционирование микробных сообществ экстремальных экосистем**

Термальные источники и содовые озера являются уникальными водными экосистемами, характеризующиеся высокой температурой и высокими значениями pH, которые создают благоприятные условия для развития термофильных и алкалифильных прокариот в водной толще и донных отложениях. Поэтому такие местообитания оказались удобным полигоном для изучения экстремофильного микробного сообщества.

В геологии принято считать воды термальными, если их температура превышает 20°C. С точки зрения микробиологии, важной температурной границей является температура 45°C. Эта температура позволяет разделить местообитания с доминированием мезофильных (с оптимумом около 30°C и максимумом до 45°C) и термофильных (с оптимумом около 50°C) микроорганизмов (экология водных микроорганизмов (ссылка))

Значение pH, отделяющее щелочные воды от нейтральных, принимается за 8,0-8,5. Эта граница позволяет исключить из рассмотрения широко распространенный тип углекислых термальных вод со значением pH от 4,5 до 8,5, в водах которых присутствует карбонат кальция. При pH выше 8,5 воды становятся натриевыми, щелочность таких вод обуславливается присутствием соды, либо присутствием силикатов или боратов. С точки зрения микробиологии значение pH 8,5 позволяет отделить местообитания с доминированием алкалифильных микроорганизмов (оптимум pH выше 8,5) [Заварзин, Колотилова, 2001].

Микробные сообщества термальных и щелочных водных систем представляют собой полноценные функциональные системы, эффективно осуществляющие круговорот биогенных элементов в процессах продукции и деструкции органического вещества [Заварзин, 1999].

Структура и функциональное разнообразие микробного сообщества во многом зависят от содержания акцепторов электронов, биогенных элементов и веществ. Синтезируемое фототрофными и хемолитотрофными микроорганизмами органическое вещество подвергается аэробной и анаэробной деструкции. 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].

Изучение видового разнообразия и функционирования микробного сообщества успешно проводятся благодаря комплексным исследованиям с применением традиционных и молекулярно-биологических методов. Использование современных молекулярно-биологических методов привело к созданию обширной базы данных термофильных микробных сообществ, не известных в лабораторных культурах [Бонч-Осмоловская, 2011].

Традиционно, для характеристики состава микробных сообществ используются микробиологические методы, предполагающие получение чистых культур микроорганизмов с последующей микробиологической и биохимической характеристикой. Молекулярные методы, основанные на ПЦР-амплификации фрагментов генов 16S рРНК и их секвенировании, позволили показать разнообразие прокариот микробного сообщества. Альтернативой традиционным методам секвенирования является метод пиросеквенирования, дающий возможность проведения единовременного определения нескольких сот тысяч нуклеотидных последовательностей.

Метод пиросеквенирования характеризует микробное сообщество, выявляя не только доминирующие микроорганизмы, но и минорные компоненты сообщества, которые играют важную экологическую роль в водных системах.

### **1.1. Термофильное микробное сообщество**

#### *Продуценты органического вещества*

Продукционную часть микробных сообществ термальных источников можно разделить на два типа: с доминированием фототрофных микроорганизмов и с доминированием хемотрофных микроорганизмов. Хемотрофные сообщества часто развиваются в виде обрастаний. Фототрофные сообщества в гидротермах, при отсутствии выедания со стороны эукариотных организмов, могут обладать значительной биомассой и образовывать микробные маты - органо-минеральные структуры, отличающиеся от бактериальных обрастаний своей оструктуренностью (слоистостью) [Cohen et al., 1989]. Граница между фототрофными и хемотрофными сообществами определяется, по-видимому, устойчивостью фотосинтетического аппарата к факторам окружающей среды, в первую очередь к температуре [Brock, 1978].

Микробные сообщества в гидротермах образуют так называемые микробные маты. В гидротермах с нейтральными и щелочными значениями рН доминируют циано-бактериальные маты, в которых цианобактерии являются основными продуцентами ОВ и отвечают за структуру мата [Герасименко, Ушатинская, 2002; Намсараев и др., 2006]. В

них взаимодействуют представители разных трофических групп микроорганизмов, осуществляющих полный цикл биогенных элементов [Заварзин, 2003].

### *Деструкторы органического вещества*

Одновременно с первичной продукцией в микробном сообществе идет деструкция ОВ, осуществляемая различными функциональными группами микроорганизмов. Деструкция обусловлена целой цепью превращений, организованной таким образом, что продукты одного этапа служат питательным субстратом для организмов, осуществляющих следующий этап [Заварзин, 1984].

В деструкции органического вещества минеральных источников участвуют аэробные и анаэробные микроорганизмы различных физиологических групп (рис. 1). На первых этапах деструкции основная роль принадлежит бактериям-гидролитикам [Заварзин, Колотилова, 2001; Заварзин, 2003]. В присутствии кислорода аэробные микроорганизмы окисляют органическое вещество до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , синтезируя при этом клеточную биомассу. Аэробные органотрофы очень разнообразны и представляют группу, привлекающую больше всего внимания на уровне чистых культур [Заварзин, 2001]. Последующее сбраживание продуктов гидролиза завершается полным окислением продуктов брожения в терминальных реакциях метаногенеза и сульфидогенеза. В результате биохимических процессов происходит полная минерализация ОВ до  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ . Сульфидогенез и метаногенез находятся в конкурентной зависимости, преобладание того или другого процесса определяется содержанием сульфатов [Бонч-Осмоловская, 1986; Заварзин и др., 1989; Намсараев, 1994; Ward et al., 1984; Kuhl, Fenchel, 2000].

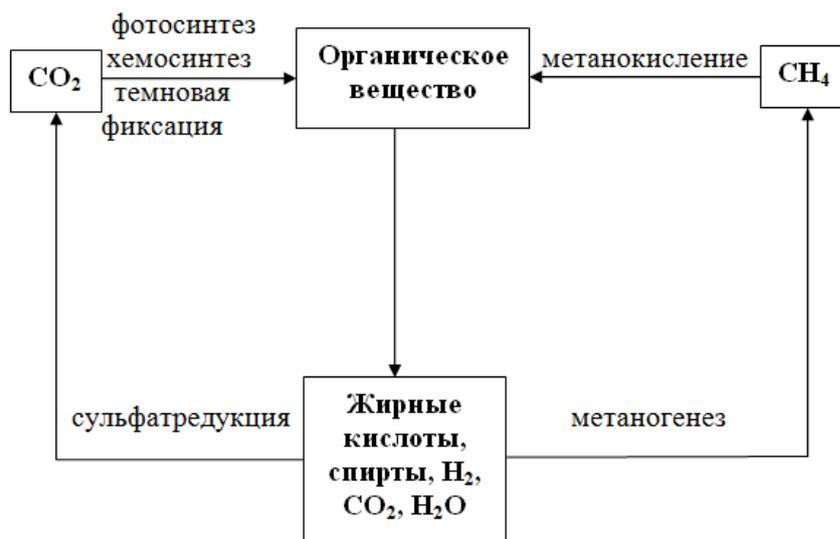


Рисунок 1. Схема продукции и деструкции органического вещества в гидротермах

Гидролиз полимеров приводит к созданию резервуара мономеров (сахара, пептиды, аминокислоты, нуклеотиды, жирные кислоты), которые служат субстратами для бродильщиков (рис. 2). На второй стадии момеры сбраживаются бактериями-бродильщиками с образованием ряда более простых соединений – низших жирных кислот, таких, как пропионат, бутират, лактат, пируват и спиртов – метанола, этанола, пропанола, бутанола. В числе продуктов брожения часто присутствует водород [Гусев, Минеева, 2003]. Стадии гидролиза и брожения осуществляет гетерогенная микрофлора: клостридиальные формы бактерий, гидролизующие целлюлозу, пектин, липиды и жирные кислоты до мономеров, бактерии гетероферментативного молочнокислого брожения [Кузнецов и др, 1985; Заварзин, 2001]. На третьей ацетогенной или водородогенной стадии различные восстановленные продукты брожения превращаются в ацетат,  $H_2$ ,  $CO_2$ . Терминальными этапами деструкции органического вещества являются конкурирующие за доноры электронов микробные процессы сульфатредукции и метаногенеза. При этом, в условиях достаточного количества сульфатов распад органического вещества идет в основном по пути более термодинамически выгодного восстановления сульфатов при участии сульфатвосстанавливающих бактерий до сероводорода и углекислоты, а при недостатке  $SO_4^{2-}$  – с образованием метана и углекислоты.

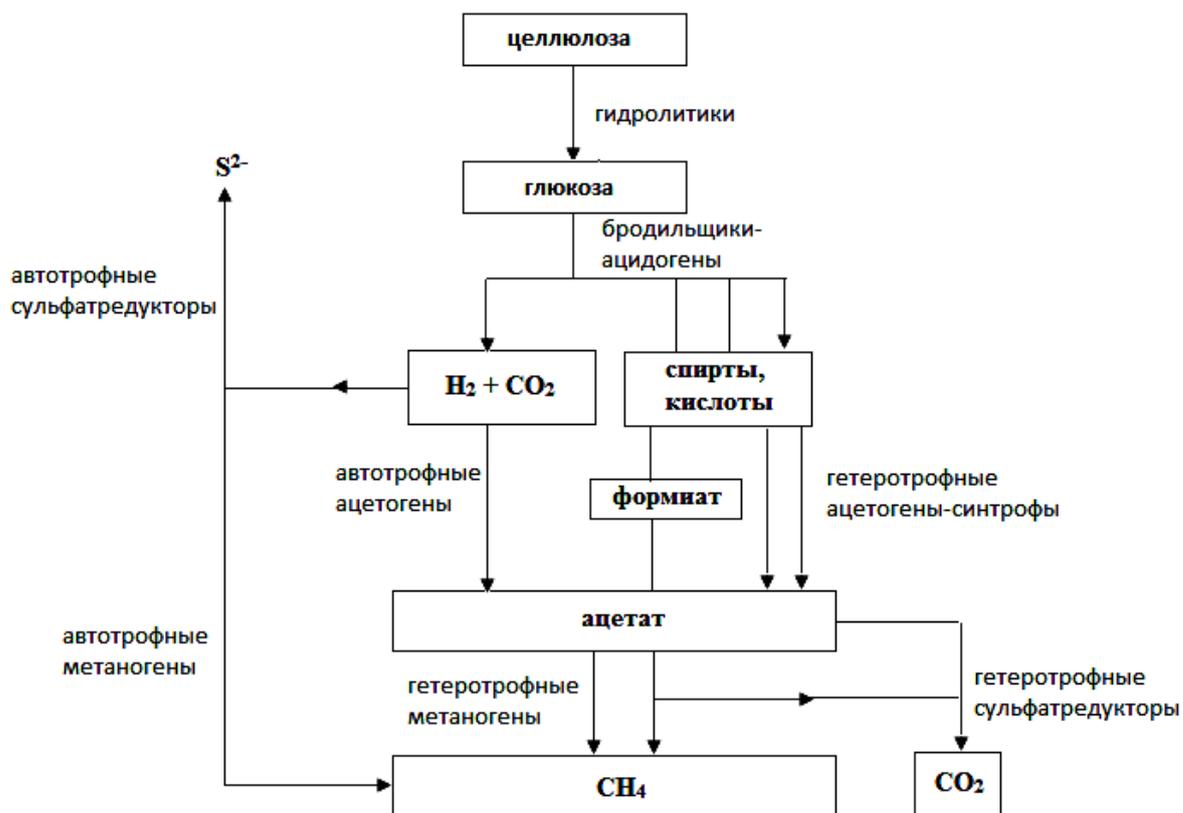


Рисунок 2. Схема деструктивного сообщества [Пиневиц, 2007б]

Из горячего источника Исландии при 85-88<sup>0</sup>С выделены аэробные органотрофные бактерии *Thermus scotoductus* и *T. brockianus*. [Hjorleifsdottir et al., 2001]. *T. brockianus* также был выделен из гидротерм Камчатки и Йеллоустоунского национального парка [Chung et al., 2000]. *T. filiformis* выделен из источников Новой Зеландии [Kristjansson et al., 2000]. *T. aquaticus* встречается только на территории США, несмотря на попытки выделения в гидротермах Исландии и др. местообитаниях [Alfredsson, Kristjansson, 1995].

Выделенные из пластовой воды высокотемпературных нефтяных месторождений аэробные термофильные организмы принадлежали к родам *Bacillus* и новому роду *Geobacillus*, предложенному Т.Н. Назиной [Nazina et al., 2001, 2004, 2005; Назина и др., 2000, 2002; Попова и др., 2002]. Все геобациллы являются облигатными термофилами с оптимумами развития рН 6,5-7,2. Термофильные аэробные бактерии были обнаружены в ядрах углеводородсодержащих пород в штате Вирджиния (США) на глубине около 2 км [Onstott et al., 1998].

Аэробные органотрофные бактерии рода *Anoxybacillus* представлены небольшой группой бактерий с оптимальными температурами роста 50-80<sup>0</sup>С, некоторые имеют оптимальные значения рН выше 8,0. В ее состав включены как впервые выделенные организмы *A. amylolyticus*, *A. ayderensis*, *A. contaminans*, *A. gonensis*, *A. kamchatkensis*, *A. kestanbolensis*, *A. pushchinensis*, *A. voinovskiensis*, так и ранее известная, но относившаяся к роду *Bacillus*, бактерия *A. flavithermus* [Belduz et al., 2003; Dulger et al., 2004; Heinen et al., 1982; Kevbrin et al., 2005; Pikuta et al., 2000]. Из гидротерм Байкальской рифтовой зоны была выделена *A. mongoliensis* [Namsaraev et al., 2010]. Аэробные термофильные алкалолотерантные и алкалофильные бактерии, выделенные из термальных источников, описаны как представители рода *Bacillus* (*B. pallidus*, *B. thermocloaceae*, *B. thermoaerophilus*), рода *Meiothermus* (*M. chliarophilus*, *M. rosaceus*, *M. silvanus*), "*Geobacillus caldotenax*", рода *Thermus* (*T. antranikianus*, *T. igniterrae*, *T. oshimai*, *T. thermophilus*) *Sphaerobacter thermophilus*, *Thermoaerobacter subterraneus*, *Thermomicrobium roseum*, *Isosphaera pallida*, *Rubrobacter xylanophilus* [Chen et al., 2002; Nobre et al., 1996; Ward et al., 1998; Wiegel, 1998; Williams et al., 1995, 1996; Yamamoto et al., 1998].

Из щелочных субаквальных источников фьорда Эйджафьордур (Исландия), выделены аэробные органотрофные микроорганизмы способные существовать в лабораторных условиях при рН 10 и температуре 60-72<sup>0</sup>С. По результатам анализа 16S рРНК изоляты были отнесены к видам *Geobacillus thermoleovorans*, "*G. caldotenax*", *G. flavothermus*, *G. caldovelox* [Marteinsson et al., 2001].

Распространение аэробных бактерий-деструкторов органического вещества ранее было эпизодически изучено в некоторых гидротермах Забайкалья [Бархутова, 2000; Бонч-

Осмоловская, Мирошниченко, 1995; Намсараев, 2003; Намсараев и др., 2003; Храпцова и др., 1984; Зайцева, 2004; Nazina et al., 2004, Бабасанова, 2007; Шагжина, 2007].

Аэробные протеолитики, целлюлолитики и сапрофиты обнаружены в горячих сероводородных источниках Забайкалья. Их количество варьировало в зависимости от места отбора пробы. Максимальная численность аэробных протеолитиков составляла 100 тыс. кл/мл. Наиболее высокие значения численности бактерий-протеолитиков выявлены в источниках Кучигер и Умхей.

Из щелочных термальных источников Алла, Гарга, Кучигер, Горячинск и Большая речка выделены аэробные термофильные пептолитические бактерии, растущие в диапазоне температур 55-70<sup>0</sup>С и рН 8,0-9,5. Термофильные аэробные амилолитические бактерии выявлены в горячих Большереченских источниках. Они представлены быстро растущими палочковидными формами, растущими на крахмале при 60<sup>0</sup>С и рН 7,5-9,2 [Бонч-Осмоловская, Мирошниченко, 1995].

Исследования по выделению и изучению экстремально-термофильных алкалофильных аэробных органотрофных бактерий *Thermus flavus* и нового вида *T. ruber* проводились Логиновой с сотрудниками в горячих источниках Бурятии: Алла и Гусиха [Храпцова и др., 1984]. Оптимальная температура роста для *T. flavus* была 70-75<sup>0</sup>С, оптимум рН 8,0. В отличие от известных ранее видов этого рода, *T. ruber* рос оптимально при 60-65<sup>0</sup>С, т.е. являлся умеренным термофилом. Впоследствии он был перенесен в новый род сем. Thermaceae – *Meiothermus*. Из Аллинского источника (Бурятия) был выделен штамм *Meiothermus ruber*, растущий при температурах от 45 до 60<sup>0</sup>С и в диапазоне рН от 7,0 до 9,5 [Намсараев, 2003].

Из термального источника Гарга (Северное Прибайкалье) Т.Н. Назиной [2004], выделена новая термофильная спорообразующая бактерия *Geobacillus gargiensis*, утилизирующая различные сахара, карбоновые кислоты и углеводороды. Оптимум температуры развития культуры составлял 60-65<sup>0</sup>С и рН 7,0-8,5.

Исследования по выделению, идентификации аэробных органотрофных бактерий в щелочных термальных источниках Байкальского региона проведены О.Б. Бабасановой [2007]. Было показано, что доминирующими физиологическими группами как в илах, так и в микробных матах гидротерм были протеолитические бактерии, максимальные численности которых достигали 1 млн. кл/мл. Количество бактерий, гидролизующих углеводы, варьировало от 100 до 100 тысяч кл/мл. Практически во всех источниках численность сахаролитических гидролитиков была на порядок выше в микробных матах, чем в донных отложениях. Максимальные значения количества амилолитических и целлюлозоразлагающих бактерий не превышали 10 тысяч кл/мл. Было выделено 23

штамма алкалотолерантных органотрофных спорообразующих бактерий, способных развиваться в широком диапазоне температур от 37 до 75<sup>0</sup>С. В результате анализа гена 16S рРНК исследуемые штаммы являются представителями родов *Bacillus* и *Anoxybacillus*.

