

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

ӘОЖ 60:57(574)(043)

Қолжазба құқығында

МАШЖАН АҚЖІГІТ СЕМБАЙҰЛЫ

**Перспективті гидролиздік ферменттерді алу үшін Қазақстандық
термофильді бактерияларының метагеномдық анализі**

6D070100 - Биотехнология

Философия докторы (PhD)

ғылыми дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Ғылыми кеңесшілері:

б.ғ.к., қауымдастырылған профессор Кистаубаева А.С.,

PhD, профессор Биркленд НК.

(Берген университеті, Норвегия)

Қазақстан Республикасы

Алматы, 2024 жыл

МАЗМҰНЫ

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР	4
АНЫҚТАМАЛАР	5
БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР	6
КІРІСПЕ	8
1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ	14
1.1 Термалды су көздерінің метагеномикасы	14
1.1.1 Метагеномика, <i>in vitro</i> жағдайында өспейтін микроорганизмдер қауымдастықтарының биологиялық эралуандылығын зерттеудің негізгі құралы ретінде	14
1.1.2 Метагеномдық мәліметтерді биоинформатикалық анализдың жолдары	16
1.1.3 Термалды су көздерінде тіршілік ететін бактериялардың метагеномикасы және экологиясы	18
1.1.4 Қазақстанның аумағында орналасқан геотермалды су көздері	19
1.2 Термофильді микроорганизмдердің физиологиялық өзгешеліктері	21
1.2.1 Термофильді микроорганизмдердің жоғары температураға және рН-қа бейімделу механизмдері	21
1.2.2 Термофильді микроорганизмдерге оттегінің әсері және метаболикалық эралуандылығы	22
1.3 Термофильді бактериялардың гидролитикалық ферменттері	24
1.3.1 Термотұрақты ферменттердің биотехнологиядағы маңызы	28
2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ	33
2.1 Зерттеу материалдары	33
2.1.1 Үлгілерді жинау	33
2.2 Зерттеу әдістері	33
2.2.1 Зерттеудің физикалық және химиялық әдістері	33
2.2.2 Бастапқы жинақтаушы дақылдарды алу	33
2.2.3 Үлгілерден таза дақылдарды бөліп алу	34
2.2.4 Жұмыста қолданылған коллекциялық штамдар	34
2.3 Бактериялардың биохимиясы және морфологиясы	34
2.3.1 Қоректік орталарды дайындау	34
2.3.2 Анаэробты субстратты дайындау	36
2.3.3 Бактериялардың өсуіне температура, рН және NaCl концентрациясының әсері	37
2.3.4 Жарық және электронды микроскопия	37
2.3.5 Аналитикалық әдістер	37
2.3.6 Жасушалық май қышқыл құрамын анықтау	39
2.4 Молекулалық-генетика және биоинформатикалық әдістер	39
2.4.1 Метагеномдық анализ	39
2.4.2 Секвенирлеу және деректер анализі	39
2.4.3 Геномдық ДНҚ молекуласын бөліп алу	43

2.4.4	ПТР әдісі	43
2.4.5	Бактерия изоляттарының 16S рРНҚ гендерін секвенирлеу	44
2.4.6	Филогенетикалық ағаштарды құрастыру	44
2.4.7	Термофильді бактерияларды секвенирлеу	45
2.4.8	Геномды <i>De novo</i> жинақтау	45
2.4.9	Mauve бағдарламасы	45
2.4.10	Геномды сипаттау	45
2.4.11	Геномдарды салыстыру	45
2.4.11.1	GGDC бағдарламасы	45
2.4.11.2	TYGS сервері	46
2.4.11.3	ANI бағдарламасы	47
2.4.11.4	BRIG бағдарламасы	47
3	ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ	48
3.1	Жаркент геотермалды су көздерінің микробтық әралуандылығы	48
3.1.1	Метагеномдық анализ	48
3.1.2	Метагеномнан жинақталған геномдар	58
3.2	Термофильді микроорганизмдерді оқшаулау. Олардың сипаттамасы және филогенетикалық анализі	73
3.2.1	N1 үлгісінен бөлініп алынған микроорганизмдердің сипаттамасы	75
3.2.2	N2 үлгісінен бөлініп алынған микроорганизмдердің сипаттамасы	88
3.3	Жаркент геотермалды су көздерінен бөлініп алынған штамдардың жасушадан тыс гидролитикалық белсенділігі	96
3.4	Перспективті жаңа штамдардың геномдарын секвенирлеу, <i>de novo</i> жинақтау және оларды сипаттау	103
	ҚОРЫТЫНДЫ	119
	ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	121
	ҚОСЫМШАЛАР	139

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

Диссертацияда келесі стандарттар мен ережелерге сілтеме жасалды:

МЕМСТ 7.32-2001. Ғылыми-зерттеу жұмысы туралы есеп. Құрылымы және дайындау ережелері.

МЕМСТ 7.1-2003. Библиографиялық жазба. Библиографиялық сипаттама.

Жалпы талаптар және құрастыру ережелері.

МЕМСТ 1613-2006. Тисті зертханалық практика. Негізгі ережелер

АНЫҚТАМАЛАР

Bootstrap - статистиканы бағалауға арналған есептеу әдісі.

Биннингтеу - оқылымдарды немесе контигтерді топтастыру және оларды жеке геномға жинақтау процесі.

Геномды жинақтау - нативті ДНҚ молекуласының бастапқы ретін қайта құрастыру мақсатында секвенирлеу нәтижесінде пайда болған көптеген қысқа ДНҚ фрагменттерін (оқылымдардың) ұзын бір немесе бірнеше тізбектерге (контигтерге) біріктіру процесі.

Геномды сипттау - геномда орналасқан гендер мен барлық кодтау аймақтарын және сол гендердің механизімін анықтау процесі.

Жинақтаушы дақыл - белгілі бір микроорганизмнің өсуін басқаларға қарағанда үстем ету мақсатында үлгіні арнайы қоректік заттармен байыту.

Контигтер - шотган (Shotgun) секвенирлеуі арқылы алынған шағын ДНҚ фрагменттерін жинақтау нәтижесінде пайда болатын үздіксіз тізбектер.

Клада - шығу тегі ортақ атадан таралған және оның барлық тікелей ұрпақтарынан тұратын организмдер тобы.

Қоректік ортаға тәуелді әдісі - дәстүрлі немесе жетілдірілген әдістердің әртүрлі комбинацияларын қолдану арқылы қоректік орталарда өсуге қабілетті табиғи изоляттарды бөліп алу және скринингтеу.

Қоректік ортаға тәуелсіз әдісі - дақылдау әдістерін қолданусыз тұтас ДНҚ молекуласын тікелей үлгіден бөліп алуға негізделген.

Метагеномика - немесе «Қоршаған орта геномикасы» дегеніміз, белгілі бір қоршаған ортадан алынған үлгідегі микроорганизмдердің алуандылығын және гендік құрамын анықтайтын ғылымның саласы.

Метадеректер - ДНҚ немесе РНҚ тізбегі алынған үлгіні сипаттайтын (соның ішінде аты, кіріс және шығыс деректерінің параметрлері / пішім) ақпарат.

Метагеномнан жинақталған геномдар (МЖГ) - метагеном деректерінен қалпына келтіріліп жинақталған микробтық геномдар.

Оқылымдар - секвенирлеу нәтижесінде шыққан төрт түрлі негізден (А, Т/У, G, C) тұратын қысқа фрагменттер.

Пангеном - бұл клададағы барлық штамдар гендерінің толық жиынтығы. Жалпы мағынада пангеном клада құрайтын барлық штамдардың гендер жиынтығын біріктіреді.

Тізбек (Секвенс) - секвинатор көмегімен генетикалық кодтың ретін оқу нәтижесі.

Тізбектерді теңестіру - нуклеотидтік тізбектер арасындағы функционалдық, құрылымдық немесе эволюциялық қатынастардың салдары болуы мүмкін ұқсас аймақтарын анықтау үшін ДНҚ, РНҚ немесе ақуыздың тізбектерін реттеу тәсілі.

Тіркеу нөмірі - биологиялық полимер тізбек реттілігін деректер базасына (GenBank, Refseq және т.б) енгізілген кезде оған берілетін нөмірі.

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

МЖГ	(Metagenome-Assembled Genome) Метагеномнан-жинақталған геномдар
ПТР	Полимеразды тізбектер реакциясы
ФҚ	Фермент қарқындылығы
BRIG	(BLAST Ring Generator) БЛАСТ Ринг генераторы
dDDH	(digital DNA-DNA hybridization) Сандық ДНҚ-ДНҚ гибридизация
COG	(Clusters of Orthologous Groups) Ортологиялық топтардың кластерлері
CRISPR	(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Тұрақты интервалды қысқа палиндромдық қайталаулар бар кластерлер
CECT	(Spanish Type Culture Collection) Испан типтік дақылдар жинағы
CBM	(Carbohydrate-binding modules) Көмірсуларды байланыстыру модулдері
CGView	(Circular Genome Viewer) Сақиналы геномды қарау құралы
dDDH	(digital DNA-DNA hybridization) сандық ДНҚ-ДНҚ гибридизация немесе <i>in silico</i> гибридизация
DRAM	(Distilled and Refined Annotation of Metabolism) Метаболизмнің дистилденген және нақытыланған сипаттауы
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
GBDP	(Genome Blast Distance Phylogeny) Геном Бласт қашықтық филогенезі
GGDC	(Genome-to-Genome Distance Calculator) Геномнан геномға қашықтық калькуляторы
HMM	(Hidden Markov Model) Жасырын Марков моделі
HSPs	(High-Scoring Segments) Жоғары ұпай жинайтын сегменттер
KCTC	(Korean Collection for Type Cultures) Корей типтік дақылдар жинағы
LCB	(Local Colinear Blocks) Жергілікті коллинеарлы блоктар
MMF	(Mineral Medium, fresh water) Анаэробты бактерияларды дақылдауға арналған минералды қоректік орта
MAUVE	(Multiple Genome Alignment) Мультипл геном алаймент
MSA	(Multiple Sequence Alignments) Мультип секвенс алаймент (MCA)
NGS	(Next-generation sequencing) Некст дженерейшен секвенсинг
OrthoANI	(Average nucleotide identity by Orthology) Ортология бойынша орташа нуклеотидтердің сәйкестігі
ORF	(Open Reading Frame) Опен ридинг фрейм

Prokka	(Prokaryotic annotation) Прокариоттық сипаттау
PcoA	(Principal Coordinate Analysis plot) Негізгі координаталық анализ сызбасы
RAST	(Rapid Annotation using Subsystem Technology) Ішкі жүйе технологиясын қолдану арқылы жылдам сипаттау
RefSeq	(Reference Sequence Database) Эталонды тізбектердің деректер қоры
SEED viewer	(Environment for genome annotation and comparison) Геномды сипаттау және салыстыру үшін орта
TYGS	(Type (Strain) Genome server) Типтік (Штамм) Геном сервері

КІРІСПЕ

Зерттеу жұмысының жалпы сипаттамасы. Диссертациялық жұмыс метагеномиканың жаңа буынды секвенирлеу әдістерін, дәстүрлі микробиологиялық әдістерімен ұштастыра отырып Қазақстан аумағында орналасқан геотермалды су көздеріндегі гидролитикалық белсенділігі бар микроорганизмдер қауымдастығының таксономиялық әралуандылығын және биотехнологиялық потенциалын анықтауға арналған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Қазіргі таңда геотермалды мекен ету орталарындағы микробтық қауымдастықтың генетикалық әралуандылығын анықтау, сонымен қатар осы экстремалды орталарда мекен ететін термофильді бактерияларды және олардың ақуыздарын зерттеу бірдей экологиялық және биотехнологиялық тұрғыдан қызықты [1]. Осындай экстремалды орталарда мекен ететін термофильді және гипертермофильді микроорганизмдермен өндірілетін ферменттер, термозимдердің мезофильді аналогтарымен салыстырғанда бірқатар биотехнологиялық артықшылықтары бар [2]. Ең басты артықшылығына олардың термотұрақтылығын айтуға болады. Бұл қасиет ферментативті реакцияларды жоғары температурада жүргізу арқылы оның жылдамдығын арттыруға және микробтық ластану қауіпін азайтуға мүмкіндік береді [3]. Термотұрақтылық әдетте жоғары рН көрсеткіштеріне, шектен тыс жоғары қысымға, химиялық денатуранттарға және органикалық еріткіштерге жоғары төзімділікпен қатар жүреді [4]. Бұл, өз кезегінде ферменттерді тазартуды әлдеқайда жеңілдетеді, себебі мезофильді жасушаларда экспрессиядан кейін мақсатты ақуыздан басқа қажетсіз ақуыздарды қарапайым қыздыру арқылы жоюға мүмкіндік береді [3].