В щелочных источниках выделены и описаны алкалотермофильные бактерии цикла азота: денитрифицирующий штамм DAT (1,34 нм N- N<sub>2</sub>O /10<sup>7</sup> кл. ч) близкородственный к *B.licheniformis*, обладающий также и нитрогеназной активностью 0,226 N<sub>2</sub>/10<sup>7</sup> кл. ч; аммонифицирующий штамм П1 представитель рода *Anoxybacillus* - активный продуцент внеклеточных сериновых протеаз трипсиноподобного типа с оптимумом активности фермента при 65<sup>0</sup>С и рН 10,5; нитритоксилющий штамм *Nitrospira sp.*, с максимальной скоростью окисления нитритов при 48 °С и рН 8,7. Численность азотфиксаторов, аммонификаторов, нитрификаторов и денитрификаторов составляет от 1,7 × 10<sup>1</sup> до 7,0 × 10<sup>8</sup> кл./мл. [Шагжина, 2007].

Также проведен ряд работ по изучению микромицетов термальных источников Баргузинской долины (Северное Прибайкалье) [Базаржапов, 2005; Георгиева, 2006, Лаврентьева и др., 2008]. Микромицеты как неотъемлемый компонент водных биоценозов является экологически обособленной группой организмов, принимающих участие в круговороте биогенных элементов. Активная роль микроскопических грибов в процессах трансформации веществ обусловлена присущей им высокой ферментативной активностью и физиологической пластичностью. В результате исследований выявлено 20 родов микромицетов, которые относятся к 3 подотделам - *Zygomycotina*, *Ascomycotina* и *Deuteromycotina* (представители последнего подотдела наиболее многочисленны). Среди них новый вид гриба *Heleococcum alkalinum* Bilanenko et Ivanova [Георгиева, 2006]. Количественное определение микроскопических грибов показало, что в термальных источниках их численность невысока, но с понижением температуры в ручьях численность возрастает.

Последние исследования функциональной активности микробного сообщества гидротерм Байкальской рифтовой зоны показали, что сульфатредукция является доминирующим процессом на терминальных этапах деструкции органического вещества [Намсараев и др., 2006]. Это обусловлено тем, что термальные воды исследованных источников содержат сульфат в высоких концентрациях, поэтому сульфатредукция доминирует, как и в других минеральных водах [Ward et al., 1984; Горленко, Бонч-Осмоловская, 1989].

## **1.2. Алкалифильное микробное сообщество**

### *Продуценты органического вещества*

В содовых озерах Забайкалья первичными продуцентами ОВ являются кокковидные и нитчатые цианобактерии, а также фотосинтезирующие пурпурные бактерии и зеленые нитчатые бактерии *Oscillochloris sp.* [Горленко и др., 1999].

В высокоминерализованных водоемах характерны такие вторичные вселенцы, как зеленая одноклеточная водоросль *Dunaliella viridis*, выделенная из озера Магади в рассоле с 250 г/дм<sup>3</sup> соды.

К вторичным фототрофным продуцентам, использующим продукты обмена микробного сообщества, относятся анаэробные аноксигенные фототрофы с доминированием видов рода *Ectothiorhodospira*. Серные фототрофы регенерируют сульфат, восстанавливаемый сульфатредукторами, и совместно с ними выполняют роль конечных деструкторов. Аноксигенные фототрофные бактерии присутствуют в микробном сообществе содовых озер иногда в значительном количестве, придавая воде озер малиновую окраску [Горленко, 2007].

#### *Деструкторы органического вещества*

Деструкционная часть микробного сообщества содово-соленых экосистем представлена алкалифильными микроорганизмами, относящихся к разным систематическим группам, и физиологически являющиеся аэробами и анаэробами. В аэробных условиях деструкция осуществляется по трем основным путям: сахаролитическому, под которым подразумевается разложение безазотистых соединений, протеолитическому - для азотистых соединений и липолитическому – для жиров. Характерными представителями сахаролитического пути, который включает разложение низкомолекулярных веществ и органических кислот, могут считаться, прежде всего, алкалифильные галомонады. Для протеолитического типа типичными представителями могут служить разнообразные алкалифильные бациллы [Horikoshi, 1999].

Алкалифильные аэробные органотрофные бактерии преобладают в низкоминерализованных содовых озерах. Большинство изолятов – это грам-отрицательные бактерии, представители  $\gamma$ 3-подгруппы Proteobacteria, относящихся к членам семейства *Halomonadaceae* [Romano, 1996, 2005]. Другие грам-отрицательные изоляты относятся к группе 1 *Pseudomonas*. Грам-положительные изоляты более распространены. Обнаружены микроорганизмы с высоким и низким содержанием Г+Ц в ДНК. Бактериями с высоким содержанием Г+Ц являются представители родов *Arthrobacter*, *Terrabacter* и *Dietzia*. Бактериями с низким содержанием Г+Ц, в основном являются представители бацилл: *Bacillus alcalophilus*, *B. agaradherens* и *B. clarkii* [Nielsen, 1994; Jones et al., 1998].

Из оз. Богория (Африка) выделены бациллы, обладающие внеклеточными щелочными амилазами, активными при pH 10 и температуре 55°C [Hashim et al., 2004]. Также амилотической активностью обладает новый род *Alkalimonas* [Ma et al., 2004]) и изоляты, выделенные из оз. Элементейта (Кения), содовых озер Китая и Эфиопии [Martins et al., 2001]. Липолитические организмы в основном относятся к псевдомонадам, а штамм из оз. Натрон принадлежал к роду *Stenotrophomonas* [Dobson, 1996; Franzmann, 1998]. Липолитики, выделенные из оз. Богория принадлежат р. *Halomonas*, близкими *H. desiderata*, и представителям рода *Bacillus*, близкими *B. halodurans*, *B. alcalophilus*, *B. licheniformis* [Denariiaz, 1986; Berendes, 1996].

Анаэробные органотрофные алкалифилы до начала исследований сотрудниками академика Заварзина Г. А. [Заварзин, 1993; Zhilina, Zavarzin, 1994] практически не были исследованы. В настоящее время получена довольно полная картина структуры и функционального разнообразия алкалифильного сообщества с выделением в чистую культуру представителей различных функциональных групп [Жилина, 2007].

Возможность развития целлюлозоразлагающего сообщества в условиях высокой карбонатной щелочности и pH 10 была установлена получением активных накопительных культур на целлюлозе из содового оз. Магади [Zhilina and Zavarzin, 1994]. Филогенетический анализ накопительных целлюлозоразлагающих культур из озер Вадиль-Натрун позволил идентифицировать целлюлазные гены в этих культурах [Grant et al., 2004].

Принципиальная возможность разложения целлюлозы в анаэробных условиях была показана на примере модельных экосистем низкоминерализованных содовых озер Тывы и Бурятии [Кевбрин, 1997]. Чистая культура целлюлозолитической анаэробной алкалифильной бактерии *Clostridium alkalicellulosi* была выделена из проб низкоминерализованного содового озера Верхнее Белое [Жилина и др., 2005].

Целлюлозолитики находятся в начале трофической цепи и дают возможность развитию первичных анаэробов сахаролитического пути в сообществе.

Из сахаролитических анаэробов алкалофильного сообщества содовых озер были выделены спирохеты [Zhilina et al., 1996a; Кевбрин, 1997; Hoover, 2003]. В анаэробном сообществе спирохеты занимают функциональное положение диссипотрофов – организмов, метаболическая активность которых ограничена водорастворимыми сахарами, используют низкомолекулярные вещества, рассеиваемые из мест их разложения гидролитами. Из оз. Верхнее Белое (Бурятия) выделены бактерии *Alkalibacter saccharofermentans* [Garnova et al., 2004], *Anoxynatronum sibiricum* [Garnova et al., 2003] и первый анаэробный алкалифильный микроорганизм *Clostridium alcalicellum*, разлагающий

целлюлозу [Жилина и др., 2005]. Сахаролитические бактерии занимают промежуточное положение между гидролитами и вторичными анаэробами.

Широкое распространение аэробных алкалифильных органотрофных бактерий разных физиологических групп отмечено в содовых озерах Забайкалья [Кулырова, 1999, Банзаракцаева, 2002].

Более полные исследования по изучению таксономического разнообразия аэробных и факультативно-анаэробных бактерий содовых озер Забайкалья были проведены Т.Н. Митыповой [2007]. В содовых экосистемах Забайкалья автором была определена численность бактерий пептолитического, сахаролитического и липолитического путей. Количество аэробных органотрофных бактерий в донных отложениях достигала 100 млн. кл/мл и анаэробных органотрофных бактерий 10 млн. кл/мл. Сиквенс генов 16S р-РНК серии штаммов, отобранных по принципу доминирующих видов и пигментации, показал сходство на уровне 98-100% с уже описанными видами *Bacillus*, *Halomonas*, *Oceanbacillus*. Из содово-соленых озер Соленое и Нухэ-Нур выделены два строго аэробных алкали- и галотолерантных штамма, отнесенных к новым родам и видам семейства Flexibactericeae, к группе Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides

Заключительные этапы разложения органического вещества осуществляют вторичные анаэробы. К ним, в первую очередь относятся гетеротрофные организмы – метаногены и сульфатредукторы. Продуктами их обмена являются метан и сероводород.

Первым алкалифильным сульфатредуктором, полученным в чистую культуру является неспоровая бактерия *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans*, выделенная из оз. Магади (Кения) [Zhilina, 1997]. Из оз. Хадын (Тыва) выделен спорообразующий сульфатредуктор *Desulfonatronum lacustre* [Пикута, 1998]. Открытие алкалифильных сульфатредукторов дает микробиологическое обоснование давно известному процессу сульфидогенеза в содовых озерах как начальному этапу серного цикла с массовым развитием пурпурных серных бактерий и заключительному этапу анаэробного разложения органического вещества, в котором они играют роль стока водорода (ссылка).

Метаногенные бактерии функционируют на заключительном этапе анаэробной деструкции, находясь в тесном взаимодействии с микроорганизмами, выделяющими водород. Метан в содовых озерах образуется автотрофным и не конкурентным метилотрофным путем, причем расход углерода ОВ на эти процессы минимален, по сравнению с сульфатредукцией [Намсараев и др., 1999]. Алкалифильные метилотрофные метаногены включают ряд организмов, принадлежащих к разным родам: *Methanosalsum*, *Methanolobus* [Oremland et al., 1982; Mathrani, 1994; Liu, 1990; Sorokin, 2004, 2005]. Из всех

возможных путей метаногенеза именно метилотрофный путь является наиболее энергетически выгодным в условиях высокой минерализации [Oren, 1999].

Существует специализированная группа микроорганизмов, у которых ацетат является единственным продуктом метаболизма – это группировка ацетогенов. В культуру получен экстремально галоалкалофильный хемоорганотрофный ацетоген *Natroniella acetigena* [Zhilina et al., 1996]. В трофической системе алкалофильного сообщества *Natroniella* утилизирует продукты гидролиза биополимеров, т.е. является типичным диссипотрофом. Другой представитель ацетогенных микроорганизмов – *Tindallia magadiensis* [Kevbrin, 1998]. Организм специализирован на сбрасывании некоторых аминокислот (аргинин, орнитин, цитруллин) и органических оксикислот и не использует углеводы. Основными продуктами обмена являются ацетат и аммоний. В качестве минорных продуктов образуются пропионат и водород. Предполагается, что основная функция заключается в образовании шунта между водородным и ацетатным путями метаболизма.

В алкалофильном микробном сообществе деятельность ацетогенов проявляется в полной мере, хотя гомоацетатные бактерии не могут конкурировать с сульфидогенами за водород.

Таким образом, изучение функционального разнообразия в термальных и щелочных водных системах показало, что видовое и метаболическое разнообразие микробных представителей является достаточным, чтобы поддерживать микробное сообщество автономным, эффективно осуществляющим круговорот биогенных элементов в процессах продукции и деструкции органического вещества. Трофическая система термофильного и алкалофильного микробного сообщества, как по продуцентам, так и по системе деструкции на основании анализа результатов проведенных исследований может считаться полноценной [Zhilina and Zavarzin, 1994; Заварзин и др., 1999; Zavarzin and Zhilina, 2000].

### **1.3. Адаптация микроорганизмов к экстремальным условиям**

Исследования по термофилии микроорганизмов ведутся уже довольно длительное время. Результаты исследований обобщены в обзорах и монографиях российских и зарубежных ученых [Александров, 1975; Brock, 1967; Логинова, Егорова, 1977; Ленгелер и др., 2005; Морозкина, 2010]. Благодаря этим работам сформировались современные представления о происхождении, распространении, физиологических особенностях термофильных микроорганизмов, механизме воздействия высокой температуры на

клеточном и молекулярном уровне, цитологии и практическом использовании термофильных микроорганизмов как продуцентов биологически активных веществ.

Способность приспосабливаться к меняющимся условиям среды – одна из важнейших особенностей живых существ. Их распространение, численность и биоразнообразие в значительной мере определяются эффективностью адаптационных механизмов. Именно они позволяют микроорганизмам существовать в экстремальных условиях.

Для каждого представителя бактерий и архей существуют значения температуры и pH, которые в данных условиях будут являться минимальным, оптимальным и максимальным.

По отношению к температуре микроорганизмы, как известно, подразделяют на психрофилов (оптимальная температура роста  $\leq 15^{\circ}\text{C}$ ), мезофилов ( $T_{\text{опт}} \approx 37^{\circ}\text{C}$ ), термофилов ( $T_{\text{опт}} > 45-50^{\circ}\text{C}$ ) и гипертермофилов ( $T_{\text{опт}} > 80^{\circ}\text{C}$ ) [Brock, 1967].

Существуют различные классификации микроорганизмов по отношению к pH [Krulwich, Guffanti, 1989; Wiegel, 1998; Horikoshi, 1999]. Алкалифильные микроорганизмы растут при экстремально высоких значениях pH (10,0-11,0) среды обитания и подразделяются на две физиологические группы: собственно алкалифилов и галоалкалифилов. Алкалифилы растут при pH 9,0 и выше, тогда как галоалкалофилам для оптимального роста необходимы не только щелочные условия ( $\text{pH} \geq 9,0$ ), но и высокие концентрации NaCl ( $\geq 33\%$ ) [Wiegel, 1998].

### **1.3.1. Механизмы температурных адаптаций**

Большой интерес ученых вызывает изучение механизмов биохимической адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям окружающей среды [Морозкина и др., 2010].

У бактерий, жизненный цикл которых связан с экологическими нишами, характеризующимися разным температурным режимом, выработались сложные механизмы температурного контроля некоторых свойств.

Способность существовать при высоких значениях температуры привела к изменению строения цитоплазматической мембраны, а также синтезу экстремоферментов и белков теплового шока [Hickey, 2004; Van de Vossenberg, 2001; Laksanalamai and Robb, 2004].

Выяснение механизмов, обеспечивающих активное существование при высоких температурах, препятствующих в норме росту подавляющего большинства прокариот, представляет несомненный интерес. Предложено несколько гипотез для объяснения природы термофилии. Одна из них подчеркивает роль мембранных липидов. Известно,

что мембранные липиды бактерий-термофилов содержат более насыщенные и неразветвленные цепи жирных кислот. Эта особенность позволяет уменьшить степень текучести биологических мембран термофилов [Ермилова, 2007].

ДНК и РНК термофилов также обладают повышенной устойчивостью к высоким температурам [Unsworth et al, 2007; Daniel and Cowan, 2000; Hickey et al, 2004; Atomi et al, 2004]. Устойчивость ДНК к денатурации в экстремальных условиях обитания бактерий может обеспечиваться положительно заряженными ДНК – связывающими белками, относительно высоким содержанием нуклеотидных пар гуанин – цитозин (Г-Ц), поскольку она более стабильна за счет дополнительной водородной связи по сравнению с парой аденин-тимин (А-Т) и/или высокими внутриклеточными концентрациями солей. В результате исследования содержания Г-Ц в составе ДНК, 23S, 16S и 5S рРНК, а также тРНК установлена прямая корреляция между оптимальной температурой роста микроорганизмов ( $T_{opt}$ ) и количеством пар Г-Ц в рРНК и тРНК [Unsworth et al, 2007; Wang et al, 2006]. Альтернативным механизмом, стабилизирующими вторичную структуру молекулы ДНК, является ее ассоциация с катионными белками (Hmf и Sac семейства DNABP), что приводит к дополнительной спирализованности ДНК и образованию нуклеосом. Функционирование АТФ-зависимой топоизомеразы типа I (обратной гиразы) гипертермофильных бактерий и архей, обеспечивает положительную направленность спирализации молекулы ДНК [Stetter, 1999].

Термофильные микроорганизмы изучены не так полно, как мезофильные. Доказано, что в основе различной термоустойчивости микроорганизмов лежат структурные особенности белковых молекул [Zeikus et al., 1998; Кубланов и Подосокорская, 2011]. Так у многих экстремофильных микроорганизмов найдены белки теплового шока (HSP), что, по-видимому, является одним из основных «ответов» на воздействие таких факторов стресса, как экстремальные значения температуры, обезвоживание, химический стресс и голодание [Laksanalamaï and Robb, 2004]. Они классифицируются по величине молекулярной массы на относительно высокомолекулярные (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60) и низкомолекулярные (sHSP с молекулярными массами от 15 до 42 кДа). Большинство этих белков выполняют функции молекулярных шаперонов, предотвращающих агрегацию или осуществляющих рефолдинг денатурированных белков и участвующих в фолдинге вновь синтезированных. Гомологи белков теплового шока были обнаружены в геноме всех классов экстремофильных организмов [Laksanalamaï and Robb, 2004].

При высоких температурах многие ферменты термофилов сохраняют активность. Но до сих пор не обнаружено универсального фактора, определяющего способность

белков функционировать при высоких температурах. Напротив, существуют механизмы обуславливающие стабильность [Zeikus et al., 1998]:

- Термостабильность белков тесно коррелирует с их аминокислотным составом. В термофильных белках наблюдается повышенное содержание аланина, которое свидетельствует об участии данной аминокислоты в увеличении гидрофобности внутри молекул белка;

- Образование  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев;

- Гидрофобные взаимодействия являются одной из главных движущих сил стабилизации белков;

- Ионные взаимодействия и присутствие  $\text{Ca}^{2+}$ - связывающего сайта;

- Дисульфидные мостики, образующиеся между молекулами цистеина, также положительно влияют на стабильность белка.

### **1.3.2. Механизмы рН адаптаций**

Концентрация ионов водорода в среде представляет важный экологический фактор, оказывающий действие на прокариоты. Алкалифильные микроорганизмы имеют эффективные механизмы поддержания внутриклеточного ионного гомеостаза, сохраняя близкие к нейтральным значениям рН внутри клеток [Kruswich et al, 2002]. Алкалифильные бактерии растут с наибольшей скоростью при рН 8-11 и в связи с этим обладают тремя особенностями. Первая особенность – это свойство поддержания рН цитоплазмы на физиологическом уровне в щелочной среде. Это достигается благодаря наличию в цитоплазме буферных систем, которая обеспечивает содержание в ней нуклеиновых кислот и белков, а также пулов глутамата и полиаминов. В основном буферную емкость обеспечивают фосфатные группы в составе РНК и ДНК (в нейтральном диапазоне) и основные или кислые боковые цепи аминокислот в составе белков при крайних значениях рН. Вторая особенность алкалифилов состоит в том, что ферменты, находящиеся на поверхности клетки или секретируемые в окружающую среду, устойчивы к денатурирующему влиянию щелочной среды. Наконец, третья особенность связана с тем, что образование на мембране градиента рН с кислым полюсом внутри клетки нейтрализует мембранный потенциал последовательно, снижает протон-движущую силу, которая обеспечивает синтез АТФ при дыхании. Низкая проницаемость цитоплазматической мембраны для протонов и других ионов обеспечивает адаптацию при высоких значениях рН среды [Slonczewski, Foster 1996].  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - антипорт является универсальным механизмом для создания ионных градиентов и поддержания рН-гомеостаза у алкалифилов. Протонная помпа и системы транспорта  $\text{Na}^+$  служат

основными механизмами регуляции рН у бактерий, обитающих в щелочных средах; они согласованно действуют для понижения рН цитоплазмы. Это обеспечивается транспортом ионов натрия, в котором участвуют по меньшей мере три системы [Padan, Schuldiner, 1994]. У алкалифильных бактерий образование обратного градиента рН на мембране компенсируется высокой величиной мембранного потенциала или сопряжением транспорта электронов с выделением из клеток  $\text{Na}^+$  для поддержания гомеостаза рН и запасания энергии. Также одним из способов адаптации микроорганизмов к высокощелочным средам является способность их ферментов, находящихся на поверхности клетки или секретируемых в окружающую среду, функционировать при высоких значениях рН. Так, высокое содержание остатков аргинина во внеклеточной сериновой протеазе может сдвинуть оптимум рН в более щелочную сторону [Masui et al., 1994].

Большинство описанных в настоящее время алкалифильных/алкалитолерантных и термофильных/термотолерантных аэробных видов относятся к роду *Bacillus* [Sarkar, 1991; Fritze, 1996]. Значительно меньше анаэробных видов было описано, которые могли расти и в алкалифильных и в термофильных условиях [Li et al, 1993, 1994; Wiegell, 1998].

Известно, что в клетках алкалифилов функцию защитных барьеров в экстремальных условиях окружающей среды выполняет не только цитоплазматическая мембрана, но и клеточная стенка, содержащая компоненты с большим числом карбоксильных групп, отрицательный заряд которых отталкивает гидроксильные ионы и адсорбирует протоны и ионы натрия [Horikoshi, 1999].

## **ГЛАВА 2. Методы исследования экстремофильных прокариот**

### **2.1. Физико-химические методы**

Пробы микробных матов и донных осадков из экстремальных местообитаний для микробиологического анализа отбирали в стерильную посуду. Фиксацию проб для химических и микробиологических определений проводили сразу после отбора проб. Для молекулярно – генетического анализа пробы фиксировали 70% спиртом. До проведения анализов пробы хранили в холодильнике при +4°C.

В местах отбора проб измеряли температуру, рН, окислительно-восстановительный потенциал (Eh), минерализацию. Температуру измеряли сенсорным электротермометром Prima (Португалия), рН определяли потенциометрически при помощи портативного рН-метра (pHep2, Португалия). Для определения окислительно-восстановительного потенциала использовали портативный измеритель redox-потенциала ORP (Португалия). Минерализацию воды определяли при помощи портативного тестер-кондуктометра TDS-4 (Сингапур). Содержания карбонатов, гидрокарбонатов, хлоридов, катионов кальция определяли титрованием [Резников и др., 1970], сульфатов турбидиметрически [Аринушкина, 1980], сульфидов колориметрически [Truper, Schlegel, 1964].

Содержание органического углерода ( $C_{орг}$ ) в пробах определяли по методу Тюрина в модификации Никитина [Аринушкина, 1980]. Определение содержания белка проводили по методу Лоури [Практикум по микробиологии, 2005]. Оптическую плотность измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-20 (Россия) и спектрофотометре СЕСИЛ-1021 (Великобритания). Для определения содержания зольных элементов пробы сжигали в печи при температуре 550°C [Аринушкина, 1980].

### **2.2. Методы выделения чистых культур гидролитических микроорганизмов**

Учет численности и выделение аэробных алкалитермофильных гидролитических бактерий проводили методом предельных разведений и высева на агар на среде Пфеннига следующего состава (г/л):  $NH_4Cl$  – 0,3;  $KH_2PO_4$  – 0,3;  $MgCl_2$  – 0,3;  $CaCl_2$  – 0,3; дрожжевой экстракт – 0,5; раствор микроэлементов по Липперту, Витману – 1 мл. В качестве субстратов вносили (в %): для протеолитиков – пептон (1,5); для амилитиков – крахмал (1,5); для целлюлозолитиков – полоску фильтровальной бумаги (1); для липолитиков – твин-80 (1,5). рН<sup>25°C</sup> среды доводили бикарбонатно-карбонатным буфером до 8,5–9,5, температура инкубации 50°C.

Выделение чистых культур сульфатредуцирующих бактерий проводили с использованием анаэробной техники Хангейта методом последовательных десятикратных

разведений на выше описанной среде. Из концентрированных растворов перед посевом в среду добавляли (г/л):

$\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$  – 3;

$\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;

металлическую скрепку или  $\text{FeSO}_4$  – в качестве индикатора процесса;

натриевые соли молочной или уксусной кислот – 4 – в качестве доноров электронов и источника углерода.

Значения pH устанавливали соотношениями 10% растворами  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

В качестве источника углерода и донора электронов использовали лактат натрия, с конечной концентрацией в среде 0,4%. Среду перед посевом кипятили и продували азотом для удаления растворенного кислорода. pH при посеве 9,0.

Контроль чистоты культур оценивали микроскопированием и высевом на твердые среды. Культивирование бактерий осуществляли анаэробно в термостатах при 30°C и 55°C в течение 14 суток. Параллельно ставили химический контроль.

Морфотипы бактерий, размеры, подвижность и спорообразование изучали микроскопированием образцов с помощью светового микроскопа AxioStar Plus (Karl Zeiss) в фазовом контрасте и на окрашенных препаратах при 100-кратном увеличении объектива (общее увеличение 1000) и ультратонких срезах в электронном микроскопе Jeol JEM-100C (Япония).

### **2.3. Изучение экофизиологических свойств гидролитических бактерий**

Температурные диапазоны развития бактерий устанавливали в градиентном термостате от 20 до 80°C. Диапазон pH<sup>25°C</sup> 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 560 нм. Биохимические свойства бактерий, удельную скорость роста определяли общепринятыми методами [Практикум по микробиологии, 2005].

### **2.4. Метод определения скорости деструкции органического вещества**

Скорость сульфатредукции определяли радиоизотопным методом с помощью меченого <sup>35</sup>S-сульфата (Иванов и др., 1956). Пробы донных осадков для радиоизотопных работ отбирали в стерильные флаконы, которые закрывали пробками и обжимали

алюминиевыми крышками. Радиомеченный  $^{35}\text{S}$ -сульфат вводили в пробу с помощью шприца в количестве 0,1-0,2 мл  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  с активностью 0,1-1 мК и инкубировали в течение 0,4-1 суток. Фиксацию проводили 10-25%-м раствором ацетата кадмия.

Для расчета интенсивности сульфатредукции применяли следующую формулу:

$$A = (p \times C) / (P \times v),$$

где A – интенсивность процесса;

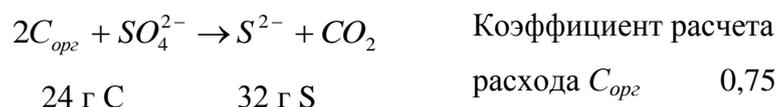
C – концентрация субстрата;

p – радиоактивность продукта реакции;

P – радиоактивность введенного в пробу меченного субстрата;

v – время инкубации.

Результаты определения скоростей микробиологических процессов радиоизотопным методом и балансовые уравнения реакции позволяют рассчитать количество использованного бактериями органического углерода:



## 2.5. Методы молекулярно - генетического анализа

**Выделение ДНК** проводили из биомассы бактерий [Булыгина и др., 2002]. Концентрация полученного препарата ДНК при использовании этого метода составляла 30 – 50 мкг/мл.

**Полимеразная цепная реакция гена 16S рРНК.** Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система [Lane, 1991]. Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1<sup>x</sup> буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 67 мМ трис-НСl, рН 8,8, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ ); по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия).

Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл - 94°C x 9 мин, 55°C x 1 мин, 72°C x 2 мин; последующие 30 циклов - 94°C x 1 мин, 55°C x 1 мин, 72°C x 2 мин; завершающий цикл - 72°C x 7 мин.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2% геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см.

Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США).

**Секвенирование ПЦР-продуктов.** Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, проводили по методу Сэнгера с соват. [Sanger at al, 1977] с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc.,USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc.,USA). При этом для секвенирования использовали праймеры [Lane, 1991] и чтение проводили в двух направлениях.

Метагеномный анализ проведен на пиросеквенаторе Roche 454 GS-FLX Titanium (Южная Корея). Оценку таксономической сложности сообщества проводили с помощью пакета программ CLcommunity (ver 2.58).

**Анализ последовательностей 16S рРНК.** Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST [Camacho at al, 2009]. Построение филогенетического дерева проводили с помощью программы TREECONW.

### ГЛАВА 3. Распространение и экологические функции гидролитических микроорганизмов в деструкции органического вещества

Аэробные и факультативно анаэробные органотрофные микроорганизмы гидролитики – протеолитики включают в себя в основном представителей грамположительных Bacillaceae и Actinomycetes (*Anoxybacillus pushchinoensis*, *Bacillus alcalophilus*, *B. halodurans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermoactinomyces* sp., *Th. saccharii*) бактерий (табл.1) [Kevbrin et al., 2004; Wiegel, Kevbrin, 2004].

Таблица 1

Примеры микроорганизмов-гидролитиков термоалкалифилов  
[Кевбрин, 2007; Кубланов, 2011]

Группа	Бактерии	T °C /pH max ферментативной активности
Амилолитики	<i>Bacillus lichenformis</i>	90
	<i>Bacillus</i> sp. TAR-1	50/10,5
	<i>Bacillus halodurans</i>	55/10
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> TS-23	55/9,0
	<i>Bacillus caldotenax</i> YT-G	70/7,5-8,5
Целлюлозолитики	<i>Anaerocellum thermophilum</i>	85-95
	<i>Bacillus thermoalcaliphilus</i> STS1	60/8-9
Хитинолитики	<i>Bacillus lichenformis</i>	70-86
	<i>Bacillus</i> sp. BG-11	50/8,5
Агаролитики	<i>Caldanaerobacter uzonensis</i>	н.о
Протеолитики	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	100
	<i>Bacillus</i> sp. B18	40/10,2
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> F1	60/10,0
	<i>Bacillus</i> sp. PS719	50/9-10
	<i>Bacillus</i> sp. JB-99	55/9,0
	<i>Thermomicrobium roseum</i> ATCC	70-75/8,2-8,5
Липолитики	<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	55/8,5
	<i>Bacillus alcalophilus</i>	60/10,6

На данный момент известно довольно большое число термофильных микроорганизмов, осуществляющих гидролиз полимерных субстратов. Среди них продуценты гликозидаз умеренно термофильные амилолитические бактерии *Bacillus* sp.

(*B. pallidus*, *B. thermocloaceae*, *B. Thermoaerophilus*), рода *Meiothermus* (*M. chliarophilus*, *M. ruber*, *M. silvanus*), "*Geobacillus caldotenax*", *Thermus oshimae*, *Sphaerobacter thermophilus*, *Thermomicrobium roseum*, *Isosphaera pallid*, *Rubrobacter xylanophilus* [Krishnan и Chandra, 1983; Gupta et al., 2003; Намсараев с соавт., 2006], термофильные целлюлозолитические бактерии *Rhodothermus marinus*, *Acidithermus cellulolyticus*, *Caldibacillus cellulovorans* [Bergquist et al., 1999], *Caldicellulosiruptor* и *Dictyoglomus* spp., археи с ксиланолитической активностью: *Thermococcus zilligii* [Uhl and Daniel, 1999], *Pyrodictium abyssi* [Andrade et al., 2001], растущая на агарозе термофильная бактерия '*Caldanaerobacter uzonensis*' [Kozina et al., 2010] и др.

Термофильные протеолитики представлены бактериями родов *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Thermoactinomyces*, *Fervidobacterium* и др. Большинство из них растут и используют в качестве источника углерода и/или энергии пептиды благодаря наличию внеклеточных пептидаз (в большинстве случаев относящихся к щелочным субтилизин-подобным сериновым протеиназам), активных в широких диапазонах значений pH [Klingeberg et al., 1995; Ward et al., 2002] и температур. Лишь немногие способны использовать в качестве субстрата белки, при гидролизе которых образуются пептиды, используемые большинством остальных протеолитиков. В целом, очевидно, что в природных местообитаниях гидролитики получают некоторое преимущество благодаря способности использовать недоступный для других микроорганизмов субстрат [Кубланов, 2011].

Функционирование биоты гидротермальных экосистем обеспечивается в первую очередь поступлением органического вещества в результате процессов микробной продукции, а также его деструкцией аэробным и анаэробным микробным сообществом. Некоторый вклад в пул органического вещества вносят водные и наземные растения. Содержание органического вещества может достигать 10-31,35% (в микробных матах).

Высокие значения температуры и pH, присутствие сероводорода создают особые условия для существования экстремофильных прокариотных организмов. Уникальной особенностью гидротерм является обильное развитие микроорганизмов, формирующих микробные маты. В районе выходов исследованных гидротерм и горячих ручьях наблюдается формирование микробных матов. В зависимости от физико-химических характеристик гидротермального раствора, освещенности, образуются различные маты. Их можно разделить на два типа: с доминированием фототрофных бактерий (циано-бактериальные, пурпурные, зеленые и т.д.) и с доминированием хемотрофных бактерий (в основном, серные). При изменении физико-химических условий происходит смена структуры микробных сообществ.

Терминальными этапами деструкции органического вещества являются конкурирующие за доноры электронов микробные процессы сульфатредукции и метаногенеза. Ранее проведенные измерения активности сульфатредукции и метаногенеза в гидротермах Байкальской рифтовой зоны показали, что доминирующим процессом на конечных этапах деструкции является сульфатредукция. Через процесс сульфатредукции может минерализоваться до 60 % ОВ [Намсараев и др., 2006].

Скорость сульфатредукции в микробных матах и донных осадках по изливу источников была исследована с применением радиоактивного  $^{35}\text{S}$  – сульфата. В матах образование сероводорода за счет сульфатредукции идет со скоростью 0,014-15,340 мгS/(дм<sup>3</sup>·сут), а в донных осадках – со скоростью 0,01-4,18 мгS/(дм<sup>3</sup>·сут) (табл.2). Процессы идут, видимо, за счет доноров электронов, поступающих с водой и синтезируемое в микробном сообществе ( $\text{H}_2$ , органическое вещество). Наиболее интенсивно процесс сульфатредукции протекал в микробном мате и донных осадках безсульфидного источника Гарга. В микробном мате этой гидротермы интенсивно протекал процесс аноксигенного фотосинтеза и хемосинтеза. По-видимому, сероводород, который синтезируется сульфатредукторами вовлекается в круговорот серы.

Интенсивности процесса сульфатредукции в микробных матах и донных осадках гидротерм Уро и Алла были близки по значению. В микробных матах скорость сульфатредукции была выше, чем в донных осадках. Лишь на 2 станциях Уро, т.1 и А1-2010-1 сульфатредукция протекала интенсивнее, чем в микробных матах.