Өнеркәсіпте ферментативті гидролизді қолданудың пайдасына маңызды дәлелі ретінде ферменттердің қатаң арнайылығы мен бағытталған әрекеті, сәйкесінше, заттардың трансформация процесін бақылау және соңында мақсатты өнімді алу мүмкіндіктерін атап айтуға болады [5].

Бүгінгі таңда гидролитикалық белсенділігі бар термофильді микроорганизмдердің саны жеткілікті түрде анықталған. Осылардың ішінде гликозил-гидролаза продуценттеріне, термофильді амилолитикалық бактериялар *Geobacillus stearothermophilus* және *Geobacillus* sp. GS33 [6-9], архебактериялар *Pyrococcus* sp. және *Thermococcus profundus* [10, 11], термофильді целлюлолитикалық бактериялар *Thermotoga maritima* [12], *Ornatilinea apprima* [13], *Thermosipho* sp. 3 [14], *Caldicellulosiruptor* spp. [15, 16] және басқалар жатады. Термофильді протеолитикалық бактерияларға *Fervidobacterium islandicum* [17], *Fervidobacterium pennavorans* [18], *Clostridium sporogenes* [19], *Meiothermus ruber* H328 [20], *Bacillus licheniformis*, *Thermoanaerobacter* spp. [21] және басқа штамдарды жатқызуға болады.

Гидролазаларды қолдану салаларына келетін болсақ, қағаз, тоқыма өнеркәсібі және түрлі қалдықтарды (соның ішінде өсімдік және жануар

тектес қалдықтар) қайта өңдеуде соңғы жылдары алға шығып, жылдан-жылға ұлғаюда, осыған байланысты белгілі немесе қасиеттері тиімдірек жаңа гидролазаларға сұраныс артуда.

Термофильді ферменттер иесінің өсу температурасында жұмыс істеуге бейімделген. Осылайша, тіршіліктің табылған экстремалды диапазоны фермент белсенділігінің жұмыс жасау жағдайларының диапазонын анықтайды [22]. Термофильдерді окшаулау және сипаттау әлемнің көптеген бөліктерінде орналасқан геотермалдық су көздерінде орындалды, соның ішінде АҚШ [23-25], Италия [26], Түркия [27], Болгария [28], Греция [29], Жаңа Зеландия [30] және Үндістан [31].

Қазақстан аумағы көптеген геотермалды су көздеріне бай [32], сол суларда мекен ететін микробтық қауымдастықтары осы уақытқа дейін әлі толық зерттелмеген. Бұл өз кезегінде осы геотермалды суларды биотехнологиялық перспективтілігі бар жаңа экстремофильді микробтардың потенциалды көздері болуы мүмкіндігін көрсетеді.

Экстремалды мекендеу орталарындағы микроорганизмдердің филогенетикалық әралуандылығын зерттеулер көрсеткендей, термофильді микроорганизмдердің көп бөлігінің лабораториялық дақылдары алынбаған [1]. Бұған бірден бір себеп, жер бетінде тіршілік ететін микроорганизмдердің 99%-ға жуығы стандартты лабораториялық жағдайларда өсуге қабілетсіз, ал бұл оларды дәстүрлі микробиологиялық және биохимиялық әдістер көмегімен анықтауды және сипаттауды мүмкін емес етеді [33]. Кейінгі жылдары бұл мәселені шешуге молекулалық биологияның заманауи әдістері жол ашты және солардың бірі - Метагеномика.

Метагеномдық анализ термалды су көздерінен, дақылға тәуелсіз әдістерді пайдалану арқылы микроорганизмдерді және ықтимал жаңа пайдалы ферменттерді анықтауға мүмкіндік береді [1]. Қазіргі таңда метагеномиканың жаңа буынды секвенирлеу әдістері, күрделі микробтық қауымдастықтар туралы жан-жақты түсінікті қамтамасыз ететін дәстүрлі дақылға негізделген әдістерді толықтыра алады [34, 35]. Сол себепті, Қазақстан аумағындағы геотермалды су көздерінен перспективті гидролитикалық микроорганизмдерді идентификациялау ғылыми тұрғыдан да, қолданбалы тұрғыдан да өзекті болып табылады. Бұл жұмыс биотехнологияның дамуына, соның ішінде жоғары температурада белсенді ферменттерді өндіруге қабілетті бірегей гидролитикалық қасиеттері бар микроорганизмдердің жаңа түрлерін ашуға мүмкіндік береді [10].

Бұл зерттеу экстремалды ортадағы микроорганизмдердің биоәралуандылығы мен экологиясы туралы түсінігімізді кеңейтуге ықпал етеді, ал бұл жалпы ғылыми прогресс үшін және өнеркәсіп пен басқа да ғылым салалары үшін маңызды.

Зерттеу тақырыбының мақсаты: Қазақстан геотермалды су көздеріндегі термофильді гидролитикалық микроорганизмдер қауымдастығының таксономиялық әралуандылығын анықтау.

Мақсатқа жету үшін келесі **міндеттер** қойылды:

1. Метагеномика әдістерін қолдана отырып, Жаркент геотермалды су көздеріндегі микробтық қауымдастықтарының таксономиялық әралуандылығын зерттеу;

2. Зерттелетін микробтық қауымдастықтардан термофильді бактериялардың жаңа штамдарын/түрлерін бөліп алу және идентификациялау;

3. Бөлініп алынған термофильді бактерия штамдарының гидролитикалық белсенділіктерін анықтау;

4. Термофильді бактерияларды дақылдау үшін қоректік ортаны оңтайландыру;

5. Перспективті штамдарының геномдарын толық секвенирлеу және сипаттау.

Зерттеу нысаны. Зерттеу нысаны ретінде Алматы облысында орналасқан Жаркент геотермалды су көздерінен алынған үлгілердегі микроорганизмдер қауымдастығы және изоляттар. Тайланд мемлекетінің халқаралық микроорганизмдер коллекциясынан алынған *Polycladomyces subterraneus* KSR 13 (коллекциялық нөмірі BCC 50740) типтік штамы қолданылды.

Зерттеу пәні. Геотермалды су көздерінен алынған микроорганизмдерді сипаттау және идентификациялау.

Зерттеу әдістері. Жұмыс барысында метагеномдық, геномдық, микробиологиялық және биохимиялық әдістер қолданылды. NGS секвенирлеуі Illumina платформаларында (HiSeq 4000) орындалды. Бастапқы NGS деректерін биоинформатикалық өңдеу, *de nova* жинақтау және сипаттау мамандандырылған CLC Genomic Workbench v. 20.0.01, KBase және RAST v. 1.073 бағдарламалар арқылы жүзеге асырылды. Сонымен қатар метагеномнан толық геномды құрастыру MaxBin2 v. 2.2.4, CONCOCT v. 1.1, MetaBAT2 v. 1.7 бағдарламалары көмегімен іске асырылды.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы:

Бактериялар қауымдастығы метагеномдық секвенирлеу нәтижесі бойынша негізгі 3 типтен тұратыны анықталды оларға: *Firmicutes*, *Deinococcus* - *Thermus*, және *Actinobacteria*, осылардың ішінде *Firmicutes* және *Deinococcus* - *Thermus* тип бактериялары жоғары доминанттылық көрсетті.

Метагеном тізбектерінен 11 МЖГ алынып *Geobacillus*, *Pseudomonas*, *Fervidobacterium*, *Caloramator*, *Calditerricola*, *Sutcliffiella*, *Anaerobacillus*, *Paenibacillus*, *Parageobacillus* және *Thermus* тұқымдастарымен байланысты екенін көрсетті.

Жаркент геотермалдық су көздерінен алынған микробтық қауымдастық үлгілерінен бірінші рет 7 туыстасқа жататын: *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Polycladomyces*, *Thermus*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldanaerobacter*, және *Thermoanaerobacter* термофильді бактерияларының таза дақылдары бөлініп 16s рРНҚ гендері бойынша секвенирленді. *Polycladomyces* spp. және

Caldanaerobacter sp тұқымдастарына жататын үш термофильді бактерия штамдарының геномдары секвенирленді.

Бірінші рет Жаркенттің геотермалды су көздерінен жаңа, жоғары целлюлазалық белсенділігі бар термофильді бактерия түрі бөлініп алынды, оған *Polycladomyces zharkentensis* ZKZ2^T (=KCTC 43421, =CECT 30708) деген атау берілді және жаңа кератиназалық белсенділігі бар термофильді бактерияның түр іші (subspecies) *Caldanaerobacter subterraneus subspecies keratonaliticus* КАк бөлініп, сипатталды. Бұл кератиназалық қасиеті бар бактерия өңделмеген тауық қауырсынында өсетін *Caldanaerobacter* тұқымдасының алғашқы анықталған түр іші болып табылады.

Сонымен қатар оңтайлы өсу температуралары 75°C тең, қазіргі уақытта белгілі *Geobacillus* тұқымдастарының ішінде ең жоғары температураға төзімділіктерімен ерекшеленген аэробты өкілдері – *Geobacillus* 3WАк3 және *Geobacillus* 3SAк4 бактерияларының жаңа штамдары бөлініп сипатталды.

Жұмыстың ғылыми және практикалық маңызы. Жаркент геотермалды су көзі (Алматы облысы) микробтық қауымдастықтарының филогенетикалық әралуандылығын анализдеу экстремофильді микробтық қауымдастықтардың тұраралық өзара әрекеттесуін түсінуге ықпал етеді. Метагеномдық және микробиологиялық зерттеулер нәтижелері, экстремалды орта микробиологиясы жайлы білімді кеңейтіп оны айқындай түседі. *Polycladomyces zharkentensis* ZKZ2^T термофильді бактериясының жаңа түрі бөлініп алынып, оған сипаттама беріліп халықаралық KCTC (Korean Collection for Type Cultures) және CECT (Spanish Type Culture Collection) дақылдық коллекцияларына депозитке енгізілді (=KCTC 43421, =CECT 30708) (Қосымша, А, Ә).

Жаркент геотермалды су көздерінен бірінші рет термофильді және гипертермофильді бактериялардың таза 54 изоляты бөлініп алынды. Осы бактерия изоляттарының гидролитикалық белсенділігі бойынша скрининг нәтижесінде протеазалық, целлюлазалық, амилазалық, және липазалық белсенділігі бар продуценттік штамдар анықталды. Бұл штамдар биотехнология үшін пайдалы және өндірістің түрлі салаларында (детергенттер өндірісі, химия өнеркәсібі, кератин және целлюлозасы бар қалдықтарды өңдеу және басқа салаларда) қолданылатын ферменттердің көзі ретінде қолданыс таба алады.

Бөлініп алынған анаэробты *Caldanaerobacter subterraneus subspecies keratonaliticus* КАк штамының күрделі жолмен гидролизденетін β -кератин ақуызын ыдырату (тауық қауырсындары) қабілеті анықталды және осы бактерия штамын өсіруге арналған қоректік орта оңтайландырылды.

16S рРНҚ гені бойынша гидролитикалық белсенділігі жоғары 16 бактерия штамдарының тізбегі, төрт метагеном және үш толық геном GenBank дүниежүзілік мәліметтер базасында депозиттелді (Қосымша Б).

«Кератинолитикалық белсенділігі бар анаэробты термофильді микроорганизмдерді өсіруге арналған қоректік орта» атты пайдалы үлгісіне ҚР патенті алынды. Патент №5803, 29.01.2021 ж (Қосымша В).

Қорғауға ұсынылған негізгі қағидалар:

1. Жаркент геотермалды су көздерінің прокариоттық микробиотасында *Firmicutes*, *Actinobacteria* және *Deinococcus - Thermus* бактерия типтері басым екені анықталды. Сонымен қатар, GenBank дерекқорынан алынған филотиптер мен дақылданбайтың микроағзалар арасында байқалған 97%-дан төмен ұқсастық, зерттелген геотермалды су көздерінде жаңа және бірегей түрлермен колонизацияланғанын көрсетті.