Таблица 2

Скорости сульфатредукции в гидротермах Забайкалья

Источник	Станция	Тип пробы	t, °C	Скорость, мгS/(дм <sup>3</sup> ·сут)	Расход углерода, мгC/(дм <sup>3</sup> ·сут)
Уро	Уро 2010 т.1.	Цианобактериальный мат зеленого цвета	56	0,021	0,015
	Уро 2010 т.1	Донные осадки под матом	56	0,052	0,039
	Уро 2010, ручей т.2	Микробный мат розового цвета	67	0,133	0,01
	Уро 2010, ручей т.2	Донные осадки под матом	67	0,022	0,016
Гарга	Га-10-0,	Донные осадки	74	4,179	3,135

	выход				
	Га-10-1, ручей	Желеобразный микробный мат желто-розового цвета	57	15,340	11,505
Алла	А1-2010-1	Микробный мат желто-зеленого цвета с розовыми нитями	65	0,013	0,009
	А1-2010-1	Донные осадки под матом	73	0,094	0,0104
	В 33	Микробный мат изумрудно-зеленого цвета с белым налетом	65	0,014	0,01
	В 33	Донные осадки под матом	74	0,012	0,009

Сравнение с литературными данными показывает, что сульфатредукторы используют значительную часть ОВ на конечных этапах его деструкции. Расчеты на основе радиоизотопных измерений показали, что СРБ используют 0,009 – 11,505 мгС/(дм<sup>3</sup>·сут), тогда как метаногены для синтеза СН<sub>4</sub> только 0,01-1,5 мкг С/(дм<sup>3</sup>·сут) [Бархутова, 2000; Намсараев и др., 2006].

Таким образом, сульфатредуцирующие бактерии играют важную роль в функционировании микробного сообщества гидротерм, внося большой вклад в процессы деструкции органического вещества. В результате образования Н<sub>2</sub>С создаются благоприятные условия для деятельности хемотрофных бактерий, активно участвующих в синтезе ОВ, о чем свидетельствуют высокие скорости хемосинтеза в воде, донных осадках и микробных матах. Также способностью окислять восстановленные соединения серы обладают аноксигенные фототрофные бактерии, активность которых довольно высока в микробных матах.

### **3.1. Изучение разнообразия экстремальных местообитаний методом пиросеквенирования**

Методом пиросеквенирования по гену 16S рНК микробного мата получены данные, характеризующие состав микробного сообщества, обитающего в экстремальной водной экосистеме источника Алла (рис. 3).

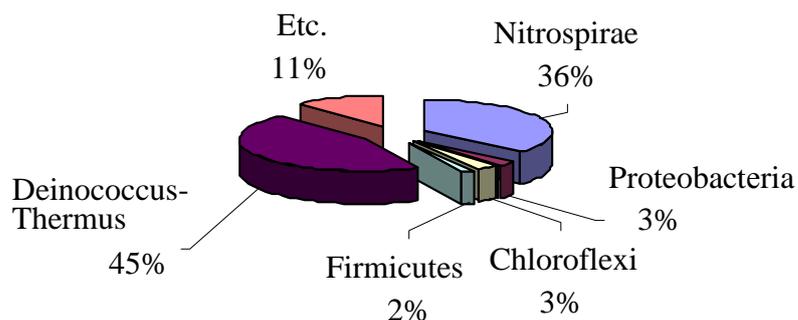


Рисунок 3. Состав микробного сообщества микробного мата термального источника Алла

В сообществе микробного мата источника Алла, развивающегося при pH 9,47 и температуре 67°C (2402 н.п., 80 ОТЕ), доминируют филы *Deinosoccus -Thermus* (1084; 45,13%) и *Nitrospirae* (869; 36,18%). *Proteobacteria* и *Firmicutes* составляют всего 3 и 2%, соответственно. *Cloroflexi* и *Суанобacteria* – формообразующие компоненты микробных матов, в структуре данного сообщества занимают 3% и 0,37%, соответственно.

Нуклеотидные последовательности сульфатредуцирующих бактерий, способных к диссимиляционной сульфатредукции, выявлены только в фило типе *Nitrospirae*, который представлен последовательностями, родственными *Thermodesulfovibrio* spp. В популяции микробного сообщества сульфатредукторы занимают значительную долю и составляют более трети микробного сообщества (рис. 4).

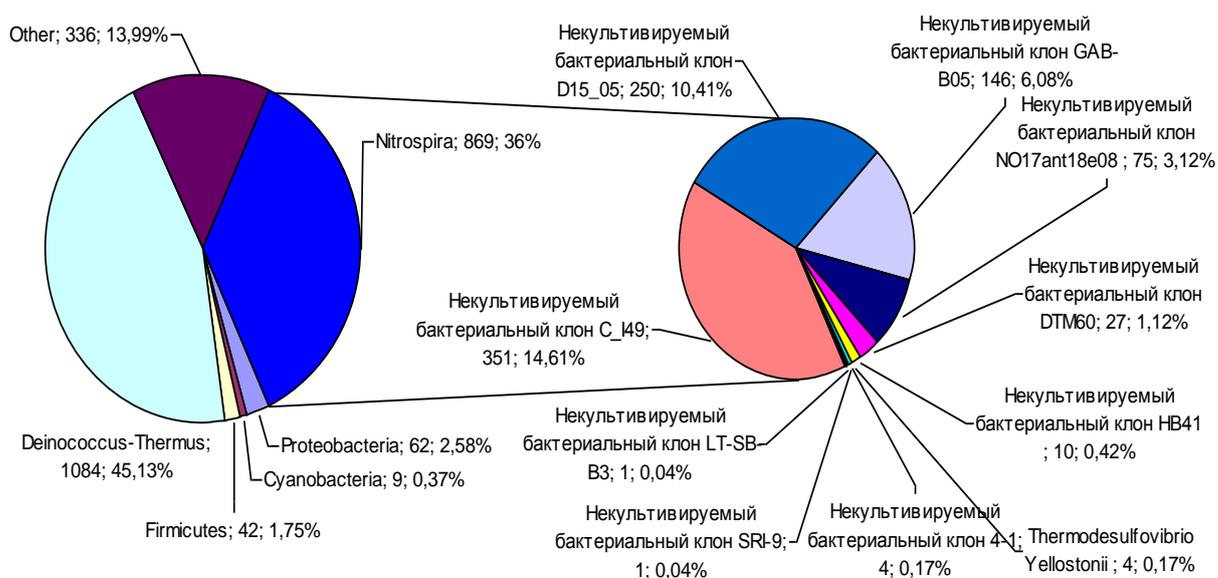


Рисунок 4. Разнообразие сульфатредуцирующих бактерий в микробном сообществе гидротермы Алла

Полученные последовательности СРБ микробного мата гидротермы Алла были объединены в 47 операционных таксономических единиц (OTU) (табл. 3), процент сходства их с ближайшими гомологами варьировал от 83% до 99%.

Таблица 3

## Нуклеотидные последовательности сульфатредуцирующих бактерий

OTU	Филогенетическая группа	Количество последовательностей	Ближайший гомолог (место выделения)	Номер доступа	Степень сходства, %
1	2	3	4	5	6
OUT_1	Nitrospirae	4	Некультивируемый бактериальный клон NO17ant18e08 (пластовые воды платинового рудника Нортэм, Южная Африка)	GQ921460.1	95
OUT_2	Nitrospirae	60		GQ921460.1	96
OUT_3	Nitrospirae	3		GQ921460.1	97
OUT_4	Nitrospirae	4		GQ921460.1	98
OUT_5	Nitrospirae	4		GQ921460.1	99
OUT_6	Nitrospirae	62	Некультивируемый бактериальный клон GAB-V05 (геотермальные водоносные пласты Большого артезианского бассейна, Австралия)	AB183861.1	98
OUT_7	Nitrospirae	71		AB183861.1	99
OUT_8	Nitrospirae	2		AB183861.1	95
OUT_9	Nitrospirae			AB183861.1	95
OUT_10	Nitrospirae	2		AB183861.1	96
OUT_11	Nitrospirae			AB183861.1	96
OUT_12	Nitrospirae	9		AB183861.1	97
OUT_13	Nitrospirae	1	Некультивируемый бактериальный клон DTM60 (термофильный мат горячего источника, Центральный Тибет)	EF205519.1	95
OUT_14	Nitrospirae	9		EF205519.1	96
OUT_15	Nitrospirae	17		EF205519.1	97

Продолжение табл. 3

1	2	3	4	5	6
OUT_17	Thermodesulfovibrio Yellowstonii	3	Культивируемый бактериальный клон DSM 11347 (This strain was obtained from ATCC and grown by Frank Robb)	CP001147.1	98
OUT_18	Thermodesulfovibrio Yellowstonii	1		CP001147.1	99
OUT_19	Nitrospirae	2	Некультивируемый бактериальный клон 4-1 (каменноугольные смолы сточных вод)	AF351225.1	86
OUT_20	Nitrospirae	2	Некультивируемый бактериальный клон HB41 (аэробный активный ил)	EF648050.1	86
OUT_21	Nitrospirae	1		EF648050.1	87
OUT_22	Nitrospirae	1		EF648050.1	88
OUT_23	Nitrospirae	1		EF648050.1	90
OUT_24	Nitrospirae	5	Некультивируемый бактериальный клон D15_05 (водоносные слои осадков, загрязненные нефтью)	EU266845.1	86
OUT_25	Nitrospirae	2		EU266845.1	87
OUT_26	Nitrospirae	2		EU266845.1	88
OUT_27	Nitrospirae	3		EU266845.1	89
OUT_28	Nitrospirae	6		EU266845.1	90
OUT_29	Nitrospirae	1		EU266845.1	91

Продолжение табл. 3

1	2	3	4	5	6
OUT_30	Nitrospirae	310	Некультивируемый бактериальный клон С_149 (почвы)	EU735732.1	86
OUT_31	Nitrospirae	30		EU735732.1	87
OUT_32	Nitrospirae	1		EU735732.1	88
OUT_33	Nitrospirae	1		EU735732.1	90
OUT_34	Nitrospirae	3	Некультивируемый бактериальный клон D15_05 (водоносные слои осадков, загрязненные нефтью)	EU266845.1	91
OUT_35	Nitrospirae	3		EU266845.1	92
OUT_36	Nitrospirae	9		EU266845.1	93
OUT_37	Nitrospirae	2		EU266845.1	94
OUT_38	Nitrospirae	4		EU266845.1	95
OUT_39	Nitrospirae	2	Некультивируемый бактериальный клон 4-1 (каменноугольные смолы сточных вод)	AF351225.1	85
OUT_40	Nitrospirae	3	Некультивируемый бактериальный клон НВ41 (аэробный активный ил)	EF648050.1	83
OUT_41	Nitrospirae	2		EF648050.1	85
OUT_42	Nitrospirae	18	Некультивируемый бактериальный клон D15_05 (водоносные слои осадков, загрязненные нефтью)	EU266845.1	83
OUT_43	Nitrospirae	174		EU266845.1	84
OUT_44	Nitrospirae	18		EU266845.1	85
OUT_45	Nitrospirae	2	Некультивируемый бактериальный клон С_149 (почвы)	EU735732.1	84
OUT_46	Nitrospirae	7		EU735732.1	85
OUT_47	Nitrospirae	1	Некультивируемый бактериальный клон LT-SB-	FJ755750.1	83

			ВЗ (донные осадки оз. Оз. Тайху, Китай)		
--	--	--	---	--	--

Пять операционных таксономических единиц (OTU\_1-OTU\_5) отнесены к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности некультивируемых бактерий рода *Thermodesulfovibrio* (GC921460.1, пластовые воды платинового рудника Нортэм, Южная Африка). Процент сходства варьировал от 95 до 99%.

Семь OTU (OTU\_6-OTU\_12) отнесены к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности некультивируемых бактерий рода *Thermodesulfovibrio* (геотермальные водоносные пласты Большого Артезианского бассейна, Австралия). Процент сходства варьировал от 95 до 99%.

Три OTU (OTU\_13-OTU\_15) отнесены к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности некультивируемых бактерий рода *Thermodesulfovibrio* (термофильный мат горячего источника в Центральном Тибете). Процент сходства варьировал от 95 до 97%.

Одна OTU (OTU\_16) отнесена к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности некультивируемых бактерий рода *Thermodesulfovibrio* (сульфатаровые поля в юго-западной Исландии). Процент сходства составил 98%.

Две OTU (OTU\_17, OTU\_18) отнесены к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности культивируемой бактерии *Thermodesulfovibrio Yellowstoneii* (термофильный мат горячего источника Йеллоустон). Процент сходства варьировал от 98 до 99%.

Две OTU (OTU\_19, OTU\_39) отнесены к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности некультивируемых бактерий рода *Thermodesulfovibrio* (каменноугольные смолы сточных вод). Процент сходства варьировал от 85 до 86%.

Шесть OTU (OTU\_20-OTU\_23, OTU\_40, OTU\_41) отнесены к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности некультивируемых бактерий рода *Thermodesulfovibrio* (аэробные активные илы). Процент сходства варьировал от 83 до 90%.

Четырнадцать OTU (OTU\_24-OTU\_29, OTU\_34-OTU\_38, OTU\_42-OTU\_44) отнесены к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности некультивируемых бактерий рода *Thermodesulfovibrio* (водоносные слои осадков, загрязненные нефтью). Процент сходства варьировал от 83 до 94%.

Шесть OTU (OTU\_30-OTU\_33, OTU\_45, OTU\_46) отнесены к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности некультивируемых бактерий рода *Thermodesulfovibrio* (почвы). Процент сходства варьировал от 84 до 90%.

Одна OTU (OTU\_47) отнесена к группе бактерий Nitrospirae, ближайшими гомологичными последовательностями являются последовательности некультивируемых бактерий рода *Thermodesulfovibrio* (донные осадки оз. Тайху, Китай). Процент сходства составил 83%.

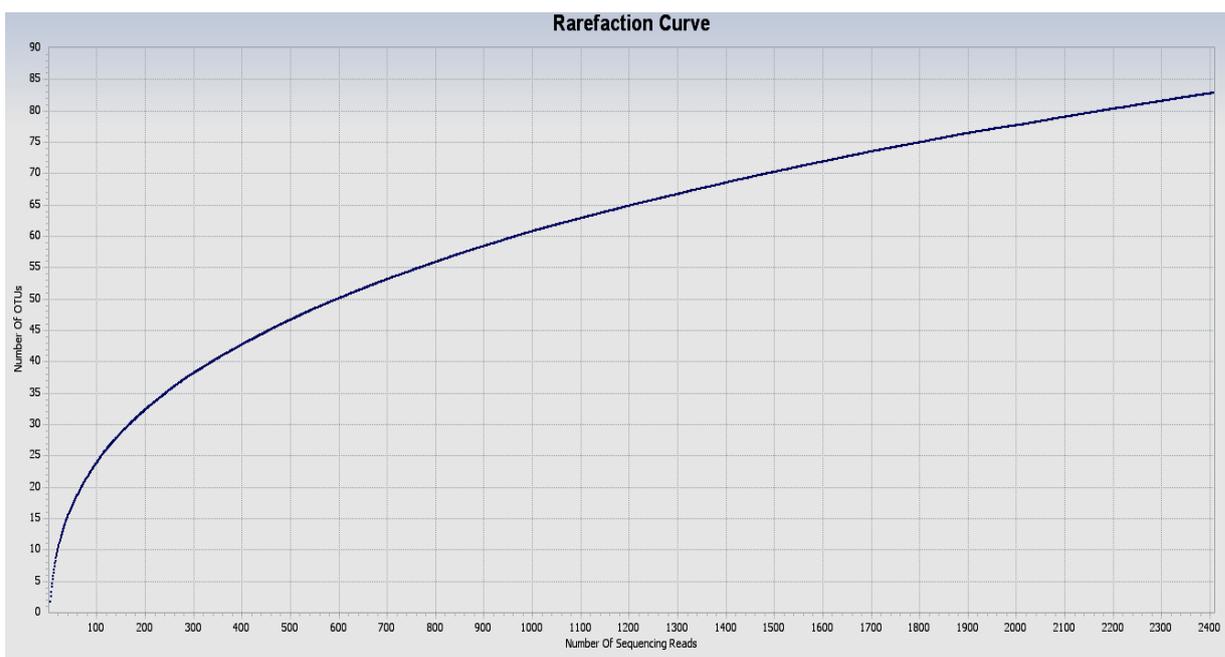


Рисунок 5. Оценка разнообразия микробного сообщества микробного мата термального источника Алла

По кривой (рис. 5), иллюстрирующей зависимость числа детектированных филоципов (т.е. числа кластеров, ось OY) от числа всех проанализированных последовательностей (ось OX) проведена оценка таксономической сложности сообщества. Показано присутствие разнообразия предположительно 83 филоципов бактерий.

### **3.2. Характеристика гидролитических бактерий, выделенных из термальных источников Забайкалья**

Из проб микробных матов и донных осадков термальных источников Бурятии: Гарга, Алла, Умхей, Сеюя и Горячинск было выделено 51 штамм гидролитических бактерий, доминировавших при выделении из накопительных культур, полученных при стационарном культивировании, с устойчивым ростом на агаризованной среде,

содержащей единственное органическое соединение в качестве источника углерода и энергии. Штаммы выделены из термальных источников с различным температурным режимом (от 26 до 70°C) и различной – от слабо-щелочной до сильно-щелочной реакцией среды (табл. 4).

Таблица 4

Штаммы, выделенные из термальных источников Забайкалья

Штамм	Источник	T, °C пробы	pH пробы	Вид пробы	Физиологическая группа			
Se-1-10	Сеюя	50	9,7	м.м.	Протеолитик			
Сея-09								
A7					Амилолитик			
A8								
Л7						Липолитик		
Л8								
Um-09m	Умхей	39-40	9,6	м.м.	Протеолитик			
Um-09s1				д.ос.				
Um-09s2								
A11	Алла	70	9,4	д.ос.	Амилолитик			
A12		65	9,2	м.м.		Липолитик		
Л12								
A1-9-1					61,5	9,75	м.м.	Протеолитик
Л13					45	8,4	д.ос.	Липолитик
Л15		26	8,9	м.м.				
Gor-10s	Горячинск	52,3	9,3	д.ос.	Протеолитик			
Gor-10-3		42,1	9,4	м.м.				
Gor-10-1m		52,3	9,3					
Gor-10-2		46						
Ga-35	Гарга	35	8,7			м.м.		
Ga-1-1		57,4						
Ga-9-2								
A9		55	Амилолитик					
A10		70		8,5				
Л10			Липолитик					
A1	Уро	43	8,8	песок	Амилолитик			

A2		38	9,0	м.м.	Липолитик
Л2					
Л4		63	9,1		
A5		40	9,2	д.ос.	Амилолитик
Л5					Липолитик
Ur-4		64,0	8,9	м.м.	Сахаролитик
Ur-5		69,1	9,0	д.ос.	Протеолитик
Ur-6		62,0	8,7	м.м.	
Br-2-1		51,5	9,25		
Br-2-2				Большая речка	
Ku-3	Кучигер	47,3	9,6	ил	Целлюлолитик

Примечание: жирным шрифтом выделены штаммы с известным филогенетическим положением

### 3.2.1. Морфологическая характеристика гидролитических бактерий

Описание колоний выделенных гидролитических бактерий и морфологическая характеристика клеток представлены в таблице 5.

Изоляты чаще всего образуют круглые, концентрические или амёбовидные колонии диаметром 2-4 мм, от неокрашенных до пигментированных: светло-желтых, молочных. Края колоний ровные, у некоторых ветвистые и слегка волнистые. Профиль колоний выпуклый реже плоский и вросший в агар. На питательном агаре бактерии образовывали колонии 2-х типов: округлые, гладкие и неправильной формы, шероховатые.

Клетки бактерий представлены различными спорообразующими грамположительными палочками, размеры которых варьировали в пределах от 0,5-4,96 x 1,1-16,66 мкм. Размеры спор составляли 1,13 – 1,57 мкм (рис. 6).

Таблица 5

## Морфологическая характеристика гидролитических бактерий

Культура	Морфология колоний					Морфология клеток	
	Форма	Размер, мм	Цвет	Профиль	Край	Морфотип клеток	Размеры клеток, мкм
Gor-10-3	круглая	1	св. желтая, прозрачная, блестящая	выпуклый, плоский	слегка волнистый	короткие палочки	0,5×2,77-4,26
Сея-09	круглая	1-2	св. желтая, блестящая	выпуклый, каплевидный	ровный	палочки	1,03×4,21-5,69 споровые, d=1,39
Gor-10-2	ризоидная	3-4	грязно-белая, края матовые, в центре прозрачная	плоский, вросший в агар	ветвистый	короткие, слегка овальные палочки	0,66×2,57
Um-09s1	ризоидная	3-5	молочная, желтоватая, матовая	плоский, вросший в агар, кратерообразный	ветвистый	палочки	0,58×3,64 споровые, d=1,13
Gor-10-1m	ризоидная	3-6	грязно-белая, матовая	плоский, кратерообразный	волнистый	палочки	2,53-2,74×0,65
Um-09m	ризоидная	2-3	молочного цвета, матовая	плоский, вросший в агар, кратерообразный	ветвистый	палочки	0,58×4,96
Га-35	круглая	2-3	блестящая	выпуклый,	ровный	палочки	н.о.

				каплевидный			
Gor-10s	круглая	1	белая, блестящая	выпуклый, каплевидный	ровный	палочки	2,95
A1	ризоидная	2-3	белая, матовая	плоский, вросший в агар	ветвистые	н.о.	н.о.
A2	ризоидная	2	белая, с желтоватым оттенком, полуматовая	плоский	слегка волнистый	н.о.	н.о.
A5	круглая	2-5	желтая, блестящая	выпуклый	ровный	короткие тонкие палочки	0,67×0,97-1,18
A7	ризоидная	2-3	молочная, желтоватая, матовая	плоский, вросший в агар	ветвистый	палочки	0,83×5,40
A8	ризоидная	1-3	желтовато-белая, блестящая	плоский, вросший в агар	ветвистый	короткие, слегка овальные палочки	0,54-0,97×1,11- 1,44
A9	круглая	2-3	белая, матовая	плоский, ровный, жирный	ровный	кокки	1,51-2,77
A10	ризоидная	1-2	молочно-желтая, блестящая	плоский, вросший в агар	ветвистый	короткие палочки	0,5-0,67×1,41- 1,48
A11	круглая	1	прозрачная, блестящая	выпуклый	ровный	палочки, сцепленные по 2-3 штуки	0,7×1,73-2,21
A12	круглая	1-4	желтовато - оранжевый, блестящий	выпуклый	ровный	палочки	0,75×7,43

Л2	ризоидная	2-4	белая, матовая	плоский	слегка волнистый	н.о.	н.о.
Л4	ризоидная	1-2	прозрачная с желтым оттенком, блестящая	выпуклый, вросший в агар	слегка волнистый	длинные изогнутые палочки	0,7-1,0×5,32-16,66
Л5	ризоидная	1-2	прозрачная, белая	выпуклый, вросший в агар	слегка волнистый	длинные изогнутые палочки	0,7-0,95×4,7-12,2
Л7	круглый	2	прозрачная, белая, блестящая	каплевидный	слегка волнистый	н.о.	н.о.
Л8	ризоидная	2-3	белая, прозрачная, блестящая	каплевидный	слегка волнистый	н.о.	н.о.

Примечание: н.о. – не определено

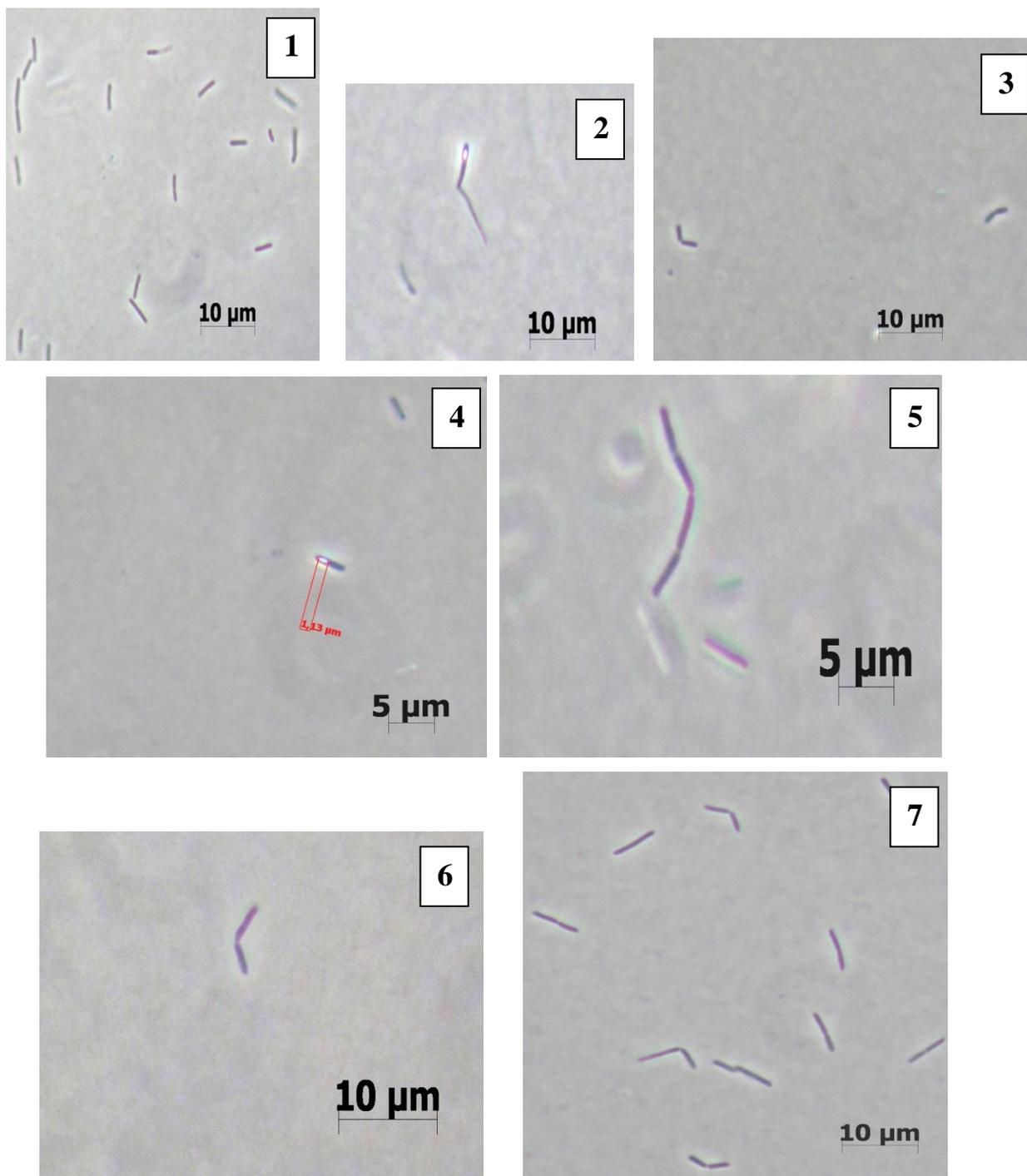


Рисунок 6. Факультативно-анаэробные протеолитические бактерии, выделенные из термальных источников Забайкалья: **1** – Gor-10-3; **2** – Сея-09; **3**– Gor-10-2; **4** – Um-09s1; **5** – Gor-10-1m; **6** – Um-09m; **7** – Gor-10s

### 3.2.2. Генотипические свойства и филогенетическое положение выделенных культур

По культуральным признакам, морфофизиологическим и биохимическим свойствам, все исследованные культуры были близки к представителям родов *Bacillus* и

*Anoxybacillus*. Для анализа гена 16S рРНК было отобрано 10 штаммов: Al-9-1, Se-1, Ga-9-2, Ga-1-1, Ur-6, Br-2-2, A2, Um-09m, Gor-10s и Га-35.

Результаты анализа сиквенса гена 16S рРНК штаммов показали, что исследуемые штаммы могут быть отнесены к группе *Clostridium/Bacillus* грам-положительных бактерий.

Анализ гена 16S рРНК штаммов Al-9-1, Se-1, Ga-1-1 и Ga-9-2 показал, что они являются представителями рода *Anoxybacillus*. Штаммы Al-9-1, Se-1 и Ga-1-1 образуют отдельный кластер на филогенетическом дереве (рис. 7) и ближайшим гомологом является *Anoxybacillus pushchinoensis* AT-2 (AB234214). Сходство между ними составляет 96, 95 и 95%, соответственно. Формирование этими штаммами отдельного кластера на филогенетическом дереве может являться следствием их эндемичности.

У штамма Ga-9-2 обнаружено 95 % сходства с *A. flavithermus* DSM 2641 (Z26932), что также позволяет отнести выделенную культуру к возможному новому виду рода *Anoxybacillus*.

Анализ гена 16S рРНК штаммов Ur-6, Br-2-2 и A2 показал, что они относятся к представителям рода *Bacillus*. Наибольшее сходство у культуры Ur-6 выявлено с *Bacillus hemicellulosolyticum* C-11 (99 %). Штаммы Br-2-2 и A2 на 97 и 99%, соответственно, близки к *B. licheniformis* BBDC6.

0,1

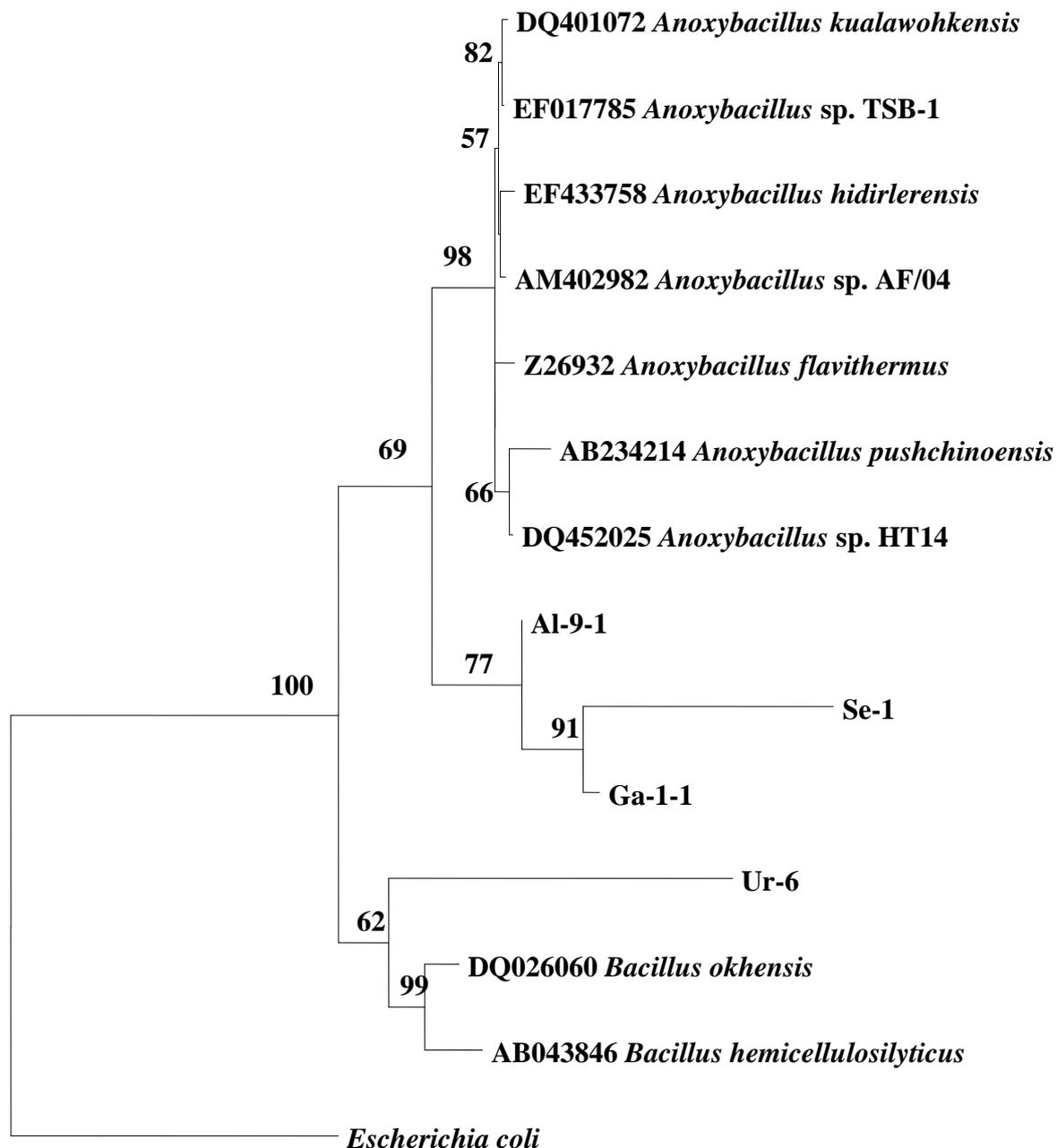


Рисунок 7. Филогенетическое дерево последовательностей гена 16S рНК штаммов, выделенных из щелочных гидротерм Прибайкалья. Шкала соответствует 0,1 нуклеотидных замен на сайт.

Для штамма Um-09m (рис.8) определена практически полная (1464 нуклеотида) последовательность гена, кодирующего 16S рНК, что соответствует позициям с 58 по 1530 по номенклатуре *E. coli*. При проведении анализа нуклеотидных последовательностей полученных амплификатов отмечено наличие микрогетерогенности амплификатов гена, кодирующего 16S рНК у исследованного штамма Um-09m,

характерная для вида *Bacillus licheniformis*. По результатам BLAST-анализа наиболее близким к исследованному штамму Um-09m оказался вид *Bacillus licheniformis* strain BPRIST006 (JF414759). Уровень сходства соответствующих последовательностей составил 99,8%. Уровень сходства последовательностей исследуемого штамма Um-09m и типового штамма *Bacillus licheniformis* strain DSM 13 (X68416) составил также 99,8%. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что изолят Um-09m является штаммом *Bacillus licheniformis*.