2. *Paenibacillus* sp., *Thermus* sp. және *Geobacillus* sp. бактерия өкілдерінің полисахаридтерді ыдыратуда (жоғары температурамен қатар) жоғары бейімділіктерімен ерекшеленді.

3. *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldanaerobacter*, *Polycladomyces*, *Calideclulosiraptor* тұқымдастарына жататын 16 перспективті штамдарының таза дақылдары бөлініп анықталды және осы термофильді микроорганизмдер құнды дақылдық коллекциясын жасау үшін негіз болды.

4. Оқшауланған термофильді штамдары термотұрақты гидролазалардың (целлюлаза, амилаза, протеаза, липаза) белсенді продуценттері екені анықталды.

5. Кератиназаның жаңа продуценті *Caldanaerobacter subterraneus subspecies keratonaliticus* KAK бактериясын өсіруге арналған оңтайландырылған қоректік ортасы, биомассаның максималды шығымдылығына және кератиназалық белсенділіктің жоғарылауына ықпал етеді.

6. Жаркент геотермалдық су көздерінің үлгілерінен бөлініп алынған *Polycladomyces* ZKZ2 штамы (*Bacillota* типі) филогенетикалық анализдың және толық геномды секвенирлеу нәтижелері бойынша жаңа түр болып анықталып және оған *Polycladomyces zharkentensis* ZKZ2^T sp.nov (=KCTC 43421, =CECT 30708) атауы берілді.

7. *Caldanaerobacter* тұқымдастарының ішінде кератин ақуызын ыдыратуға қабілеті бірінші жаңа гипертермофильді бактерия түрі іші бөлініп алынды және ол *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *keratonaliticus* KAK деп аталды.

Автордың жеке үлесі. Диссертация мен қолжазбаны жазу, зерттеу тақырыбы бойынша тәжірибелерді жобалау, зерттеулерді жүргізу, нәтижелерді биоинформатикалық өңдеу және анализ автордың жеке қатысуымен орындалды.

Жұмыстың ғылыми зерттеу бағдарламаларымен байланыстылығы. Бұл диссертациялық жұмыс СРЕА-LT-2017/10061 жобасы бойынша Норвегиялық халықаралық ынтымақтастық және жоғары білім беру сапасын арттыру агенттігінің (Diku) Еуразия бағдарламасы аясында (2017-2022 жж) және Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің Ғылым комитеті AP14871683 «Иммобилизацияланған термофильді бактерияларды пайдалана отырып кератинді қосалқы өнімдерді өңдеудің биотехнологиясы» жобасы аясында (2022-2024 жж) жүзеге асырылды.

Жұмыстың сыннан өтуі. Диссертациялық жұмыстың нәтижелері төмендегі халықаралық ғылыми конференцияларда баяндалды және талқыланды:

- «International Research and Practive Conference» халықаралық ғылыми конференциясы, 30 қаңтар - 07 ақпан 2019 ж., Шеффилд, Англия;

- «Биология - Наука XXI века» 23-ші халықаралық ғылыми конференциясы, 15-19 Сәуір 2019 ж., Пушино, Ресей;

- «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» халықаралық ғылыми конференциясы, 18-21 қараша 2020 ж., Екестеринбург, Ресей;

- Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» халықаралық ғылыми конференциясы, 6-9 сәуір 2020 ж., Алматы, Қазақстан;

- «Аспекты и Инновации Экологической Биотехнологии и Биоэнергетики» халықаралық ғылыми конференциясы, 12-13 ақпан 2021 ж., Алматы, Қазақстан;

- «Biology and Biotechnology of Microorganisms International Conference» халықаралық ғылыми конференциясы, 16-17 қыркүйек 2021 ж., Ташкент, Өзбекістан;

Басылымдар. Диссертацияның негізгі нәтижелері баспадан шыққан 11 ғылыми еңбекте жарияланды, оның ішінде, 3 мақала ҚР ҒЖБМ Ғылым және жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитеті ұсынған отандық ғылыми журналдарда; 2 мақала *Web of Science* және *Scopus* деректер қорына енетін жоғары деңгейдегі ғылыми журналдарда; Springer-де ұжымдық монографияда 1 кітап бөлімі жарияланды. Сонымен қатар 1 пайдалы модельге Қазақстандық патент алынды.

Диссертацияның құрылымы. Диссертациялық жұмыс 143 мәтіндік беттен, нормативтік сілтемелер, анықтамалар, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістер, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды және 222 пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады. Диссертация көлеміне 48 сурет, 29 кесте және 5 қосымша кіреді.

1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Термалды су көздерінің метагеномикасы

1.1.1 Метагеномика, *in vitro* жағдайында өспейтін микроорганизмдер қауымдастықтарының биологиялық әралуандылығын зерттеудің негізгі құралы ретінде

Микробтық қауымдастықтың биологиялық әртүрлілігін зерттеу микробиология ғылымның пайда болуынан бастау алады. Бұл қауымдастықтар туралы ғылым бағытының дамуы жалпы биологиялық әдістердің, соның ішінде полимеразды тізбектер реакциясы, Сэнгер секвенирлеу әдістерінің дамуы және кейінірек жаппай параллельді секвенирлеу әдісі қолданумен тікелей байланысты болды [4].

Көптеген жылдар бойы жасанды қоректік ортада өсуге қабілетті микроорганизмдерді қоршаған орталардан, соның ішінде экстремофильді экожүйелерден бөліп алып, биотехнологиялық мәселелерді шешудегі дәстүрлі тәсілдерінің бірі ретінде қолданды. Бұндай ағзалар көбінесе арнайы коллекцияларда сақталып әрдайым жаңа түрлермен/штамдармен толықтырылып отырылған [10]. Соңғы жылдары биотехнология үшін құнды қасиеттері бар ферменттерді бөлетін көптеген жаңа микроорганизмдер түрлі табиғи көздерден бөлініп алынды. Олардың қасиеттеріне: сілтілі немесе қышқыл ортада жоғары тұрақтылық пен белсенділік, сондай-ақ жоғары немесе төмен температураға, органикалық еріткіштерге, тұздардың жоғары концентрациясына, ауыр металдарға төзімділік т.б. жатады. Осындай қасиеті бар биокатализаторларға Антарктида және Арктика аймақтарынан, терең теңіз экологиялық тауашаларынан [36] және геотермалды су көздерінде кездесетін микроорганизмдерден табылған кейбір ферменттер (липазалар, эстеразалар, амилазалар, целлюлазалар, гемицеллюлозалар, хитиназалар, пептидазалар және дегидрогеназалар т.б.) жатады [37]. Жоғарыда айтылғандарға қарамастан, бактериялар мен архейлердің көбі жасанды қоректік орталарда өсуге қабілетсіз және бұл көрсеткіш теңіз экожүйесіндегі микроорганизмдер үшін 99,9% астам болса, топырақ экожүйесінде кемінде 99,7% құрайды [38], осыған бірден-бір себеп, түрлі табиғи жағдайларда өмір сүретін микроорганизмдердің өзара және экожүйенің басқа организмдерімен әрекеттесетін көптеген құрамдас қауымдастықтардың құрамына кіруі. Сонымен қатар, *in vitro* жағдайда олардың өсіп-дамуы үшін қажетті факторлардың жеткіліксіздігі немесе зерттеушілердің оларды өсіруге жасанды жағдайларды жасай алмаумен байланысты. Осының салдарынан, әралуан микроорганизмдердің ішінен аз ғана бөлігі физиологиялық, биохимиялық және генетикалық жағынан зерттеліп, нәтижесінде өнеркәсіпте қолданылатын жаңа штамдар алынған. Дегенмен, микроорганизмдерді өсірудің дәстүрлі микробиологиялық әдістері таза дақылдардың биохимиялық, физиологиялық қасиеттерін сипаттауға және микроорганизмдерді жасушалық катализаторлар ретінде қолдану жолдарын табу үшін маңызды.

Дәстүрлі микробиологияның «қоректік ортаға тәуелді» әдістерімен салыстырғанда, «қоректік ортаға тәуелсіз» әдісін қолдану арқылы анализ, микробиологиялық әралуандылық неғұрлым жан-жақты бағалауды қамтамасыз етуге мүмкіндік береді [39]. Осындай заманауи әдістерді қолданатын бағыттардың бірі метагеномика болып табылады.

Метагеномика немесе басқаша «Қоршаған орта геномикасы» - дегеніміз белгілі бір қоршаған ортадан алынған үлгідегі микроорганизмдердің таксономиялық тиістілігін және гендік ерекшелігін анықтайтын ғылымның саласы (сурет 1) [33]. Метагеномика тарихын шартты түрде 1991 жылы Раса бастаған зерттеушілер тобының жарияланымынан бастап санауға болады [40]. Бұл зерттеудің авторлары микробтық қауымдастықтың филогенетикалық профилін жасау үшін 16S рРНҚ генін бірінші болып пайдаланды. Ал «метагеномика» термині кейінірек Handelsman тобының зерттеушілерімен 1998 жылы ұсынылды [41]. Бұл терминнің заманауи мағынасының ашылуы 2004 жылы бастау алады, осы жылдан бастап үлгіден бөлінген тұтас ДНҚ молекуласының ретін анықтау үшін метагеномикалық зерттеулерде NGS секвенирлеу әдісі қолданыла басталды [42, 43]. NGS технологиясының Сэнгер секвенирлеу әдісіне қарағанда артықшылықтарға ие болған, ол әлде қайда төмен бағасы және оқылатын нуклеотидтер тізбегінің үлкен көлемі, бұл өз кезегінде күрделі микробтық қауымдастықтардың метагеномикалық зерттеулерін жүргізуге мүмкіндік берді.



Сурет 1 - Метагеномикалық анализдың негізгі кезеңдері

Соңғы онжылдықтағы метагеномика әдісінің дамуы микробтық экология ғылымның алға басуына үлкен үлес қосты [44]. Қазіргі уақытта метагеномиканы ДНҚ молекуласының қажетті мөлшерін бөліп алуға болатын кез келген қауымдастықты анализ үшін қолданылатын әмбебап құрал ретінде қарастырады. Метагеномдық анализ экожүйелердің биоәралуандылық

дәрежесін бағалап қана қоймай сол қауымдастық ішінде доминантты түрлерді анықтау арқылы бүкіл қауымдастықтың генетикалық және метаболикалық байланыстарынан реконструкция жасауға мүмкіндік береді [44-46]. Бұл әдіс үлгідегі микробиологиялық қауымдастықтың сипатын толықтырып, алынған мәліметтердің дәлдігін арттырды. Осының бәрі өз кезегінде үлгідегі микроорганизмдердің кілтті гендерінің ретін анықтауға және оларды биотехнологиялық мәселелерді шешуде пайдалануға болатын мүмкіндік берді. Метагеномика әдістері микробиология мен биотехнологияға орасан зор ықпал етуде, өйткені олар жасанды ортада өспейтін микроорганизмдердің генетикасын және зат алмасу механизмдерін зерттеуге жол ашады [42, 43, 47]. Бұл сала потенциалды жаңа биокатализаторлар немесе ферменттер жайлы және *in vitro* жағдайында өспейтін микроорганизмдердің функциясы мен филогениясы арасындағы геномдық байланыстары, қауымдастықтың қызметі мен құрылымының эволюциялық профильдері туралы генетикалық ақпаратты беретін ғылым саласы болып табылады [36]. Сонымен қатар, ол микробтық функцияналдың жаңа гипотезаларын құруда қуатты құралы болып саналады, осыған бір дәлел ретінде протеородопсин негізіндегі фотогетеротрофияның немесе аммиакты тотықтырғыш архейлердің ашылуын айтуға болады [48, 49].