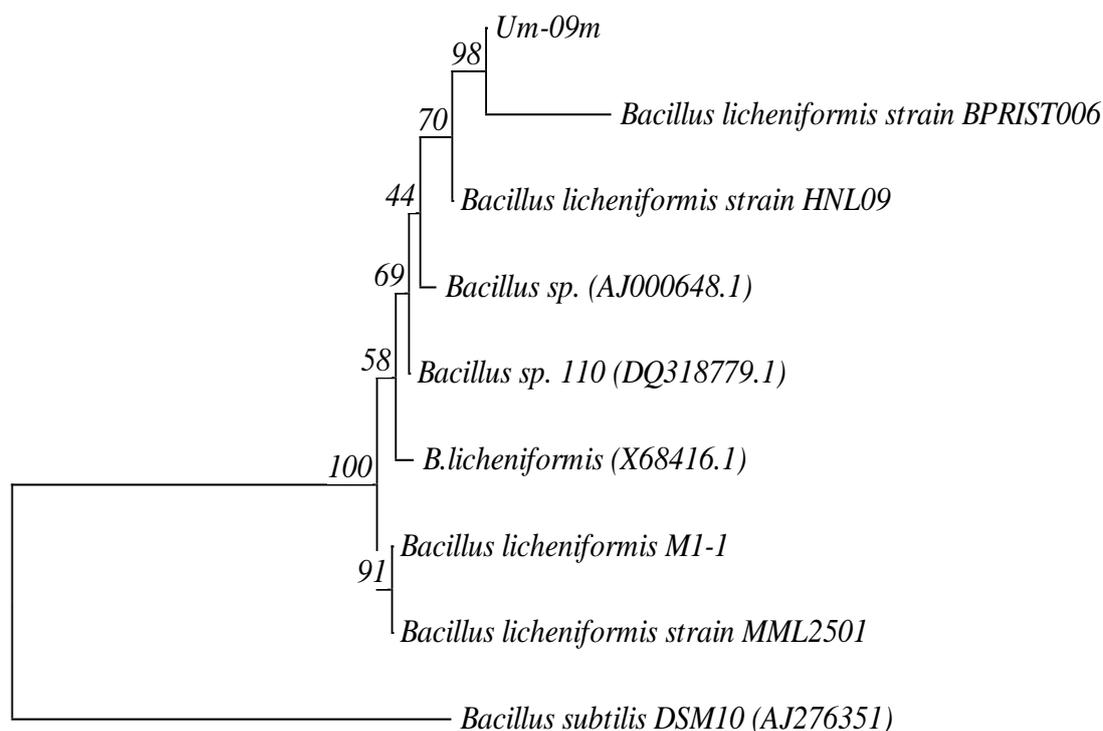


Рисунок 8. Дендрограмма филогенетического положения штамма Um-09m

Для штаммов Gor-10s и Га-35 (рис.9) определены практически полные (1502 и 1489 нуклеотида, соответственно) последовательности гена, кодирующего 16S рРНК, что соответствует позициям с 21 по 1530 по номенклатуре *E. coli*. По результатам BLAST-анализа наиболее близким к исследованным штаммам Gor-10s и Га-35 оказался вид *Paenibacillus dendritiformis* strain P411 (HM071942). Уровень сходства соответствующих последовательностей составил 100,0%. Уровень сходства последовательностей исследуемых штаммов Gor-10s и Га-35 с типовым штаммом *Paenibacillus dendritiformis* strain CIP 105967T (AY359885) составил 99%, что свидетельствует о том, изоляты Gor-10s и Га-35 являются штаммами вида *Paenibacillus dendritiformis*.

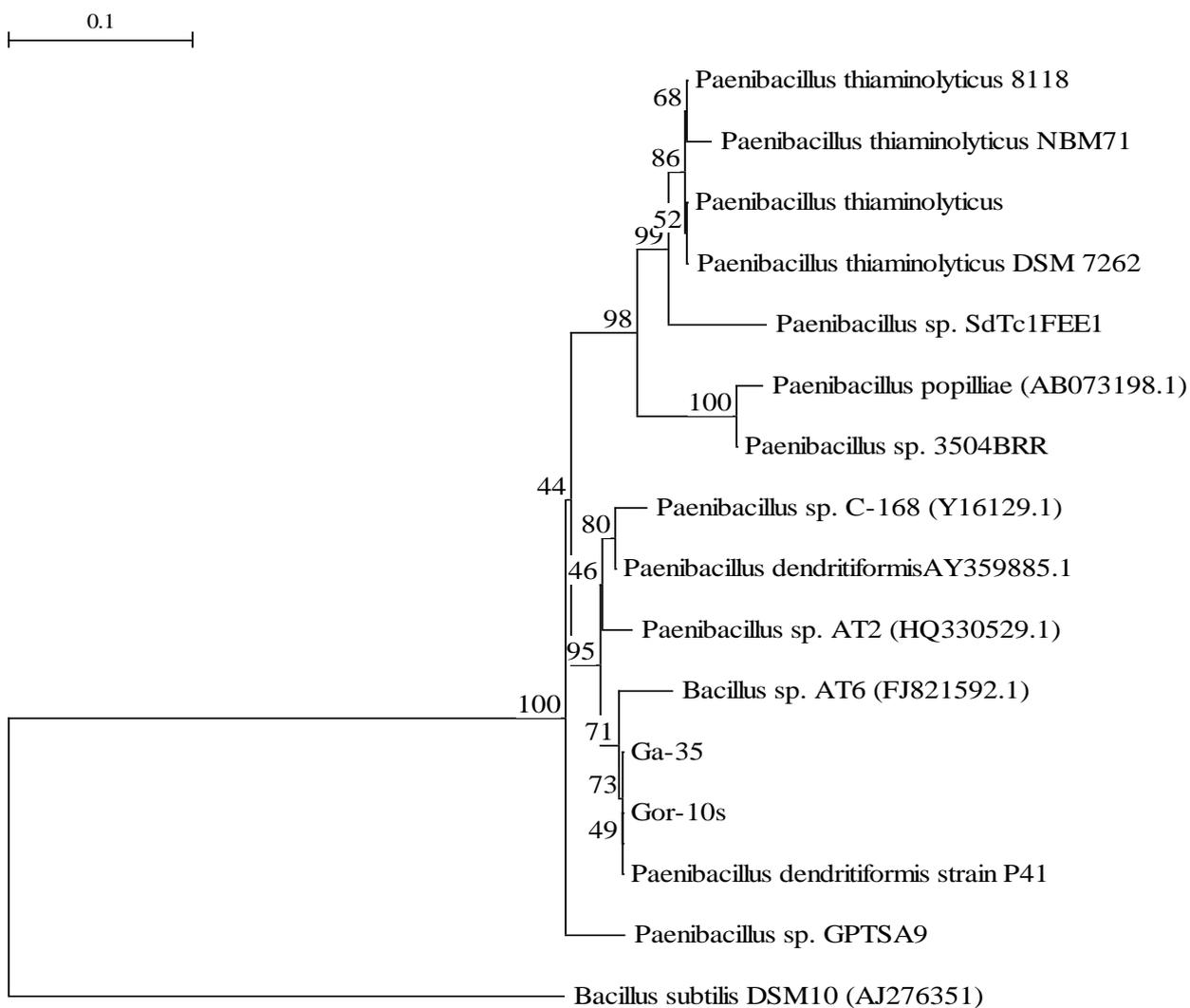


Рисунок 9. Дендрограмма филогенетического положения штамма Gor-10s и Га-35

Таким образом, в результате анализа гена 16S рНК было показано, что исследуемые штаммы, выделенные из термальных источников Забайкалья, являются представителями родов *Bacillus* и *Paenibacillus*.

Следует отметить, что среди ближайших гомологов наших изолятов большое количество некультивируемых бактерий, а также клонов, полученных при исследовании микробных сообществ разных местообитаний.

Таким образом, в результате анализа гена 16S рНК было показано, что исследуемые штаммы, выделенные из гидротерм Бурятии, являются представителями родов *Bacillus* и *Anoxybacillus*. При этом ряд штаммов, возможно, представляют новые таксоны видового уровня в составе данных родов.

### 3.2.3. Экофизиологическая характеристика гидролитических бактерий

Исследование экофизиологии, выделенных культур протеолитиков из термальных источников, показало, что они способны развиваться в широком диапазоне температур (23-60°C) и pH (7,6-10,0), проявляя свойства алкало- и термотолерантности.

Для культур Ga-1-1 и Gu-1 оптимальная температура роста 45 и 49°C, соответственно, максимальной температурой роста для культур была температура 67°C. Для культур Ga-6 и Gu-2 оптимум температуры составил 60°C, для Ga-9-2 – оптимальная температура роста 57°C, диапазон развития 37-75°C.

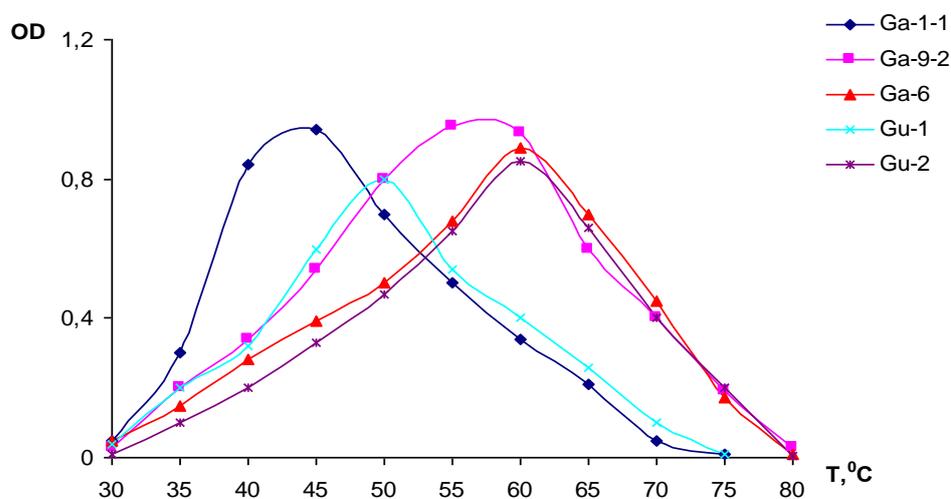


Рисунок 10. Зависимость интенсивности роста штаммов, выделенных из гидротерм Гарга и Гусиха, от температуры.

Для аллинских штаммов диапазон роста определен в пределах 35-67°C. Оптимальная температура роста 49-50°C зафиксированы для культур A2, A3, A4, A5 и A1-9-1, а для культуры A1 оптимум температуры составил 45°C.

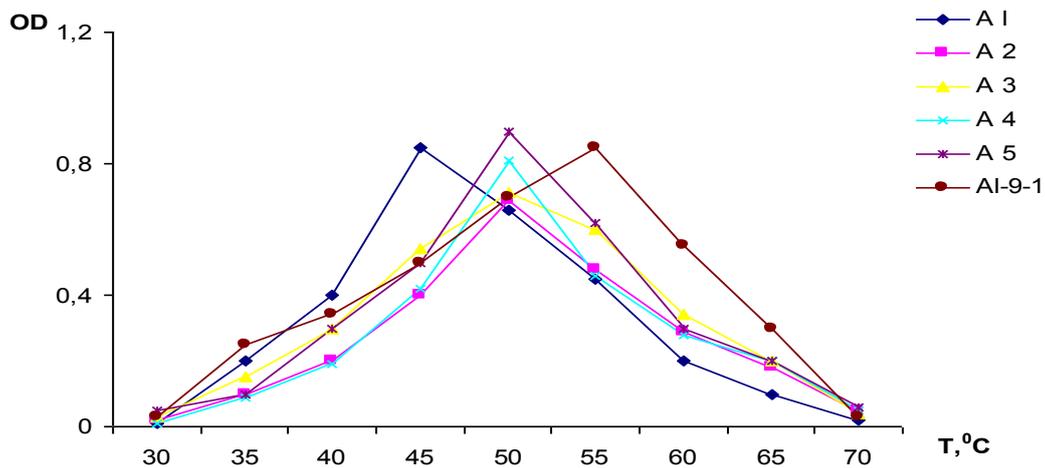


Рисунок 11. Зависимость интенсивности роста штаммов, выделенных из гидротермы Алла, от температуры.

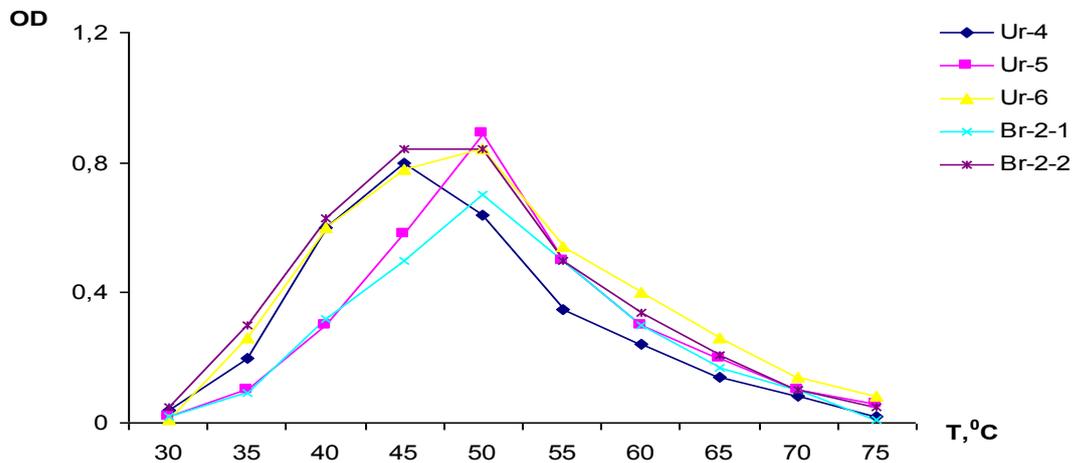


Рисунок 12. Влияние температуры на интенсивность роста штаммов, выделенных из гидротерм Уро и Большая речка.

Все культуры, выделенные из Уринского и Большереченского источников, являются умеренными термофилами с диапазоном развития 35-70°C и оптимумом развития при 45-50°C (Рис. 12). Несмотря на наличие общих черт, температурные характеристики Сеюйских штаммов имеют ряд отличий. Культуры Se-3, Se-4 и Se-6-из имеют оптимум роста 50-52°C, Se-5 имеет оптимум роста при 45°C, Se-1 при 49°C.

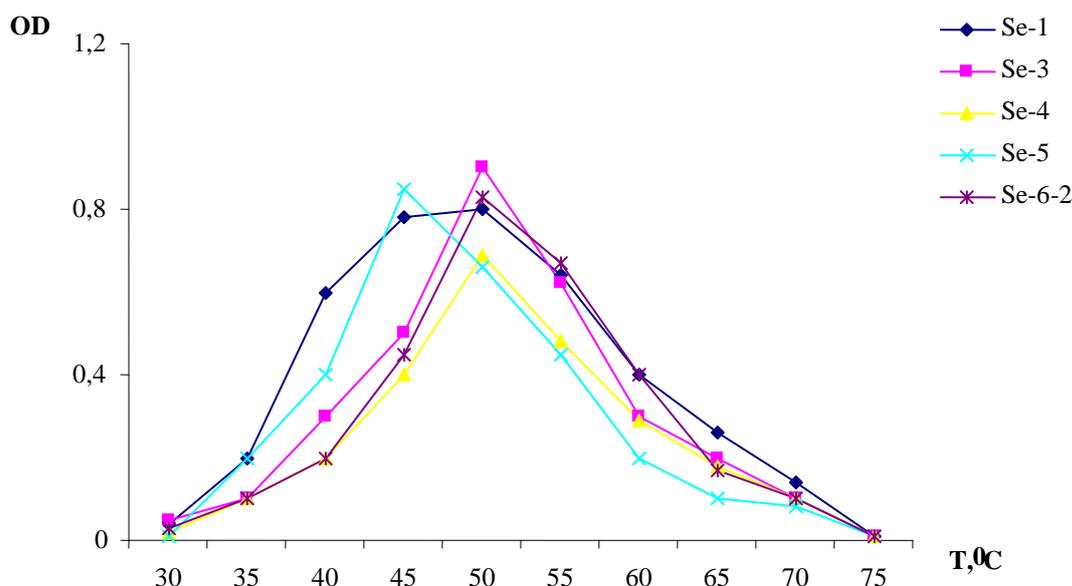


Рисунок 13. Зависимость интенсивности роста штаммов, выделенных из гидротермы Сея, от температуры.

По отношению к минерализации среды выделенные культуры проявили наибольший рост на среде, не содержащей NaCl. У штаммов – Ga-1-1 и Gu-2 оптимум солёности проявился при 2 и 5 г/л, соответственно. Все культуры растут в диапазоне содержания NaCl от 0 до 20 г/л. Штаммы Se-1, Ur-4, Ur-6 и Br-2-2 оказались устойчивыми к высоким концентрациям соли до 50 г/л.

Культуры использовали широкий спектр субстратов, представленный следующими группами:

- 1) *пентозы*: арабиноза;
- 2) *гексозы*: галактоза, глюкоза, манноза, фруктоза;
- 3) *дезоксигексозы*: рамноза;
- 4) *олигосахариды*: лактоза, мальтоза, раффиноза, сахароза;
- 5) *спирты*: глицерин, маннит, дульцит, сорбит, этанол;
- 6) *витамины*: инозит.

Все штаммы способны в аэробных условиях утилизировать многие органические соединения, наиболее активно использовались углеводы группы гексоз. Из группы олигосахаридов, наиболее потребляемым является сахароза и мальтоза по сравнению с лактозой и раффинозой. Рост на всех субстратах отмечен у следующих штаммов: Ga-1-1, Gu-2, A5, Al-9-1, Ur-4, Br-2-2, Se-1 и Se-6-2.

Большинство культур использует для роста пептон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, глюкозу, маннозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, глицерин, дульцит,

маннит и инозит. Слабый рост отмечен на арабинозе, галактозе, рамнозе, лактозе и этаноле.

Практически все исследованные штаммы были способны к брожению на глюкозе и сахарозе, но не сбраживали рамнозу, пептон, гидролизат казеина и дрожжевой экстракт.

Ни одна из культур не продуцировала аммиак, индол и сероводород. На безазотистой среде Эшби штаммы роста не проявили.

Среди аэробно выделенных в культуру органотрофных бактерий, все относятся к факультативно-анаэробным, что позволяет им осуществлять разложение ОВ при смене режима аэрации в экосистеме. Каталазная и оксидазная активности отмечены у всех выделенных штаммов, что подтверждает их аэробный статус. Переход от аэробного к анаэробному существованию обуславливает у факультативных анаэробов смену катаболизма, прежде всего это переход к брожению, поэтому группировка этих организмов имеет преимущества в условиях резких суточных колебаний  $O_2$  в сообществе.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что культуры бактерий - деструкторов являются организмами, приспособленными к изменяющимся условиям окружающей среды, главным образом, к колебаниям рН и температуры.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв / Е.В. Аринушкина // М.: Наука, 1980. - 487 с.

Заварзин Г.А. // Труды института микробиологии им. С.Н. Виноградского. 2007. №14. С.1-8

Заварзин Г.А. Изучение микробного разнообразия в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского // Микробиология. 2004. Т.73. №5. С. 598-612

Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии // М.: Наука. 2003. С. 67-102

Заварзин Г.А. Развитие микробиальных сообществ в истории Земли // Проблемы доантропогенной эволюции биосферы // М.: Наука. 1993. С. 212-222

Иванов М.В. Применение изотопов для изучения интенсивности процесса редукции сульфатов в озере Беловодь/ М.В. Иванов// Микробиология. 1956. Т. 25. Вып. 3. С. 305-310.

Басков Е.А., Суриков С.Н. Гидротермы Земли // Л.: Недра. 1989. 245 с.

Березин И.В. Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа // М. 1977

Блиева Р.К., Сафуани Ж.Е., Искакбаева Ж.А. Влияние различных источников азота и углерода на биосинтез протеолитических ферментов у культуры *Aspergillus awamori* 21/96 // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 2. с. 213-216

Болдарева Е.Н., Акимов В.Н., Бойченко В.А., Стадничук И.Н., Москаленко А.А., Махнева З.К., Горленко В.М. Новая алкалофильная несерная пурпурная бактерия *Rhodobaca bargusiensis* sp. nov. из содового озера Баргузинской долины (Восточная Сибирь, Бурятия) // Микробиология. 2008. Т. 77. № 2. С. 241-254

Бонч-Осмоловская Е.А. Изучение термофильных микроорганизмов в Институте микробиологии РАН // Микробиология. 2004. Т. 73. № 5. С. 644-658

Бонч-Осмоловская Е.А. Термофильные микроорганизмы: общий взгляд // Труды Ин-та микробиологии. 2011. Выпуск 16. С. 5-14

Бонч-Осмоловская Е.А., Мирошниченко М.Л., Слободкин А.И., Соколова Т.Г., Карпов Г.А., Кострикина Н.А., Заварзина Д.Г., Прокофьева М.И., Русанов И.И., Пименов Н.В. Биоразнообразие термофильных литотрофных прокариот в наземных гидротермах Камчатки // Микробиология. 1999. Т.68. С. 398-406

Бонч-Осмоловская Е.А., Мирошниченко М.Л. Термофильные бактерии из

горячих источников Бурятии // Тез. докл. Международной конференции «Экологические проблемы микробиологии и биотехнологии Байкальского региона (27-29 июня 1995 г.). Улан-Удэ. Изд-во БНЦ СО РАН. 1995. С. 47-49.

Борисенко И.М., Замана Л.В. Минеральные воды Бурятской АССР // Улан-Удэ: Бурятское книжное изд-во. 1978. 162 с.

Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. Изучение нуклеотидных последовательностей *nifH* генов у представителей метанотрофных бактерий // Микробиология 2002. 71. 4. С. 500-508

Валуева Т.А., Молосов В.В. // Успехи биол. Химии. 2002. Т.42. С. 193-216

Варфоломеев С.Д., Пожитков А.Е. Активные центры гидролаз: основные типы структур и механизм катализа. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2000. Т.41. № 3. с. 147-156

Галимов Э.М. Природа биологического фракционирования изотопов // М.: изд-во «Наука». 1981. 247 с.

Геохимическая деятельность микроорганизмов гидротерм БРЗ / Б.Б. Намсараев, Д.Д. Бархутова, Э.В. Данилова и др. // Новосибирск: Академическое изд-во «Гео». 2011. 302 с.

Герасименко Л.М., Заварзин Г.А. Микробные сообщества гидротерм // Биология термофильных микроорганизмов. М.: Наука. 1986. С. 22-25.

Голубев В.А. Тепловые и химические характеристики гидротермальных систем Байкальской рифтовой зоны // Сов. геология. 1982. №10. С.100-108.

Горленко В.М., Компанцева Е.И., Пучкова Н.Н. Влияние температуры на распространение фототрофных бактерий в термальных источниках // Микробиология. 1985. Т. 54. №5. С. 848-853.

Горленко В.М., Брянцева И.А., Пантелеева Е.Е. и др. *Ectothiorhodosinus mongolicum* gen. nov., sp. nov. новая пурпурная серная бактерия из содового озера Монголии // Микробиология. 2004. Т. 73, № 1. С. 80-88

Горленко В.М., Намсараев Б.Б., Кулырова А.В. и др. Активность сульфатредуцирующих бактерий в донных осадках содовых озер Юго-Восточного Забайкалья // Микробиология. 1999. Т.68. №5 С. 664-670

Гумеров В.М., Марданов А.В., Белецкий А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В. Молекулярный анализ биоразнообразия микроорганизмов в источнике Заварзина, кальдера Узон, Камчатка // Микробиология. 2011. Т.80. №2. с. 258-265

Деткова Е.Н., Кевбрин В.В. Катаболизм целлобиозы у галоалкалофильной гидролитической бактерии *Alkaliflexus imshenetskii* // Микробиология. 2009. Т.78. №3. С. 304-309

Деткова Е.Н., Пушева М.А. // Микробиология. 2006. Т.75. №1. С. 5-17

Деткова Е.Н., Пушева М.А. // Микробиология. 2006. Т.75. №1. С. 5-17

Дзюба А.А. Минеральные озера // География и природные ресурсы. №2. 2002. С. 61-67

Думова В.А., Круглов Ю.В. Ассоциация бактерий, утилизирующая целлюлозу // Микробиология. 2009. Т. 78. №3. С. 304-309

Дунаевский Я.Е., Белякова Г.А., Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А. // Микробиология. 1995. Т.64. №3. С. 327-330

Ермилова Е.В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот // Спб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та. 2007. 299 с.

Жилина Т.Н., Кевбрин В.В., Лысенко А.М., Турова Т.П., Кострикина Н.А., Заварзин Г.А. *Clostridium alkalicellum* sp.nov. – облигатно алкалофильный целлюлолитик из содового озера Прибайкалья // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 642-653

Жилина Т.Н., Кевбрин В.В., Турова Т.П., Лысенко А.М., Кострикина Н.А., Заварзин Г.А. *Clostridium alkalicellum* sp. nov. – аблигатно алкалофильный целлюлозолитик из содового озера Прибайкалья // Микробиология. 2005. Т.74. С. 642–653

Жилина Т.Н. // Труды инст-итута микробиологии им. С.Н. Виноградского. 2007. №14. С.158-225

Зайцева С.В. Влияние экологических условий на распространение и активность бактерий-деструкторов щелочных гидротерм Северо-Восточного Прибайкалья // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Улан-Удэ, 2004. 19 с.

Замана Л.В. О происхождении сульфатного состава азотных терм Байкальской рифтовой зоны // Докл. РАН. 2000а. Т. 372. № 3. С. 361-363

Иванов А.В. Торейские озера // Гидрохимия рек и озер в условиях резко континентального климата. Владивосток: Изд-во ДВНЦ АН СССР. 1997. С.69–102.

Исаченко Б.Л. Хлористые, сульфатные и содовые озера Кулундинской степи и биогенные процессы в них // Кулундинская экспедиция Академии наук СССР 1931-1933 гг. 1934. Ч.1. вып. 8

Калашникова О.М. Продукция и состав органического вещества циано-бактериальных матов щелочных водных экосистем Забайкалья // Диссер. ... канд. биол.

наук. Улан-Удэ. 2006. 118 с.

Каюмов А.Р., Шамсутдинов Т.Р., Сабилова А.Р., Шарипова М.Р. Влияние системы регуляции азотного обмена на биосинтез сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* // Микробиология. 2009. том 78. №6. с. 742-748

Кевбрин В.В. Термофильные алкалофильные микроорганизмы. Труды Ин-та микробиологии им. С.Н. Виноградского. М.: Наука. 2007. Вып. XIV. 374-395

Кевбрин В.В., Жилина Т.Н., Заварзин Г.А. Разложение целлюлозы анаэробным алкалофильным микробным сообществом // Микробиология. 1999. Т. 68. С. 606-609

Компанцева Е.И., Горленко В.М. Фототрофные сообщества в некоторых термальных источниках озера Байкал // Микробиология. 1988. Т. 57. №5. С. 841-846.

Корнеева Г.А. Внеклеточная протеазная активность в компонентах криосферы / Г.А. Корнеева, Н.А. Буданцева, Ю.Н. Чижова // Изв. РАН. Сер. Биол. 2004. № 5. С. 625-633

Корнеева Г.А. Изучение ферментативного гидролиза казеина в морской воде / Г.А. Корнеева, С.В. Карченко, Е.А. Романкевич // Известия РАН. Серия биологическая. 1990. № 6. С. 821-829

Котлова Е.К., Иванова Н.М., Юсупова М.П., Воюшина Т.Л., Иванушкина Н.Е., Честухина Г.Г. Сериновая тиолзависимая протеиназа *Raecilomyces lilacinus*: выделение и свойства. // Биохимия, 2007. Т. 72. С. 137-144.

Крайнов С. Р., Швец В. М. Основы геохимии подземных вод. М.: Недра. 1980

Крайча Я. Газы в подземных водах. – М.: “Недра”, 1980.

Кубланов И.В., Подосокорская О.А. Термофильные микроорганизмы, разлагающие биополимеры. Труды Ин-та микробиологии им. С.Н. Виноградского. М.: Наука. 2011. Вып. XVI. 315-342

Куликов Г.В., Жевлаков А.В., Бондаренко С.С. Минеральные лечебные воды СССР: справочник. М.: Недра. 1991. 399 с.

Кулырова А.Н. Влияние условий среды обитания на распространение и активность микроорганизмов содовых озер Южного Забайкалья: Дисс...канд. биол. наук. Улан-Удэ: БГУ. 1999

Лебединский А.В., Черных Н.А., Бонч-Осмоловская Е.А. Геносистематика микроорганизмов термальных местообитаний // Биохимия. 2007. Т.72. № 12. С. 1594-1609

Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология: Прокариоты: В 2-х томах. Пер. с англ. / под. ред. Й. Ленгелера, Г. Дреуса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005.

695с.

Логинова Л.Г. Головачева Р.С., Головина И.Г., Егорова Л.А., Позмогова И.Н., Хохлова Ю.М., Цаплина И.А. Современные представления о термофилии микроорганизмов. М.: Наука. 1973. 275 с.

Логинова Л.Г., Егорова Л.А. Новые формы термофильных бактерий. М.: Наука, 1977. 175 с.

Ломоносов И.С. Геохимия и формирование современных гидротерм Байкальской рифтовой зоны // Новосибирск.: Наука, 1974

Маликова Л.А., Марданова А.М., Соколова О.В., Балабан Н.П., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Условия биосинтеза внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus pumilus* КММ62 // Микробиология. 2007. Т. 76. Вып. 3. С. 1-8.

Марданов А.В., Гумеров В.М., Белецкий А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В., Скрыбин К.Г. Характеристика биоразнообразия термофильного микробного сообщества методом параллельного пиросеквенирования. Доклады Академии наук. 2010. Т. 432. №4. С. 544-548

Митыпова Т.Н. Новые гало- и алкалофильные бактерии, выделенные из содово-соленых озер Забайкалья / Т.Н. Митыпова, Л.П. Козырева, З.Б. Намсараев // Тезисы Всероссийской конференции с международным участием «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии».– Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2006. – С.63-64

Митыпова Т.Н. Разнообразие аэробных и факультативно-анаэробных органотрофных бактерий содово-соленых озер Забайкалья и Монголии. Диссер. ... канд. биол. наук. Улан-Удэ. 2007. 129 с.

Митыпова Т.Н., Козырева Л.П., Намсараева Б.Б. // Вестник Бурятского ун-та. Сер.2: Биология. 2005. №7. С. 190-193

Михайлова Е.О., Марданова А.М., Балабан Н.П., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 2. С. 228-235

Морозкина Е.В., Слуцкая Э.С., Федорова Т.В., Тугай Т.И. и др. Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 5-20

Назина Т.Н., Григорьян А.А., Сюэ Ян-Фен, Соколова Д.Ш., Новикова Е.В., Турова Т.П., Полтараус А.Б., Беляев С.С., Иванов М.В. Филогенетическое разнообразие аэробных сапротрофных бактерий из нефтяного месторождения Дацин // Микробиология. 2002. Т.71. №1. С. 103-110.

Назина Т.Н., Турова Т.П., Полтараус А.Б., Новикова Е.В., Иванова А.Е.,

Григорьян А.А., Лысенко А.М., Беляев С.С. Физиологическое и филогенетическое разнообразие термофильных спорообразующих углеводородокисляющих бактерий из нефтяных пластов // Микробиология. 2000. Т.69. №1. С. 113-119.

Намсараев З.Б. Микробные сообщества щелочных гидротерм // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Москва. 2003. 23 с.

Намсараев З.Б., Горленко В.М., Намсараев Б.Б., Бархутова Д.Д. Микробные сообщества щелочных гидротерм // Новосибирск: Изд-во СО РАН. 2006.

Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е. Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 8. С. 1059-1089.

Перельман А.И. Геохимия элементов в зоне гипергенеза / А.И. Перельман // М.: Недра. 1972. С.288.

Попова Н.А., Николаев Ю.А., Турова Т.П., Лысенко А.М., Осипов. Г.А., Верховцева Н.В., Паников Н.С. *Geobacillus uralicus* - новый вид термофильных бактерий // Микробиология. Т.71. №3. С. 391-398.

Практикум по микробиологии: Учеб. пособие 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.

Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод // 3-е изд. М.: Недра. 1970.

Соломин Г.А., Крайнов С.Р. Щелочные составляющие природных и сточных щелочных вод, геохимические процессы их нейтрализации кислыми и околонеутральными подземными водами // Геохимия. 1998. №2. С.183-201.

Солоноватые и соленые озера Забайкалья: гидрохимия, биология / отв. ред. Б.Б. Намсараев. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского государственного университета. 2009. 340 с.

Физико-химическая характеристика сульфидных озер и источников северо-востока Самарской области / Е.С. Краснова, М.В. Уманская, М.Ю. Горбунов. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Т. 10. № 2. 2008

Храпцова Г.И., Цаплина И.А., Серегина Л.М., Логинова Л.Г. Термофильные бактерии горячих источников Бурятии // Микробиология. 1984. Т. 53. С. 137-141

Чернявский М.К. Геоэкологические особенности термальных источников Баргузинского Прибайкалья и использование их в бальнеологических целях. У-У. 2006

Шагжина А.П. Эколого-биохимическая характеристика микроорганизмов, участвующих в круговороте азота в щелочных гидротермах Прибайкалья // Автореф.

дисс. ... канд. биол. наук. Улан-Удэ, 2007. 21 с.

Шагжина А.П., Лаврентьева Е.В., Базаржапов Б.Б., Намсараев Б.Б. Внеклеточная протеазная активность в щелочных гидротермах Баргузинской долины // Вестник БГУ. Серия. Биология. 2005. С. 42-50

Шарипова М.Р. Гидролитические ферменты и спорообразование у *Bacillus intermedius* // М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, М.А. Шилова, Ю.М. Кадырова, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская. Микробиология. 2002. Т. 71. №4. С. 494-499

Экология микроорганизмов. Учебн. для студ вузов / Нетрусов А.И., Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия». 2004. 272 с.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. // Microbiol. Rev. 1995 Mar; 59(1):143-69.

Andrade C.M., Aguiar W.B., Antranikian G. Physiological aspects involved in production of xylanolytic enzymes by deep-sea hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2001. Vol.91-93. P. 655-669.

Antranikian G., Vorgias C., Bertoldo C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2005. Vol. 96. P. 219-262

Atomi H., Matsumi R., Imanaka T. // J. Bacteriol. 2004.186. Vol. 14. P. 4829-4833

Barett A.J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. Methods Enzymol. 1994. 244: 1-15

Barett A.J. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. Methods Enzymol. 1995. 248: 183

Belduz A.O., Dulger S., Demirbag Z. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. Vol.53. P. 1315-1320.

Berendes F., Gottschalk G., Heine-Dobbernack E., Moore E.R.B., Tindall B.J. *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkaliphilic, halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works // Syst. Appl. Microbiol. 1996. Vol.19. P.158-167.

Bergquist P.L., Gibbs M.D., Morris D.D., Te'o V.S.J., Saul D.J., Morgan H.W. Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria // FEMS Microbiol. Ecol. 1999. Vol. 28. P. 99-110.

Braga G.U.L., Destefano R.H.R., Messias C.L. // Revista Microbiol. 1999. Vol. 30.

№2. P. 107-113.

Brock T.D. Microorganisms adapted to high temperatures // *Nature*. 1967. Vol. 214. P. 882-885.

Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009. Dec 15;10:421.

Chen Ch. *Meiothermus rosaceus* sp. nov. isolated from Tengchong hot spring in Yunnan, China // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. Vol. 216. P.263-268.

DeBlois S., Weigel J. Cellulolytic vestiges of the xylanase activity in a new strictly xylanolytic thermophile *Clostridium* sp. // *Biotechnol. Lett.* 1995- Vol. 17. P. 89-94.

Denariáz, G., Payne, W.J., J. Le Gall. A Halophilic denitrifier, *Bacillus halodenitrificans* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989. Vol.39. P.145-151.

Dobson S.J., Franzmann P.D. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988), and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996. Vol.46. P.550-558.

Dominguez A., Sahroman A., Fucinos P. Quantification of intra- and extra-cellular thermophilic lipase/esterase production by *Thermus* sp. *Biotechnol. Lett.* 2004. Vol. 26. P. 705-708.

Dulger S, Demirbag Z, Belduz A.O. *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. Vol.54. P.1499-1503.

Dunaevsky Y.E. Golubeva E.A., Gruban T.N., Beliakova G.A., Belozersky M.A. // *J. Russian Phytopathol. Soc.* 2001. Vol. 2. P. 39-43.