Кез-келген метагеномдық секвенирлеу жобасы негізгі екі сұраққа жауап алу үшін қолданылады, біріншісі, қауымдастықта қандай микроорганизмдер бар-жоғын анықтау болса, екіншісі, олардың әрқайсысы қауымдастықта қандай қызмет атқаратынын білу болып табылады [50]. Аталған сұрақтарға жауап алу үшін келесі жағдайларды нақтылау қажет: 1) қауымдастықтың құрамы (онда қандай түр өкілдері бар және қандай мөлшерде); 2) қауымдастықтың әрбір мүшесінің генетикалық потенциалы; 3) гендердің түр ішілік және популяция ішілік гетерогенділігі. Түпкі мақсат - қауымдастықтағы барлық микроорганизмдердің геномдарын толық реконструкциялау болып табылады. Бұл мәселелерді шешу көп жағдайда барлық микроорганизмдерден ДНҚ молекуласын бөліп алудағы техникалық шектеулерге, сонымен қатар оны секвенирлеу және нәтижелерін анализ мүмкіндіктеріне байланысты қиын болады. Дегенмен, секвенирлеу әдістері мен метагеномикадағы биоинформатикалық анализ жолдарының жылдан жылға дамуы осы және басқада шектеулерді шешуге жол ашады.

1.1.2 Метагеномдық мәліметтерді биоинформатикалық анализдың жолдары

Геномдарды жан-жақты толық реконструкциялауға жақындату үшін, секвенирлеу деректерін анализ өзара байланысты және бірін-бірі толықтыратын екі бағытта жүзеге асырылады: 1) жеке оқылымдарды контигтерге жинақтау, бұл жинақталған контигтерде табылған гендерді таксономиялық классификациялау және функцияларын болжауға мүмкіндік береді; 2) жеке оқылымдарды анализ нәтижесінде қауымдастықтың функционалдық және таксономиялық сипаттамасы [51].

Метагеномдық тізбектерді контигтерге жинақтау кезінде бірқатар техникалық шектеулер бар. Мысалға қауымдастықтағы микроорганизмдердің көптігі (санының көптігі) сәйкесінше, олардың геномдарының сан алуандығы контигтерді жинақтауды күрделендіреді, ал аз мөлшерде болатын геномдар (көлемі және көшірмесі аз) жинақтауға түспей контигтерде жартылай ғана көрсетіледі. Тағы бір шектеу популяцияның гетерогенділігімен байланысты, бұл үздіксіз тізбектердің фрагментациясына мүмкіндігін жоғарлатады, ал жақын туыстас организмдердің геномдары арасындағы жоғары ұқсастық «химерлік» контигтердің жиналуына алып келуі мүмкін [51].

Жинақтау нәтижесінде алынған контигтер түрлі организмдердің геномдық фрагменттер жиынтығы болғандықтан, оларды белгілі бір таксономиялық топтарға жатқызу немесе анықтау күрделі жұмыс. Бұл әсіресе референс тізбектері жоқ жаңа микроорганизмдерге қатысты болады. Дегенмен, нуклеотидтік құрамы негізінде (ГЦ құрамы, кодон жиілігі, гомология дәрежесі, олигонуклеотидтер жиілігі) және оқу жиілігі негізінде контигтерді кластерлеу, метагеномдық деректердің таксономиялық қатыстылығы бойынша биннингтеу әдісін қолдану арқылы жоғарыдағы мәселені шешуге мүмкіндік береді [50-52]. Биннингтеудің тиімділігі контигтің ұзындығына және қауымдастықта бір-біріне жақын түрлердің болуына байланысты, әдетте ұзындығы кемінде бірнеше мың нуклеотидті контигтер үшін бұл процесс сәтті жүзеге асырылады. Пайда болған контигтер жиынтығының таксономиялық тиістілігі филогенетикалық маркер гендерін анықтау нәтижесінде жүзеге асады. Мұндай реконструкцияланған геномдар шын мәнінде зерттелетін қауымдастықтарда болатын бір-біріне филогенетикалық жақын организмдердің (штамдар немесе түрлер) пангеномдары болып табылады [52].

Жеке оқылымдарды анализдеуге негізделген әдістерді, метагеномдық тізбектерді функционалдық және таксономиялық классификациялау үшін де қолдануға болады, бірақ бұл тәсіл көбінесе дерекқорда орналасқан референс геноммен салыстыру арқылы белгілі организмдерді анықтау үшін пайдаланылады. Оның жеке оқылымдарды контигтерге жинақтау әдісінен айырмашылығы, көлемі және көшірмесі аз мөлшерде болатын геномдарды жинақтауға түспеу мүмкіндігін жояды. Алайда, әдетте, қоршаған орта қауымдастықтарынан алынған үлгілердің оқылымдарының аз ғана бөлігі үшін ғана функциясы немесе таксономиялық тиістілігін болжауға болады, бұған себеп референс дерек қорларындағы ақпараттың аздығы, оқылымдар ұзындығы және секвенирлеу қателігінің жиілігі болып табылады [52].

Метагеномдық контигтерді сипаттау, негізінен бактериялар мен архейлердің геномдарын сипаттауына өте ұқсас, бірақ метагеномдық тізбектерде көбінесе вирустық және эукариоттық тізбектер кездеседі. Қазіргі уақытта KBase [53], MG-RAST [54], IMG/M [55] және CAMERA [56] сияқты биоинформатикалық серверлер метагеномды сипаттаудан басқа, алынған деректердің таксономиялық және функционалдық классификациясын қоса жасауға мүмкіндік береді. Осы серверлердің көмегімен талдалып термалдық

су көздерінен алынған метагеномдар, жоғары экстремалды қауымдастықтардың экологиясын және осындай орталардағы микроорганизмдердің өзара қарым қатынастары мен эволюциясын толық түсінуге үлес қосуда [1].

1.1.3 Термалды су көздерінде тіршілік ететін бактериялардың метагеномикасы және экологиясы

Қазіргі уақытта дәстүрлі микробиология әдістерінің көмегімен ең көп зерттелген геотермалды су көздері АҚШ аумағындағы Йеллоустоун ұлттық саябағының аумағында орналасқан. Дәл осы геотермалды суларыннан молекулалық биология үшін маңызды микроорганизм болып табылатын *Thermus aquaticus* термофильді бактериясының таза дақылы бөлініп алынған, сондай-ақ осы бактериядан бірінші термофильді полимеразаны алынған [57], бұл өз кезегінде 1988 жылы ПТР әдісінің пайда болуының негізін қалады [58]. Айта кететін мәселе, осы ыстық көздердің микробиологиялық әр түрлілігін зерттеудің айтарлықтай күрделілігіне қарамастан, қазіргі уақытта заманауи метагеномдық анализдың әдістерін қолдана отырып, олардың микробтық қауымдастықтарын зерттеу бойынша ауқымды жоба жүргізілуде [59], бұл жобаның нәтижелері көптеген жаңалықтардың ашылуына негіз бола алды.

Жер бетінде орналасқан түрлі геотермалды су көздерінде микробтық қауымдастықты қалыптастыратын негізгі фактор ретінде температура қарастырылған [60]. Осы геотермалды су көздерінің көпшілігі эукариоттық организмдердің және фотосинтетикалық организмдердің өсіп дамуына мүмкіндік бермейді. Мысал ретінде Исландиядағы бірегей ыстық су көздерін қарастыратын болсақ, онда микроорганизмдер бірлестігі мерзімді жоғары толқындардың салдарынан температураның және тұздылықтың ауытқуларына жиі ұшырайды, бұл өз кезегінде эукариотты организмдер өркендеуіне мүмкіндік бермейді. Ыстық температура кезеңдерінен ең ұзақ уақыт зардап шегетін аймақтарда жер бетінде мекен ететін термофильді бактериялар басымдылық көрсетсе, ал ең қысқа уақыт ыстық температура кезеңдерімен ерекшеленетін аймақтарда орташа термофильді микроорганизмдермен қоса мезофильді теңіз микроорганизмдері және протеобактериялар басым болатыны анықталған [61]. Дегенімен бактериялар қауымдастығының құрылымы негізінен температураға ғана тәуелді болғанымен, кейбір популяциялар басқа да факторларға тәуелді болуы мүмкін [62]. Термалды су көздерінің геохимиялық ерекшеліктері қауымдастықтың құрылымы мен әр түрлілігіне әсер ететін кілтті рөл ойнауы мүмкін [62].

Дақылдарға тәуелсіз әдістердің таралу және термофильді микроорганизмдер жайлы білімнің көбеюі нәтижесінде жердің барлық континенттерінде орналасқан басқа да геотермалды көздері зерттеліп сипатталуда. Мысалы: Италия [26], Болгария [28], Греция [29], Түркия [27], Индия [31], Жаңа Зеландия [30], Ресей [63], Қазақстан [64] және тағыда басқа

елдерінің аумақтарында орналасқан термалды су көздерін айтуға болады. Осы заманғы жаңа әдістерді пайдалана отырып, әр түрлі зерттеу топтары термалды қауымдастықтарының жалпы микроорганизмдер құрамын көрсетті және әрбір анықталған типтың пайыздық көрсеткішін сипаттаған. Сарапталған деректер осыған дейін анықталған топтардың басымдылығын растайды және термалды су көздерінің ерекшелігіне (температура, рН, минералдық құрамы және т.б.) және басқа белгілерге қатысты жаңа ашылмаған филотиптерді көрсетті. Африкадағы ыстық су көздерінен осы уақытқа дейін алынған сынамаларда *Proteobacteria*-ға жататын филотиптер басымдылық көрсетіп отырған [65]. Ресейдегі геотермалды су көздерінде Архейлердің *Thermoplasmatales* отрядына жататын жаңа *Euryarchaeota* типі басымдылық көрсеткен (барлық архейлердің 39%), осы зерттеудегі басқа кең таралған топ (барлық архейлердің 33%) MCG1 линиясына жататын *Crenarchaeota* типі болды, осы екі топ бүкіл дүние жүзіндегі ыстық су көздерінде кеңінен таралған [66]. Ал бактериялардың ішінде жанартау текті бейорганикалық субстраттарды пайдаланатын термоацидофильді метанотроптар мен күкіртті тотықтырғыш микроорганизмдер басым болған [66]. Колумбиялық ыстық, қышқыл су көздеріндегі микробтық қауымдастығының таксономиялық және метаболикалық ерекшеліктерін анализ нәтижесі бойынша алынған метагеномдық тізбектердің аз ғана бөлігі дерекқорларға сәйкес келгені көрсетілген, бұл тізбектегі жаңа таксондардың жоғары үлесіне байланысты болуы мүмкін, осы қауымдастықтың ішінде азот пен күкірт айналымына потенциалды (ықтималды) қатысатын кейбір топтар сипатталған [67].

Ыстық су көздерінде тіршілік ететін термофильді микроорганизмдерге географиялық қашықтықтың да әсер ететіні байқалған. Бірқатар микрорганизмдер топтары барлық ыстық су көздерінде кездесуі мүмкін, бірақ басқалары белгілі бір аймақтарда эндемик болып көрінетіні анықталды [65]. Кейбір зерттеулер бүкіл әлем бойынша ыстық су көздерінде таралған белгілі бір таксондардың маңыздылығын көрсетуде [66]. Дегенмен, географиялық қашықтықтың маңыздылығы даулы болып табылғанымен, актинобактериялар мен цианобактериялар популяциясын зерттеуге бағытталған кейбір мақалаларға сәйкес микробтық қауымдастықтарға әсер ететін маңызды фактор ретінде географиялық қашықтықтың рөлі туралы сипатталады [65], бірақ бұл басқа зерттеулерде маңызды емес екені дәлелденген [60]. Бактериялар популяциясы арасында байқалатын әр түрлілік айырмашылықтар термалды су көздерінің арасындағы қашықтыққа емес, ал сол термалды су көздерінің ішіндегі температураның және рН мәндерінің жиі ауытқуына байланысты болуы мүмкін екені көрсетілген [60].

1.1.4 Қазақстанның аумағында орналасқан геотермалды су көздері

Қазақстан аумағында геотермалды су көздерінің кең таралуының бірден бір себебі, ірі артезиан бассейндерінің және тектоногенездің әсерінен жер бедерінен қатпарлы аймақтарға айналып, нәтижесінде ыстық су көздердің

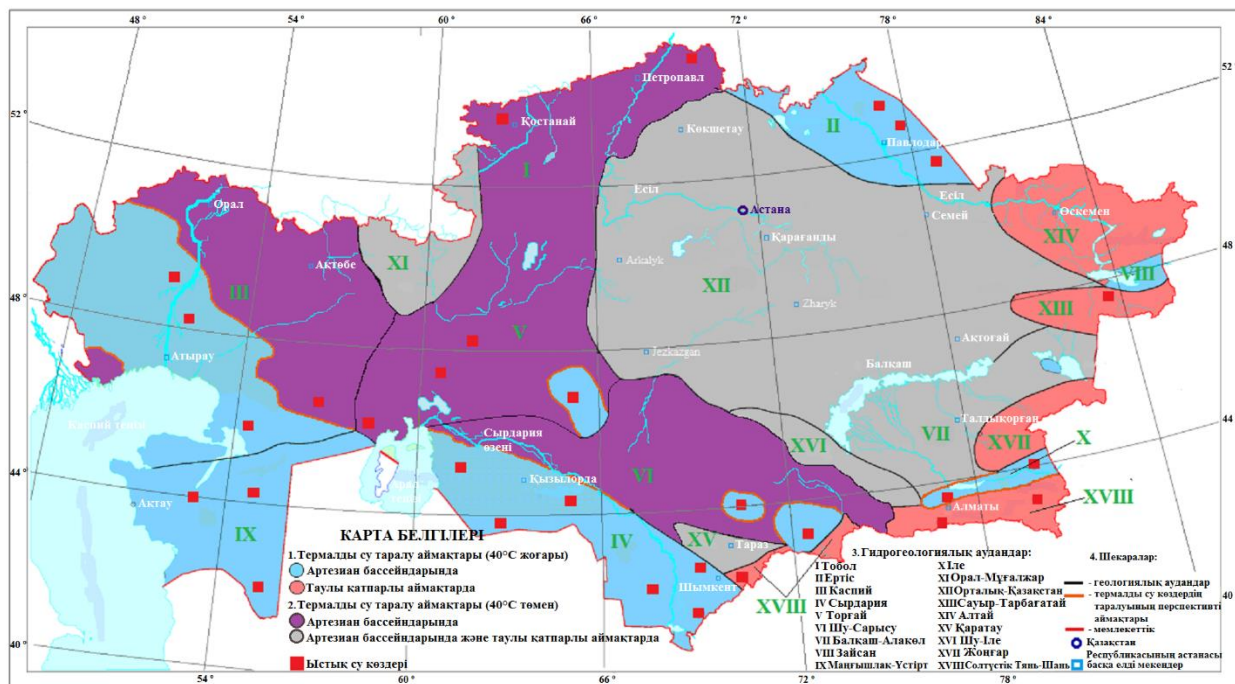
пайда болуына алып келді [32]. Көбіне олар таулы жерлерде, тектоникалық жарықтар аумағында және артезиан бассейндерінің борпылдақ-детриттік шөгінділерінің терең құрылымдарында кездеседі. Геотермалды су ресурстарын іздеу бойынша қырық жылдан астам жүргізілген зерттеулердің нәтижелері бойынша Қазақстан аумағында жүзге жуық іздеу ұңғымалары бұрғыланды [32] (сурет 2).

Іле, Сырдария, Шу-Сарысу, Маңғыстау-Үстірт және оңтүстік Каспий артезиан алаптарындағы термалды сулардың температурасы 40°C жоғары болуы жиі кездеседі.

Температурасы орташа (50–75°C) термалды сулары Іле, Сырдария және Маңғыстау-Үстірт артезиан бассейндерінде кең таралған.

Іле және Маңғышлақ-Үстірт артезиан бассейндерінде жоғары термиялық (75-100°C жоғары) жер асты суларын кездестіруге болады [32].

Бірақ Қазақстанда геотермалды су көздердің кең таралуына қарамастан заманауи метагеномикалық тәсілдердің көмегімен олардағы микроорганизмдер әралуандылығын және генетикалық ерекшеліктерін зерттеу бойынша жұмыстар мүлде жоқ деуге болады.



Ескерту – Автормен дереккөз негізінде жасалған [32]

Сурет 2 - Қазақстан аумағында орналасқан геотермалды су көздері

Ыстық су көздерінде тіршілік ететін микроорганизмдер қауымдастығының микробиологиялық әр түрлігін зерттеу, олар жайлы білімді және материалды жинақтауға жол ашады, бұл өз кезегінде қазіргі заманғы биотехнология үшін өзекті болып табылатын бактериялар мен олардың ферменттерін іздеуге бағытталған жаңа ғылыми жұмыстар үшін қолдануға мүмкіндік береді [68].

1.2 Термофильді микроорганизмдердің физиологиялық өзгешеліктері

1.2.1 Термофильді микроорганизмдердің жоғары температураға және рН-қа бейімделу механизмдері

Жоғары температураға төзімділіктің молекулярлық механизмдері бүгінгі күнге дейін әлі толыққанды анықталмаған және ол әр организмнің филогенетикалық жағдайына байланысты ерекшеленеді. Термофилдерде аздаған ген аралық ДНҚ (Кодталмайтын ДНҚ) азырақ болуы, олардың геномын жинақы етеді, сонымен қатар протеиндерде қысқа аминқышқылдарының (триптофан, изолейцин, валин, және т.б.) көп кездесуі, бірінші ретті құрылымның маңыздылығын көрсетеді [69]. Термотұрақты протеиндердің болуы, шаперондар мен жылу шок ақуыздарының жоғары санымен, және ДНҚ молекуласын тиімді репарациялау жүйесі, термосезімтал қосылыстардың тез ресинтізінің механизмдерінің кездесуі жоғары температураға бейімділігін арттырады. Ал жасуша мембраналарының бейімділігін, тұрақтылықты сақтайтын полиаминдердің болуымен және бактериялардағы қаныққан май қышқылдары бар липидтердің жоғары мөлшері, жоғары температурада немесе қышқылды ортада гидролизге төзімділік береді. Архейлерде табылған ДНҚ молекуласымен байланысатын гистон тәрізді ақуыздардың болуы жоғары температураға тұрақтылықты арттыруда рөл атқарады. Сонымен қатар мезофильді прокариоттарда жоқ гипертермофильді микроорганизмдерде кездесетін ерекше ақуыз, кері гираз табылған, осы фермент ДНҚ молекуласының қос тізбегінің жоғары температурада тарқатылуына жол бермейді және оны функционалды күйде сақтайды. Сонымен қатар гендердің көлденең тасымалдануы организмдердің жоғары температурдағы ортаға бейімделуінде мүмкіндік береді. Бұл мезофильді радиацияға төзімді *Deinococcus radiodurans* және термофильді, бірақ радиацияға сезімтал *Thermus thermophilus* сияқты жақын туысқан организмдер арасындағы елеулі фенотиптік айырмашылықтарды түсіндіреді [70].

Өсу температурасы және рН ортасы. Термофильді микроорганизмдер шартты түрде қоректік ортада өсу температурасына байланысты бірнеше қосымша топтарға бөледі. Егер оптималды ($T_{\text{опт}}$) өсу температурасы 50°C-64°C аралығында болса оларды қарапайым термофилдерге жатқызады, егер $T_{\text{опт}}$ өсу температурасы 65°C-79°C аралығында болса оларды экстремалды термофилдерге жатқызады, ал егер $T_{\text{опт}}$ өсу температурасы $\geq 80^\circ\text{C}$ жоғары болса оларды гипертермофильділер деп атайды [71]. Гипертермофилдердің басым көпшілігі архейлер болып келеді, бактериялар арасында тек екі тұқымдас ғана гипертермофильді болып келеді олар: *Thermotogaceae* және *Aquificaceae*. 100°C жоғары температурада оптималды өсетін архейлер, көбіне теңіздің терең мекенінде табылған, бұл жерлердегі жоғары қысым әсерінен су сұйық күйінде болады. *Pyrodictiaceae* тұқымдасының барлық өкілдері (тип *Crenarchaeota*) 100°C жоғары температурада өсе алады, ал ең жоғары өсу температурасы *Pyrodictium* және *Pyrolobus* тұқымдастарына

тиесілі, олар 110°C және сәйкесінше 113°C температурада өсіп көбейе алады [72]. Қарапайым термофилдер үшін өсіп көбейудің төменгі шегі бөлме температурасы 20-25°C, экстремалды термофилдер үшін 30-35°C, ал гипертермофилдер үшін 45-50°C тиесілі. Дегенмен гипертермофилдердің көбі 70°C төмен температурада мүлде өспейді, мысалы *Pyrolobus fumarii* бактериясының көбейіп дамуы үшін температура 90°C кем болмауы қажет [73]. Термофилдерде Максималды және минималды өсу температурасы арасындағы айырмашылық әдетте 20-40°C құрайды, бірақ ерекше жағдайлар да кездеседі. Осылайша, *Anaerolinea thermophila* (50-ден 60°C-қа дейін) және *Ignisphaera aggregans* (85-тен 98°C-қа дейін) аздаған температура интервалында өссе, керісінше *Kosmotoga olearia* 20-дан 80°C аралығында өседі [30, 74]. Термофилді прокариоттардың көбі нейтрофилдер, яғни олардың pH_{opt} мәні шамамен 7,0-ге тең. Қышқылды немесе сілтілі жағдайларда белсенді өсіп дамитын термофилдерді полиэкстремофилдер деп атайды. Қазіргі уақытта pH көрсеткіші 3,0-тең төмен өсетін термофилді бактериялар әлі күнге дейін белгісіз, ең ацидофильділер қатарына - *Thermoanaerobacterium aciditolerans* pH өсу диапазоны 3,2-7,1 (pH_{opt} 5,7) [75] және *Thermoanaerobacterium aotearoense*, pH өсу диапазоны 3,8-6,8 (pH_{opt} 5,2) аралығы жатады [76]. Салыстырмалы түрде архейлер әлдеқайда қышқылды ортада өсіп дамиды, мысалы *Thermoplasmataceae* және *Sulfolobaceae* тұқымдастарының өкілдері ең ацидофильді болып келеді және олардың барлығы факультативті аэробтар. Ең төменгі pH өсу көрсеткіші 0,35-3,0 (pH_{opt} 0,8-1,4) *Acidianus sulfidivorans* архейге тиесілі [77]. Керісінше, сілтілі ортада өсу қабілеті архейлерге қарағанда бактериялар бейімдірек болып келеді. *Methanobacteriaceae* тұқымдасына жататын *Methanothermobacter thermoflexus*, pH_{opt} 7,9-8,2-тен аздап сілтілі орталарда өседі [78, 79]. Өсу pH_{opt} 8,5-тен жоғары барлық архейлер *Thermococcaceae* тұқымдасына жатады, соның ішіне өсу pH 5,0-9,5 болатын *Thermococcus acidaminovorans* және pH 6,5-10,5 *Thermococcus alcaliphilus* кіреді. Сілтіде өсетін анаэробты бактериялардың көбі *Clostridia* (тип *Firmicutes*) класына жатады, соның ішінде ең сілтілі ортада өсетіндері *Clostridium paradoxum* және *Cl. Thermaalcaliphilum*, олар pH көрсеткіші 11-ге дейінгі ортада өседі [80, 81]. Полиэкстремофилді организмдерге бір қызықты өкілдеріне Вади Ан Натрун көлінен (Египет) бөлініп алынған *Natranaerobius thermophilus* бактериясы мысал бола алады, бұндай бактерия түрі қарапайым термофил (T_{opt} 53°C), алкалофил (pH_{opt} 9,5) және галофил (Na^+_{opt} 3,3-3,8 М) болып келеді [82].

1.2.2 Термофилді микроорганизмдерге оттегінің әсері және метаболитикалық әралуандылығы

Оттегінің әсері. Көптеген жоғары температуралық мекен ету орындарында көбіне өттегіз тіршілік ететін ағзалармен немесе оттегінің төмен концентрациясына бейімделген ағзалар мекендейді. Бұған себеп ретінде бірнеше факторлар бар және оларға келесілері жатады: жоғары

температурада оттегінің суда төмен ерігіштігі, атмосферадан қашықтықта орналасуы, аэробты ағзалардың жер бетінде немесе оған жақын кеңістікте оттегін тұтынуы және H_2S сияқты қалпына келтіретін заттардың болуы. Сол себепті, жоғары температуралық экотоптарда анаэробты немесе факультативті аэробты микроорганизмдер дамуына қолайлы жағдай болғандықтан олар басымдылықты көрсетеді. Оттегі болмаған немесе жеткіліксіз жағдайда олар субстратты тотықтырғыш фосфорлану кезінде соңғы электрон акцепторы ретінде әртүрлі қосылыстарды пайдалана алады, соның ішінде NO_2^- , CO_2 , NO_3^- , NO , SO_4^{2-} , N_2O , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S^0 , Mn(IV) , Fe(III) және Mo(VI) . Көптеген анаэробты термофилдер ашыту процестері арқылы немесе сыртқы электрон акцепторларының көмегімен/көмегісіз, немесе күкірт қосылыстары, металдар сияқты сыртқы акцепторларды пайдаланып, қосымша энергия көздерін ретімен қолданады.