Eggers C.T., Murray I.A., Delmar V.A., Day A.G., Craik C.S. // *Biochem. J.* 2004. Vol. 379. №1. P. 107–118.

Egorova K., Antranikian G. Industrial relevance of thermophilic Archaea // *Curr. Opin. Microbiol.* 2005. Vol. 8. P. 649-655.

Erlanger B.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen // *Arch. Biochem. Biophys.* 1961. V.95. P.271-278.

Errington J., *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis // *Microbiol. Rev.* 1993. Vol. 57. №1. P. 1-33.

Eugster, H.P. Chemistry and origin of the brines of lake Magadi, Kenya // *Mineral. Soc.*

Am/ Special publication. 1970. Vol. 3. P.215–235.

Franzmann, P.D., Wehmeyer, U., Stakebrandt, E. *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonadaceae* and *Deleya* // System. Appl. Microbiol. 1998. Vol.11. P.16-19.

Fritze D. *Bacillus haloalkaliphilus* sp. nov // Int. J. Bacteriol. 1996.46:98-101.

Garnova E.S., Zhilina T.N., Tourova T.P., Lysenko A.M. *Anoxynatronum sibiricum* gen. nov., sp. nov. alkaliphilic anaerobe from cellulolytic community of Nizhnee Beloe (Transbaikal region) // Extremophiles. 2003. Vol. 7. P. 213-220.

Garnova E.S., Zhilina T.N., Tourova T.P., Kostrikina N.A., Zavarzin G.A. Anaerobic, alkaliphilic, saccharolytic bacterium *Alkalibacter saccharofermentans* gen. nov., sp. nov. from soda lake in the Transbaikal region of Russia // Extremophiles. 2004. Vol. 8. P. 309-316.

Geladi P. Analysis of multiway (multimode) data // Chemom. Intell. Lab. Syst. 1989.Vol.7. P.11-30.

Gorban A. N., Zinovyev A. Principal manifolds and graphs in practice: from molecular biology to dynamical systems // Int. J. Neural Syst. Vol. 20. No. 3 (2010) 219–232.

Grant W.D., Mwatha W.E., Jones B.E. Alkaliphiles: ecology, diversity and applications // FEMS Microbiol. Rev. 1990. Vol. 75. P. 255-270.

Grant, W.D., Tindall, B.J. Alkaline saline environments // Microbes in extreme environments / Eds. Herbert R.A. and Codd G.A., Academic Press, London. 1986. P. 22-54.

Gupta R., Beg Q., Lorenz P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. Vol. 59. № 1. P.15-32.

Hamana K., Tanaka T., Hosoya R., Niitsu M., Itoh T. // J. Gen. Appl. Microbiol. 2003. Vol. 49. P. 287-293.

Heinen W., Lauwers, A.M., Mulders, J.W.M. *Bacillus flavothermus*, a newly isolated facultative thermophile. // Antonie van Leeuwenhoek. 1982. Vol. 48. P. 265.

Heinen U.J., Heinen W. Characteristics and properties of a caldoactive bacterium producing extracellular enzymes and 2 related strains// Arch. Microbiol. 1972. Vol. 82. P.1-23.

Hickey D.A., Singer G.A. // Genome biology. 2004. Vol.5. № 10. P. 117.

Horikoshi K. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. Vol. 63. P. 735-750.

<http://www.merops.ac.uk/merops/merops.htm>

Huber H., Stetter K.O. Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology // J. of Biotechnology. 1998. Vol. 64. P. 39-52.

Ievleva E.V., Revina T.A., Kudryavtseva N.N., Sofin A.V., Valueva T.A. Extracellular proteinases from the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. // Pr. Biochim. Microbiol.

2006. Vol. 42 (3). P. 298-303.

Ignatova Z., Gousterova A., Spassov G., Nedkov P. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus* // Can. J. Microbiol. 1999. Vol. 45. P. 217-222.

Javor B. Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry // Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. 1989. 382pp.

Jenkins P. Ecological results of an expedition to Kenya in 1929. VII. Summary of the ecological results with special reference to the alkaline lakes // Ann. & Mag. Nat. Syst. S. 10. 1932. Vol. 13. P. 133–180.

Jensen K., Ostergaard P.R., Wilting R., Lassen S.F. Identification and characterization of a bacterial glutamic peptidase. // BMC Biochemistry, 2010. Vol. 11:47.

Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W., Owenson, G.G. Microbiol diversity of soda lakes // Extremophiles. 1998. Vol. 2. P. 191-200.

Jorgensen B.B., Nelson D.C. Bacterial zonation, photosynthesis and spectral light distribution in the hot spring microbial mats of Iceland // Microbial Ecology. 1988. Vol. 16. P. 133-148

Kang S., Barak Y., Lamed R., Bayer E.A., Morrison M. // Mol. Microbiol. 2006. Vol. 10. P. 1344-1354.

Kevbrin V, Zengler K, Lysenko A, Wiegel J. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geysir valley, Kamchatka // Extremophiles. 2005. Vol. 9. P. 391-398.

Kevbrin V.V., Romanek C.S., Wiegel J. Alkalithermophiles: a double challenge from extreme environments // Origins / Ed. J. Seckbach. – Netherlands.: Kluwer Academic Publishers, 2004. P. 395-412.

Klingeberg M., Galunsky B., Sjöholm C., Kasche V., Antranikian G. Purification and properties of high thermostable, sodium dodecyl sulphate-resistant and stereospecific proteinase from extremely thermophilic archaeon *Thermococcus stetteri* // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol.61. P. 3098-3104.

Kozina I.V., Kublanov I.V., Kolganova T.V., Chernyh N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Caldanaerobacter uzonensis* sp. nov., an anaerobic, thermophilic, heterotrophic bacterium isolated from a hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. Vol. 60. P. 1372-1375.

Krishnan T., Chandra A.K. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305 // Appl. Environ. Microbiol. 1983. Vol. 46. P. 430-437.

Krulwich T.A. Alkaliphilic prokaryotes // The Prokaryotes: an evolving electronic

- resource for microbiological community. 3<sup>rd</sup> ed. N.Y.: Springer, 2002.
- Krulwich T.A., Ito M., Gilmour R., Guffanti A.A. Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in alkaliphilic strains of *Bacillus* // *Extremophiles*. 1997. 1:163-169.
- Krulwich T.A., Ito M., Hicks D.B., Gilmour R., Guffanti A.A. // *Extremophiles*. 1998. Vol.2. P. 217-222.
- Kucera M.J. Protease inhibitor of *Galleria mellonella* acting on the toxic protease from *Metarhizium anisopliae*. // *J. of Invert. Pathol.*, 1980. Vol. 35. P. 304–310.
- Kumar C.G., Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint // *Biotechnology advances* 17. 1999. P. 561-594
- Laksanalamai P., Robb F.T. Small heat shock proteins from extremophiles: a review // *Extremophiles*. 2004. 8: 1-11
- Lane D. J. 16S/23S sequencing // In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / Stackebrandt E. a. Goodfellow M. (Eds.) // Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 1991. P. 115-175.
- Lavrentieva E.V., Shagzhina A.P., Babasanova O.B., Dunaevsky Y.E., Namsaraev Z.B., Barkhutova D.D. The Study of Two Alkaliphilic Thermophile Bacteria of the *Anoxybacillus* Genus as Producers of Extracellular Proteinase // *Appl. Biochem. and Microbiol.* 2009. Vol. 45. No. 5. P. 484–488.
- Li Y, Engle M, Weiss N, Mandelco L, Wiegel J. 1994. *Clostridium thermoalcaliphilium* sp. nov., an anaerobic and thermotolerant facultative alkaliphile // *Int. J. Bacteriol.* 44:111-118.
- Li Y, Mandelco L, Wiegel J. 1993. Isolation and characterization of a moderately thermophilic anerobic alkaliphile, *Clostridium paradoxum* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:450-460.
- Ma Y., Zhang W., Xue Y., Zhou P., Ventosa A., Grant W.D. Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lakes as revealed by 16S rRNA gene sequence analyses // *Extremophiles*. 2004. Vol. 8. P. 45-51.
- Machius M., Wiegand G., Huber R. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase at 2.2 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 1995. Vol. 246, № 4. P. 545-559.
- Mala B. Rao, Aparna M. Tanksale, Mohini S. Ghatge, Vasanti V. Deshpande. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // *Microbiol. molecular biology reviews*. 1998. P. 597-635.
- Martins R.F., Davids W., Levander W.A.F., Radström P., Hatti-Kaul R. Starch-hydrolyzing bacteria from Ethiopian soda lakes // *Extremophiles*. 2001. Vol. 5. P. 135-144.
- Marteinsson V.T., Kristjansson J.K., Kristmannsdottir H., Dahlkvist M., Saemundsson

K., Hannington M., Petursdottir S.K., Geptner A., Stoffers P. Discovery and description of giant submarine smectite cones on the seafloor in Eyjafjordur, Northern Iceland, and a novel thermal microbial habitat // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. P. 827-833.

Matsui I., Harata K. // *FEBS Journal.* 2007. V. 274. P. 4012-4022

Monod M., Cappocia S., Léchene B., Zaugg C., Holdom M., Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. // *Int. J. Med. Microbiol.*, 2002. V. 292. P. 405-419.

Moon J.L., Shaw L.N., Mayo J.A., Potempa J., Travis J. Isolation and properties of extracellular proteinases of *Penicillium marneffeii*. // *Biol. Chem.* 2006. V. 387(7). P. 985-993.

Namsaraev Z.B., Babasanova O.B., Dunaevsky Y.E., Akimov V.N., Barkhutova D.D., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B. *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, Central Mongolia // *Microbiology.* 2010. Vol. 79. № 4. pp. 491-499

Navarrete A., Peacock A., Macnaughton S.J., Urmeneta J., Mass-Castella J., White D.C., Guerrero R. Physiological status and composition of microbial mats of the Ebro, Spain, by signature lipid biomarkers // *Microbial Ecology.* 2000. Vol. 39. N. 1. P. 92-99.

Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustrophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustrophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. Vol. 51. P. 433-446.

Nazina T.N., Sokolova D.Sh., Grigoryan A.A., Shestakova N.M., Poltarau A.B., Tourova T.P., Lysenko A.M., Osipov G.A. and Belyaev S.S. *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species // *Syst. Appl. Microbiol.* 2005. 28. P. 43-53.

Nazina T.N., Lebedeva E.V., Poltarau A.B., Tourova T.P., Grigoryan A.A., Sokolova D.Sh., Lysenko A.M. and Osipov G.A. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcani* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. 54. P. 2019-2024.

Nielsen J.E., Borchert T.V. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases // *Biochim. Biophys. Act.* 2000. Vol. 1543. № 2. P. 253-274.

Nielsen P., Rainey F.A., Outtrup H., Priest F.G., Fritze D. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus* // FEMS Microbiol. Lett. 1994. Vol.117. P. 61-66.

Olempska-Beer Z.S., Merker R.I., Ditto M.D., DiNovi M.J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2006. Vol. 45. № 2. P. 144–158.

Oliveira A.S., Xavier-Filho J., Sales M.P. Cysteine proteinases and cystatins. // Brazil. Arch. Biol. Technol., 2003. V. 46 (1). P. 91–104.

Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications // Journal of industrial Microbiology & Biotechnology. 2002. V.28. P.56-63

Peddie C.J., Cook G.M., Morgan H.W. Sucrose transport by the alkaliphilic, thermophilic *Bacillus* sp. Strain TA2.A1 is dependent on a sodium gradient // Extremophiles. 2000. №4. P. 291-296

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. № 3. P. 597-635

Rawlings N.D., Barrett A.J. Evolutionary families of peptidases // Biochemical Journal. 1993. V. 290. P. 205–218.

Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. MEROPS: the peptidase database. // Nucl. Ac. Res. 2008. V. 36. P. 320-325.

Rhee J. New thermophilic and thermostable esterase // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71. P. 817-825.

Romano I., Giordano A., Lama L., Nicolaus B., Gambacorta A. Characterization of a haloalkaliphilic strictly aerobic bacterium, isolated from Pantelleria island. // Syst. Appl. Microbiol. 1996. Vol.19. P. 326-333.

Romano I., Giordano A., Lama L., Nicolaus B., Gambacorta A. *Halomonas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy // Syst. Appl. Microbiol. 2005. Vol. 28. P. 610-618.

Sadler M., McAninch M., Alico R., Hochsrein L.I. // Can. J. Microbiol. 1980. V.26. № 4. P. 496-502

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. 84: 5463-5467

Sarkar A. Isolation and characterization of thermophilic, alkaliphilic, cellulose-degrading *Bacillus thermoalcaliphilus* sp. nov. from termite (*Odontotermes obesus*) mound soil of a semiarid area // Geomicrobiol J. 1991. 9:225-232

Schoen C., Reichard U., Monod M., Kratzin H.D., Ruchel R. Molecular cloning of an extracellular proteinase from *Rhizopus microspores* and evidence for its expression during infection // *Med. Mycol.* 2002. V. 40. P. 61-71.

Schwarz W.H., Zverlov V.V. // *Mol. Microbiol.* 2006. V.10. № 1. P. 1-4

Seemuller E., Lupas A., Stock D., Lowe J., Baumeister W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease // *Science.* 1995. V. 268. P. 579-582.

Shiga Y., Yamagata H., Tsukagoshi N., Udaka S. // *Biosci. Biothechnol. Biochem.* 1995. V.59. № 12. P. 2348-2350

Sims A.H., Dunn-Coleman N.S., Robson G.D., Oliver S.G. Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi // *FEMS Microbiology letters.* 2004. V. 239. P. 95-101.

Singh J., Batra N., Sobti C. // *Proc. Biochem.* 2001. V. 36. P. 781-785

Sorokin D.Yu., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B., Namsaraev Z.B., Lysenko A.M., Eshinimaev B.Ts., Khmelenina V.N., Trotsenko Y.A., Kuenen, J.G., Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian soda lakes // *Hydrobiologia.* 2004. Vol. 522. P. 235-248.

Sorokin, D.Yu., Kuenen, J.G. Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. Vol. 52. P. 287-295

St. Leger R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects // *Can. J. Bot.*: 1995. Vol. 73. P. 1119-1125.

Stetter K.O. // *FEBS Letters.* 1999. Vol. 452. P. 22-25

Tehei M., Zacca G. // *FEBS J.* 2007. Vol. 274. P. 4034-4043

Togni G., Sanglard D., Falchetto R., Monod M. Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis* // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 286. P. 181-185

Truper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in Thiorhodaceae. I. Quantative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. And Serol.* 1964. Vol.30. №3. P. 225

Uhl A.M., Daniel R.M. The first description of an archaeal hemicellulase: the xylanase from *Thermococcus zilligii* AN1 // *Extremophiles.* 1999. Vol. 3. P. 263-267.

Unsworth L.D., van der Oost J., Koutsopoulos S. // *FEBS Journal.* 2007. Vol. 274. P. 4044-4056.

Van de Vossenber J.L., Albers S.-V., Driessen A.J.M., Konings W.N. // *Extremophiles.* 2001. Vol. 5. P. 285-294.

Vieille C., Zeikus G.J. // *Microbiol. Mol. Biol.Rev.* 2001. V.65. P.1-43.

Vreeland R.H., Lichfield C.D., Martin E.L., Elliot E. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1980. Vol.30. P. 485-495.

Wang H.-C., Xia X., Hickey D. // J. Mol. Evol. 2006. Vol. 63. P. 120-125.

Ward D.M., Ferris M.J., Nold S.C., Bateson M.M. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. Vol. 62. P.1353-1370.

Ward D.E., Shockley K.R., Chang L.S., Levy R.D., Michel J.K., Connors S.B., Kelly R.M. Proteolysis in hyperthermophilic microorganisms // Archaea. 2002. Vol. 1. P. 63-74.

Wiegel J Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. Extremophiles. 1998. 2:257-267

Wiegel J., Kevbrin V.V. Alkalithermophiles // Biochem. Soc. Trans. 2004. Vol. 32. part 2. P. 193-198.

Williams R.A.D., Smith K.E., Welch S.G., Micallef J. *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 // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. Vol. 46. P. 403-408.

Wlodawer A. Proteasome: a complex protease with a new fold and a distinct mechanism. // Curr. Biol., 1995. V. 3. P. 417-420.

Wray L.V., Ferson A.E., Rohrer K., Fisher S.H. TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 8841-8845.

Zeikus J.G., Vieille C., Savchenko A. Thermozyms: biotechnology and structure-function relationships // Extremophiles. 1998. Vol. 2. p. 179-183

Zhilina T.N., Appel R., Probian Ch. et al. Alkaliflexus imshenetskii gen. nov., sp. nov. – a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermented bacterium with propionate formation from a soda lake // Arch. Microbiol. 2004. Vol. 182. P. 244-253.

Zhilina, T.N., Zavarzin, G.A., Detkova, E.N., Rainey, F.A. sp. nov., *Natroniella acetigena* gen. nov., sp. nov., an extremely haloalkaliphilic, homoacetic bacterium: a new member of Haloanaerobiales // Corr. Microbiol. 1996. Vol.32. P.320-326.

Zhilina T.N., Zavarzin G.A. Alkaliphic anaerobic community at pH 10 // Curr. Microbiol. 1994. Vol. 29. P.109-112.

Zverlov V., Mahr S., Riedel K., Bronnenmeier K. Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (celA) from the extreme thermophile Anaerocellum thermophilum with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains //

Microbiology. 1998. Vol. 144. P. 457-465.

Yamamoto H., Hiraishi A., Kato K., Chiura H.X., Maki Y., Shimizu A. Phylogenetic evidence for the existence of novel thermophilic bacteria in hot-spring sulfur-turf microbial mats in Japan // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol.64. P.1680-1687.