Метаболикалық әралуандылық. Термофильді архейлер мен бактериялардың зат алмасу қасиеттері алуан түрлі. Термалды экожүйелерде олар күрделі қоректік жүйелерді құрайды және органикалық заттардың бастапқы өндірушілері және/немесе тұтынушылары ретінде бола алады. Қоректік ортада өңай өсетін барлық бөлініп алынған термофильді бактериялардың көпшілігін құрайтын хемоорганогетеротрофтар көміртегі мен энергия көзі ретінде түрлі органикалық қосылыстарды пайдаланады. Оларға қанттар, соның ішінде ксилан, хитин, целлюлоза сияқты күрделі полисахаридтер, сондай-ақ аминқышқылдары мен ақуыз қосылыстары, ұзын және қысқа тізбекті органикалық қышқылдар мен май қышқылдары да жатады [83]. Органотрофты термофилдер түрлі тыныс алу немесе ашыту процестері арқылы өсіп көбейе алады. Гликолитикалық ашытудың негізгі өнімдер қатарына этанол, лактат, ацетат, молекулалық сутегі және CO_2 кіреді.

Хемолитоавтотрофты метаболизм де архейлер мен бактерияларда жиі кездеседі. Ең маңызды электрон доноры ретінде молекулалық сутегі табылған. Аэробты жағдайда *Firmicutes*, *Aquificae* және *Proteobacteria* типтерінің бактериялары, сонымен қатар *Sulfolobales* отрядының архейлері оны суға дейін тотықтыруға қабілетті. Ал егер оттегі болмаған жағдайда күкірт, азот, күшән, марганец, темір сияқты бейорганикалық қосылыстардың тотыққан түрлері электрон акцептор қызметін атқарады. Анаэробты жағдайда сутегі тотығуының ерекше кездесетін түрлеріне ацетат немесе метан түзілетін реакциялар болып саналады. Бұнда көмірқышқыл газы электрон акцептор қызметін атқарады. Ацетогенезге *Moorella* туысының бактериялары қабілеті боласа, метаногенезді *Euryarchaeota* типінің архейлері жүзеге асырады. Кейбір хемолитоавтотрофтар факультативті болып келеді және өсу үшін органикалық заттарды пайдалана алады. Сонымен қатар CO_2 молекулаларын бекітуге қабілетсіз хемолитогетеротрофты термофильді анаэробтар белгілі, мысалы архейлердің ішінде кездесетін *Archaeoglobus profundus* және *Stetteria hydrogenophila* болса, ал бактерияларда *Desulfotomaculum*, *Thermincola*, *Oceanithermus*, *Vulcanithermus*, *Caldithrix*

туыстастар кіреді [84]. Фототрофты термофильдер қатарына *Proteobacteria*, *Chloroflexi* және *Firmicutes* типіне жататын бірнеше бактериялар кіреді [85].

1.3 Термофильді бактериялардың гидролитикалық ферменттері

Кератиндердің гидролизі. Кератиндер эпидермис жасушаларында синтезделетін ерімейтін фибриллярлық ақуыздардың көрнекті өкілдері болып табылады. Бұл ақуызда сүтқоректілердің, құстардың және бауырымен жорғалаушылардың (тырнақ, шаш, тұяқ, қауырсын, қабыршақ, т.б.) терісінің әртүрлі туындыларының негізгі құрамдас бөлігі. Ақуыздың екінші реттік құрылымдық конформациясына байланысты кератиндер α - және β -типтерге бөлінеді.

α -кератиндердің молекулалық салмағы 40-68 кДа тең. Көптеген дисульфидтік (-S-S-) және сутегі байланыстарымен қосымша тұрақтандырылған α -спираль түріндегі ақуыздың құрылымдық ұйымдасуы, α -кератиннің айтарлықтай тұрақтылығын қамтамасыз етеді [86].

β -кератиндердің α -кератиндерден физика-химиялық қасиеттерімен және құрылымдық ұйымдасуымен ерекшеленеді. β -конформациядағы полипептидтік тізбектер ирек құрылымдарға түзіліп, олар бір-бірінің үстіне қойылған кезде қатпарлы қабат түзеді. Бұл ақуыздың молекулалық массасы 10-20 кДа шамасында ғана болады. β -кератиндерде дисульфидті байланыстардың саны шамалы және тізбек ішілік сутектік байланыстар болмайды, бірақ тізбек аралық сутектік байланыстар түзеді [2, 86].

Кератиндер суда ерімейді, олар механикалық тұрақтылық пен физикалық, химиялық және биологиялық агенттерге, соның ішінде пепсин, папаин, трипсин сияқты протеолитикалық ферменттерінің гидролизіне төзімділіктері жоғары [87].

Соңғы жылдары кератиназаларға қызығушылық айтарлықтай артты. Көптеген зерттеулер кератиназалардың жаңа продуценттерін іздеуге және олардың экологиялық және биотехнологиялық аспектілердегі потенциалын зерттеуге арналған. Кератиназалар өте кең таралған ферменттер, олар *Eucarya*, *Bacteria* домендарында және аз дәрежеде *Archaea* домендерінің мүшелерінде анықталған. Кератинді пайдаланатын организмдер аэробты және анаэробты жағдайлармен сипатталатын әртүрлі тіршілік ету орталарынан оқшауланған.

Bacteria доменінің өкілдері арасында кератиназалардың ең танымал продуценттері *Bacillus* туысының бактериялары [88-92]. *B. licheniformis* ыстыққа төзімді кератиназаның продуценті, оның негізінде коммерциялық препарат Versazyme™ әзірленді [93]. *Bacillus*-тің бірнеше басқада термофильді және сілті шамдары кератинолиттік белсенділікті көрсететін ретінде сипатталған оларға *Bacillus halodurans* AH-101 [94], *Bacillus pseudofirmus* AL-89 [95] және *B. pseudofirmus* FA30-01 [96] бактериялары жатады.

Актиномицеттер арасынан кератиндерді ыдыратуға қабілетті топырақтан бөлініп алынған мезофильді және термофильді штамдар белгілі,

олар негізінен *Streptomyces* туыстасының түр өкілдері [97]. Термофильді кератинді ыдырататын актиномицеттерге *Streptomyces gulbargensis* [98], *Streptomyces thermoviolaceus* [99], және *Streptomyces thermonirificans* [100] штамдары жатады.

Кератиннің гидролизі жоғары температурада және сілтілі рН ортасында жеңілдейді, сондықтан өндірістік процесстерде экстремофильді штамдардың гидролазалары көбірек сұранысқа ие. Осыған байланысты термофильді және сілті гидролаза продуценттері ерекше қызығушылық тудыратын микроорганизмдер ретінде белгілі. Соңғы онжылдықтарда кератиназалық активтілігі бар құрамында әртүрлі кератинлі субстраттарды ыдыратуға қабілетті көптеген термофильді бактерия штамдары экстремалды тіршілік ету орталарынан оқшауланып сипатталған, мысалы: *Fervidobacterium islandicum* [17], *Fervidobacterium pennavorans* [18], *Clostridium sporogenes* [19], *Meiothermus ruber* H328 [20], және *Thermoanaerobacter* spp. [21] штамдары.

Архейлер ең экстремофильді микроорганизмдер ретінде протеазалардың ерекше құнды көзі болып табылады. Архейлердің кератинолитикалық белсенділік алғаш рет 80°C температурада α -кератинді гидролиздеуге қабілетті *Thermococcus* VC13 [101] штамымен көрсетілді.

Осылайша, кератиндердің гидролизіне ықпал ететін микроорганизмдер мен олардың ферменттерін зерттеу ғылыми зерттеулердің өзекті бағыты болып қана қоймай үлкен биотехнологиялық потенциалға ие. Кератинолитикалық термофильді бактериялар, әсіресе, архейлер ең аз зерттелген, бірақ термотұрақты кератиназалардың ең перспективті продуценттері болып табылады, бұл оларды болашақ зерттеулер үшін тартымды объект ретінде оң жағынан көрсетеді.

Липидтердің гидролизі. Липидтер - суда ерімейтін майлы қосылыстардың үлкен тобы, олар барлық тірі жасушалардың құрамдас бөлігі болып табылады және көптеген әртүрлі қызметтерді орындайды. Ең кең тараған классификациялардың біріне сәйкес липидтер қарапайым және күрделі болып екіге бөлінеді.

Құрамында бір карбоксил тобы және ұзын полярлы емес көмірсутек құйрығы бар май қышқылдары, липидтердің көпшілігіне тән құрылымдық компоненті болып келеді.

Липолитикалық ферменттер –липазалар (ЕС 3.1.1.3) және эстеразалар (ЕС 3.1.1.1) табиғатта жеткілікті кең таралған олар өсімдіктер, жануарлар, саңырауқұлақтар және микроорганизмдермен синтезделеді [102].

Коммерциялық препараттардың құрамына кіретін липазалардың көпшілігінің шығу тегі бактериялық және саңырауқұлақтық болып табылады [103]. Коммерциялық липазалардың негізгі продуценттері *Bacillus*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Burkholderia* және *Pseudomonas* тектес бактериялар болып табылады, осылардың ішінде *Pseudomonas* туысының өкілдерінің липазалары кеңінен қолданылады.

Әдебиеттерде өте сирек, бірақ дегенмен архейлердің липолитикалық ферменттерің зерттеуге арналған жұмыстар кездеседі. Қазіргі уақытта липолитикалық белсенділік тек *Euryarchaeota* және *Crenarchaeota* типтеріне жататын архей штамдары үшін ғана биохимиялық сипатталып көрсетілді. Ескеретін жағдай, сипатталған липолитикалық ферменттердің ішінде басым көпшілігін эстеразалар құрайды, ал липазалар болса тек *Euryarchaeota* филумының өкілдерінде ғана табылған. Биохимиялық сипатталаған архейлік липолитикалық ферменттердің ішінде *P. furiosus*-тың эстеразасы 100°C температурасын 34 сағат ал 120°C 2 сағат бойы белсенділік сақтап, ең жоғары термиялық тұрақтылыққа ие болады [104], фермент белсенділігінің температуралық оптимумы *P. furiosus*-тың оңтайлы өсу температурасына сәйкес келеді (100°C). Қазіргі уақытта метагеномдық анализ көмегімен экстремофильді архейлердегі болжамды липазалар мен эстераздар гендерін анықтауға мүмкіндік берді, осылайша липидтер алмасуына қатысу мүмкіндігі бар архейлер ауқымын кеңейтуге жол ашуда [33, 105].

Барлық сипатталған архейлік эстеразалар мен липазалар әртүрлі дәрежеде термиялық тұрақты және бейтарап немесе сілтілі рН мәндерінде (6,0-11) оңтайлы белсенділік көрсетеді.

Липазалар мен эстераздардың өнеркәсіпте кеңінен қолданылуына байланысты липолитикалық потенциалы бар микроорганизмдерге қызығушылық жылдан-жылға өсуде [86, 87].

Хитиннің гидролизі. Хитин - құрамында азот бар полисахаридтер тобына жататын қосылыс. Хитин молекуласы β -1,4-гликозидтік байланыстармен байланысқан N-ацетил-D-глюкозамин қалдықтарынан түзілген тармақталмаған тізбек құрылымына ие. Хитин табиғатта өте кең таралған және негізгі компоненті ретінде шаян тәрізділердің экзоскелетінде, жәндіктердің кутикуласында, саңырауқұлақ жасушасының қабырғасында, сонымен қатар кейбір бактериялар мен балдырларда кездеседі [106].

Планеталық масштабта хитин өндіру жылдамдығы шамамен жылына 10^{10} - 10^{11} тоннаға бағаланады [107]. Бірақ хитиннің табиғатта жиналуы байқалмайды, бұл оның табиғи жағдайда тиімді деградациясын көрсетеді [106].

Бактериялар мен саңырауқұлақтар [106], архейлер [108], коловраткалар [109], кейбір балдырлар [110], сонымен қатар кейбір жыртқыш өсімдіктерде хитиннің гидролизіне қатысатын ферменттер (хитиназалар) табылған [106].

Дегенмен, табиғатта хитин гидролизі процесінің негізгі медиаторлары болып *Bacterioidetes*, *Actinomyces* типінің бактериялары және аз дәрежеде *Proteobacteria* және *Firmicutes* өкілдері жатады [86]. Түрлі физикалық және химиялық орта факторлары (температура, рН және т.б.) белгілі бір аумақта хитин гидролизі процесінде организмдердің бір немесе басқа тобының басым болуында шешуші рөл атқарады.

Thermococcus chitinophagus - хитинді энергия мен көміртегі көзі ретінде пайдалануға қабілетті *Euryarchaeota* типінің жалғыз мүшесі. Хитиназаның оңтайлы белсенділігі 70°C және рН көрсеткіші 7,0 кезінде байқалды [111].

Ең жоғары термо тұрақтылықпен *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 және *Pyrococcus furiosus* (DSM3638) штамдарының хитиназалары ерекшеленеді. *T. kodakaraensis* және *P. furiosus* геномдарының сипаттау нәтижесінде табылған хитиназа гендері, *Escherichia coli* бактериясында экспрессияланған. Осы хитиназаларының белсенділігі *T.kodakaraensis* 85°C, рН дәрежесі 5,0 болса *P. furiosus* үшін 90-95°C, рН көрсеткіші 6,0 кезінде байқалады [112, 113].

Хитин мен хитозанды ферментативті өңдеу кезінде гидролиз процесі оңай бақыланады және оптималды жағдайда жүреді, әрі ферментативті гидролиз белгілі бір молекулалық салмақтағы неғұрлым таза, мақсатты өнімді алуға мүмкіндік береді [86].

Осылайша, хитин мен оның туындыларын тиімді гидролиздей алатын жаңа микроорганизмдерді іздеу және зерттеу, сондай-ақ хитинокластикалық ферменттердің қасиеттерін зерттеу ғылыми және қолданбалы маңызы бар сала болып есептеледі.

Целлюлозаның гидролизі. Целлюлоза табиғатта ең көп таралған биополимер, ол β -1,4-гликозидтік байланыстармен байланысқан D-глюкоза қалдықтарынан тұратын сызықты полисахарид болып табылады. Целлюлоза өсімдік жасушасының қабырғаларына кіретін лигноцеллюлозаның негізгі құрамдас бөлігі. Өсімдіктердің ағаштекті қаттырақ бөліктері әсіресе целлюлозаға бай [86].

Целлюлозаның тамаша қасиеттеріне сыртқы орта факторларына жоғары төзімділігін атап айтуға болады. Бұл қасиет биополимердің кристалдық құрылымының ерекшеліктеріне байланысты. Ұзын тізбекті целлюлоза молекулалары талшықтарда параллель орналасып бір-бірімен сутектік байланыстар арқылы байланысқан, бұл целлюлоза талшықтарына механикалық беріктік пен серпімділік береді [86].

Целлюлозада биогидролизінің бірнеше түрлі механизмдері сипатталған, оларда β -1,4-гликозидтік байланыстың үзілуін катализдейтін целлюлазалар негізгі рөл атқаратыны көрсетілген [114].

Табиғи жағдайларда целлюлоза гидролизіне көптеген бактериялар мен саңырауқұлақтар қатысады, олар целлюлолитикалық емес түрлермен синергиялық әрекеттесу арқылы целлюлозаның қарапайым заттарға тиімді минералдануына ықпал етеді [115].

Целлюлозаны ыдырату қабілеті *Eukarya*, *Bacteria* және *Archaea* домендерінің өкілдері арасында кең таралған. Целлюлолитикалық активтілік саңырауқұлақтар патшалығының *Chytridiomycetes* сияқты қарапайым өкілдерінде [116] және жоғары сатыдағы саңырауқұлақтарда да табылған [117].

Бактериялар арасында целлюлолитикалық микроорганизмдердің айтарлықтай концентрациясы *Actinomycetales* (түрі *Actinobacteria*) және *Clostridiales* (Firmicutes типі) отрядтарының өкілдерінде байқалады. Бұл жұмысты жазу кезінде көптеген термофильді целлюлолитикалық бактериялар сипатталған, олардың ішінде *Rhodothermus* [118], *Thermotoga*

[119], *Caldicellulosiruptor* [120], *Ornatilinea* [13], *Melioribacter* [121], *Thermosipho* [122] және т.б. бактерия туыстастары жатқызылған.

Архей доменінің мүшелерінде де целлюлолитикалық ферменттер табылған. *Pyrococcus horikoshii* геномында гипертермостабелді эндоглюконаза гендері табылған. Бұл фермент целлюлозаны рН 5,6 ортада және 90°C жоғары температурада гидролиздеді [123]. *Sulfolobus solfataricus* P2 геномында үш гипотетикалық термостабелді эндоглюконазалар табылды, олардың біреуі 80°C және рН 1,8 кезінде целлюлоза субстраттарына қатысты белсенділікті шамамен 8 сағат бойы көрсеткен [123, 124]. Целлюлозада 80-82°C өсу қабілеті *Desulfurococcus fermentans* архей өкілінде де байқалды [125]. Температурасы 40-60°C аралығында және рН 9-10 шамасында целлюлазалық белсенділігі экстремалды галофильді *Natrinema* sp. SSBJUP-1 археясында да анықталған. Сонымен қатар, әдебиеттерде 85-92°C целлюлоза субстраттарында алынған байыту дақылдарынан *Desulfurococcus* және *Fervidicoccus* тұқымдас архейлерін бөліп алғандығы жайлі деректер бар [121].

Субстрат ретінде целлюлозаның жер бетінде кең таралуы көптеген өнеркәсіптік маңызды өнімдерді, соның ішінде биоотынды өндіру үшін тартымды шикізатқа айналдырады.

1.3.1 Термотұрақты ферменттердің биотехнологиядағы маңызы

Жүздеген өнеркәсіптік процестер жоғары температурада іске асырылады, осындай жағдайды қажет ететін өндіріс үшін термофильді және гипертермофильді микроорганизмдерді қолдану көптген шектеулерді шешеді [126]. Биотехнологиялық мақсаттар үшін көбіне тірі организмдер (таза дақылдар немесе микробтық консорциумдар) немесе олардың метаболиттері мен макромолекулалары қолданылады. Бір тұтас жасушаларды пайдаланатын технологияларға ароматты қосылыстар мен көмірсутектердің ыдырауы, улы металдар мен радионуклидтердің иммобилизациясы және биосорбциясы, компост өндіру, үй жануарларының жем қоспаларын байыту, биоотын өндіру және кенді биосілтілеу процестерін жатқызуға болады.

Қазіргі уақытта кендерді биосілтілеу мақсатымен оптималды өсу температурасы 45°C аспайтын ацидофильді прокариоттар қолданылады, соңғы оңжылдық зерттеулерге қарасақ *Acidianus*, *Metallosphaera* және *Sulfolobus* тектес термоацидофильді археяларды пайдаланудың артықшылықтары басым екені көрсетеді [127]. Ыстық дренаждарды кадмий, мыс, мырыш, никель, марганец және хром сияқты ауыр металдардан тазарту үшін *Geobacillus*, *Bacillus*, *Thermus*, *Anoxybacillus*, тектес бактериялардың әртүрлі түрлерін қолдануға болады [128, 129]. Термофильді микроорганизмдер органикалық немесе бейорганикалық электрон донорларының көмегімен ауыр тотыққан металдардың мөлшерін төмендетеді, ал бұл өз кезегінде олардың уыттылығы азайтып дренажды судан тұнба түрінде шығуын қамтамасыз етеді.

Көмірсуларға бай өсімдіктердің шикізатын қолданып оларды микроорганизмдердің көмегімен ашыту арқылы сутегі және/немесе спирттер бөле отырып биоотын алуға болады [84]. Термофилдердің көмегімен биоотын өндіру аса перспективалы процес, бірақ оның тиімділігі өнеркәсіптік қажеттіліктерден әлде қайда төмен болып отыр. Дегенмен бүгінгі таңда пайдалы-қазба өнімдерін пайдаланудан гөрі баламалы қалпына келетін энергия көздеріне көшу биоэнергетиканың қарқынды дамуына әкелуде және бұл өз кезегінде биодизель, биоэтанол, биогаз өндірісінде жаңа бағытындағы зерттеулерге жол ашуда [130].

Зерттеушілердің термофилдерге деген ерекше қызығушылықтары олардың құрамында термозимдерге тұрақталған. Осы ферменттердің целлюлоза-қағаз өндірісінде, тоқыма, ауыл шаруашылығы, тағам және фармацевтика өнеркәсібі, сондай-ақ медицина және медициналық диагностика секілді түрлі салаларда қолданылуына мүмкіндік бар. Термотұрақты ферменттерді қолданудың алғашқы табысты коммерциялық мысалдарының бірі ДНҚ полимераза-лары мен ДНҚ лигаза-лары болып табылады. *Thermus aquaticus* термофильді бактериясынан *Taq* ДНҚ полимераза-сын бөліп алу, биотехнологиядағы революцияның орнауы деуге болды [57]. Кейінірек *Pyrococcus furiosus* және *Thermococcus litoralis* гипертермофильді архейлерден бөлініп алынған нуклеотидтерді құрастыру дәлдігі жоғарырақ *Pfu* және *Vent* ДНҚ полимераза-лары пайда болған [131, 132].

Термотұрақты ферменттер (T_{opt} 60°-80°С) мезофильділерге (T_{opt} 25°-50°С) қарағанда бірқатар биотехнологиялық артықшылықтары бар, оларға:

- ферментативті реакцияларды жоғары температурада жүргізу арқылы жылдамдығын арттыруға және субстраттардың ерігіштігін және тұтқырлығын төмендете отырып, концентрациясын арттырып, микробтық ластану қаупін азайтуға мүмкіндік береді;

- термотұрақтылық әдетте жоғары рН көрсеткіштеріне, шектен тыс жоғары қысымға, химиялық денатуранттарға және органикалық еріткіштерге жоғары төзімділікпен қатар жүреді;

- бұндай ферменттерді тазарту әлдеқайда жеңіл, себебі мезофильді жасушаларда экспрессиядан кейін мақсатты ақуыздан басқа қажетсіз ақуыздарды қарапайым қыздыру арқылы жойюға ыңғайлы [3].

Өнеркәсіпте ферментативті гидролизді қолданудың пайдасына маңызды дәлел - бұл ферменттердің қатаң спецификасы мен бағытталған әрекеті, сәйкесінше заттардың трансформация процесін бақылау және сонында мақсатты өнімді алу мүмкіндігі [5].

Өнеркәсіп үшін ең сұранысқа ие гидролиздік ферменттер қатарына-целлюлазалар, гемицеллюлозалар, пектиназалар, ксиланазалар, хитиназалар, пуллуланазалар, амилазалар, протеазалар, эстеразалар және липазалар кіреді [3]. Осылардың ішінде крахмал мен ақуыздарды ыдырататын ферменттер өнеркәсіптік ферменттердің әлемдік нарығының 90% алуда [3, 133]. 60°С температураға дейін белсенділігін жоймайтын алғашқы термотұрақты

бактериялық амилазалар *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* және *B. Amyloliquefaciens* микроорганизмдерінен бөлініп алынды [5]. Қазіргі уақытта бұлардың қатарына бірнеше коммерциялық қолжетімді өнімдер қосылды, соның ішінде Termamyl®/Liquozyme® және Fungamyl® (Novozymes, Дания), Valley Ultra-thin™ (Valley Research/Diversa, АҚШ), Multifect AA 21L® және OPTIMAX® (Genencor, АҚШ). Бұл ферменттер 82-86°C (Termamyl®/Liquozyme®) және тіпті 105°C («Ultra-thin™») бұлар температурада өз белсендігін жоғалтпайтын тауарлық өнімдер [134].

Липазаларға келетін болсақ, олар жуғыш заттарға қоспалар ретінде қолданылады. Тамақ өнеркәсібінде липазалар кейбір триглицеридтердің құрылымын өзгерту үшін қолданылады. Липазалар мен эстеразалар полиқаньқпаған май қышқылдарын алу үшін пайдаланылуы мүмкін, сонымен қатар оларда энантиоселективті гидролизге қабілеттілігі байқалған, бұл қасиет липазаларды фармацевтикада қолдануда перспективаларын ашады [86, 135].

Қазіргі уақытта белгілі термофильді бактериялардың барлығы өнеркәсіпте үлкен сұранысқа ие, мысалы целлюлолитикалық ферменттерді түрлі өндірістік процестерге, соның ішінде спирттерді өндіруге, шырындарды түссіздендіруге пайдалануға болады. Сонымен қатар, целлюлазалар жемнің сапасы мен сіңімділігін арттыру мақсатында өсімдік биомассасын және мал азықтық дақылдарды алдын ала өңдеуге жарамды, сонымен қатар өсімдік тектес ауыл шаруашылық және өнеркәсіп қалдықтарын қанттандырудың тиімді құралы болып табылады [86].

Ксиланаза ферменттері де қазіргі таңда үлкен биотехнологиялық сұранысқа ие [2]. Бүгінде бұл фермент өнеркәсіптік ауқымда шығарылады және олар диеталық жемдерге биоқоспа ретінде, сонымен қатар қамыр мен нан өнімдерінің өндірісінде қолданатын бидай ұнының сапасын жақсартуға қолдануға болады [136]. Ксиланолитикалық ферменттер сыра қайнату кезінде арабиноксиланды гидролиздеу үшін сыраны тазартуда пайдаланылады [137]. Соңғы онжылдықтарда ксиланазалардыға қызығушылық күрт артты, оған себеп оларды қағаз ағартуда қолдану. Ксиланазаларды целлюлоза-қағаз өнеркәсібінде пайдалану күрделі экологиялық проблема болып табылатын хлорлы лигнин туындыларының түзілуіне себепші химиялық технологиялардың экологиялық таза баламасы [138].

Хитин түрлі салаларда қолданылатын бірқатар заттардың қолданыс көзі ретінде бірқатар қызығушылық тудырады [139]. Ондай заттардың қатары хитозан және оның туындылары жатады, олар өздерінің функционалдық қасиеттеріне байланысты косметика өндірісінде (кремдер мен лосьондардағы қоспалар, микробқа қарсы агенттер) [140], тамақ өнеркәсібінде (биологиялық белсенді қоспа ретінде хитозан қосылған тамақ өнімдерін өндіру) [141], ауыл шаруашылығында (өсімдіктердің зиянкестері мен вирустық ауруларымен күресу) [142], биомедицинада (инфекцияларды, күйіктерді емдеу, хирургиялық және стоматологиялық материалдарды өндіру) [143], қоршаған ортаны қорғауда (сынап иондарының адсорбциясы) [144], құрамында лигнин

бар ағынды суларды тазартуда және биотехнология (микрокапсуляция, әртүрлі пленкаларды алу) салаларында кен қолданыс табуда [145].

Кератиназалар мен кератин гидролизі өнімдері де бүгінде әртүрлі өндіріс салаларда кеңінен қолданыс табуда. Кератин гидролизаты биологиялық белсенді қоспалар немесе сүтті алмастырғышы (мал шаруашылығында), азоты тыңайтқышы, биологиялық ыдырайтын пленкаларды алмастырғышы ретінде қолданылады [18, 146]. Сонымен қатар, кератиндердің гидролиз өнімдерін және тікелей кератиназаны медицинада, сондай-ақ косметология, былғары өнеркәсібінде, және жуғыш заттар өндірісінде қолданылады [92, 146, 147].

Салыстырмалы түрде бүгінгі таңда қолданылатын өнеркәсіптік ксиланазалар, кератиназалар, целлюлазалар, пектиназалар, протеазалар, хитиназалар және липазалар 50-60°C аспайтын температурада каталитикалық белсенділігін сақтайды [86].

Термотұрақты ферменттерді термофильді штамм продуцентінің жасушаларынан немесе дақыл сұйықтығынан [148] немесе ең тиімдісі мезофильді жасуша-қожайынынан рекомбинантты ақуызды экспрессиялау нәтижесінде алынған [149, 150]. Бүгінде, анаэробты термофильді ағзаларды өсіру секілді арзан емес әрі көп жағынан күрделі процестерден заманауи технологиялар көмегімен бас тартуға мүмкіндік береді. Бұған бірден бір себепші мәліметтер қорларында толық өлшемді гендердің санының жыл сайын артуы, бұл өз кезегінде қажетті ақуыз генінің тізбегін мәліметтер қорынан тауып оны химиялық жолмен синтездеп, содан кейін ол генді *E. coli* жасушаларында клондауға және экспрессиялауға жол ашады. Осылайша, мысалы, гипертермофильді археа *Pyrobaculum* sp.1860 штамынан екі термостабелді фермент, NADP-тәуелді альдегиддегидрогеназа және эстераза клондалды [151]. Метагеномикалық зерттеулер дақылдауды қажет етпейтін жаңа ферменттерді іздеуге елеулі үлес қосуда. Бұл тәсілдің үлкен артықшылығы - жасанды қоректік орталарда өспейтін микроорганизмдерден ақуыздарды бөліп алу мүмкіндігі жатады. Метагеномнан алынған гендер арнайы химиялық жолмен құрастырылған праймерлердің көмегімен амплификацияланады, бұдан әрі мақсатты ақуыз клондалып экспрессияланады. Осы жолмен бірқатар термотұрақты гликолитикалық ферменттер алынуда, олардың ішінде ксиланаза, целлюлаза, амилаза, пектиназа, сонымен қатар полимераза, фитаза, нитрилаза энзимдерін антап айтуға болады [152]. Тағы бір стратегияға нативті ДНҚ-ны экспрессиялық векторларға клондау және оларды хост жасушаларына тасымалдау немесе жасуша қожайындарына тасымалдау. Кейін арнайы селективті қоректік ортада өсіріп, бөліп алып, қажетті геннің нуклеотидтік тізбегін анықтағаннан кейін оны амплификациялап, клондап, содан кейін экспрессиялайды. Бұл тәсіл ДНҚ молекуласын секвенирлеу көмегімен болжауға болмайтын жаңа бірінші реттік құрылымдары бар биокатализаторларды алуға мүмкіндік береді.

Жоғарыда көрсетілген мысалдарға сүйене отырып, термофилдер мен олардың термотұрақты ферменттері немесе термозимдер аналитикалық құралдар ретінде де, өнеркәсіпте биокатализатор ретінде де үлкен қызығушылық пен сұраныс тудыруда. Қазіргі уақытта соңғы заманауи әдістерді қолдана отырып бірнеше ондаған термотұрақты ферменттер бөлініп зертханалық жағдайда сипатталған [152]. Бұл ферменттердің кең сұранымға ие болмауының себебі көбінің құнының тым жоғарлығы. Болашақта полиэкстремофильді ферменттердің технологиялық процестерге қажеттілігі артып биокатализаторлар нарығының өсуі болжануда, бұл өз кезегінде олардың жоғары көлемде өндірілуіне және нәтижесінде өзіндік құнының төмендетуіне әкеледі. Сонымен қатар, көмірсутектердің жоғары құнына байланысты, сондай-ақ қоршаған ортаға өнеркәсіппен келтірілген зиянды әсерді азайту мақсатында қалпына келетін көздерден алынатын биоотын өндірісін айтарлықтай арттыруға мүмкіндік береді. Көптеген дамыған ел басшылары әдеттегі отынмен араласқан биоэтанол/биодизельді пайдалануға талаптар қоюда, дәл осындай шаралар болашақта термостабильді микробтық биокатализаторларға сұраныстың жоғарлануына алып келеді. Сонымен қатар Қазақстан аумағындағы термалды су көздерінің микробиологиялық ерекшелігі ондағы кездесетін термофилді бактериялардың түрлік және метагенодық ерешелігіне зерттеу жүргізілмеген. Сондықтан, осы диссертациялық жұмыстың мақсатты заманауи метагеномика әдістерітерін қолдана отырып, Жаркент геотермалды су көздеріндегі термофилді микроорганизмдердің қауымдастығын зерттеу. Алынған метагеномикалық деректер осы термалды су көздерінің биотехнологиялық потенциалын анықтауға және биомассаны (лигноцеллюлоза) ыдыратуға қабілетті қызығушылық тудыратын жаңа перспективті термофилді микроорганизмтерді идентификациялау/бөліп алу үшін пайдаланылатын болады.

2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу материалдары

2.1.1 Үлгілерді жинау

Жұмыста 2018 жылы өткен экспедиция барысында Жаркент аумағында орналасқан термалды су көздерінен алынған үлгілер пайдаланылды. Бактериялардың әртүрлілігін зерттеу мақсатында және физика-химиялық анализлар үшін шөгінді аралас және су үлгілері стерильді 15 мл фалькон типті пробиркаларына және 5 л пластикалық ыдысқа алынды (Қосымша Г). Анаэробты бактерияларды дақылдау мақсатында 25 мл стерильді N₂ газымен үрілген шыны ыдыстарға шприц көмегімен термалды суға толтырылды. Шамамен 10 су шөгінді аралас үлгілер жиналды. Шөгінді аралас және термалды су сынамалары арнайы стерильді үлгі алғыш көмегімен жиналды. ДНҚ молекуласын бөліп алуға арналған үлгілер 50% этанолмен бекітіліп - 20°C сақталды.

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 Зерттеудің физикалық және химиялық әдістері

Алынған су сынамаларды физика-химиялық анализ үшін, оларды 0,2 мкм мембрандық сүзгілер арқылы сүзіліп, анализға дейін 7°C температурасында сақталды. Анализ Берген университетінің ICP-зертханасында жасалды ([www. uib.no/en/geo/111639/icp-laboratory](http://www.uib.no/en/geo/111639/icp-laboratory)). Аниондар (SO₄²⁻, Cl⁻, Br⁻ және NO₃⁻) иондық хроматография (Metrohm, АҚШ) әдісі арқылы анықталды. Негізгі және екінші реттік элементтер (As, Al, B, Ba, Ca, Cr, Co, Cu, Eu, Fe, Pb, Li, La, Mn, Mg, Na, Ni, S, Sr, Si, Ti, K, V , Y және Zn) iCAP™ 7600 ICP-OES (Thermo Scientific, АҚШ) анализаторы арқылы анықталды.

2.2.2 Бастапқы жинақтаушы дақылдарды алу

Бұл жұмысты орындау барысында жаңа қасиеттері бар термофильді және гипертермофильді анаэробты/аэробты органотрофты микроорганизмдерді бөліп алу мақсатында және метабеномдық анализ үшін температуралары жоғары (60-90°C) термалды су көздердің үлгілері таңдалды. Қосымша күрделі полимерлі субстраттарды ыдыратуға қабілетті термофильдерді/гипертермофильдерді бактерияларды анықтау мақсатында салыстырмалы метабеномдық анализ жүргізілді. Ол үшін термалды су көзінен алынған N₂ үлгісін қосымша аэробты және анаэробты жағдайда инкубациялап ДНҚ молекуласы бөлініп алынды.

Анаэробты жинақтаушы дақылын алу үшін N₂ үлгісін өлшемі 0,2 мкм MF-Millipore мембраналық сүзгісімен сүзілді. Ары қарай осы мембраналық сүзгіні және 20-25 мг мөлшерде полимерлі субстраттарды (СМС, крахмал және ксилан) 200 мл шыны колбаларға N₂ газының тұрақты қысым астында салынып, беті резенке тығындысымен және алюминий қысқыштардың көмегімен тығыз жабылады. Соңында үстіне анаэробты дайындалған 100 мл

MMF дайын қоректік орта стерильді шприц көмегімен енгізіліп, 75°C температурада инкубаторда бір апта инкубацияланды.

Полимерлі субстраттарды ыдыратуға қабілетті аэробты микроорганизмдердің бастапқы жинақтаушы дақылдарын алу үшін жоғарыда көрсетілген әдіс көмегімен сүзілген үлгіні және 20-25 мг полимерлі субстраттарды дайын R2A сұйық аэробты қоректік ортасына салынып, 75°C температурада бір апта шайқағыш инкубаторда (25 айн/мин) инкубацияланды.

2.2.3 Үлгілерден таза дақылдарды бөліп алу

Анаэробты және аэробты бактериялардың таза дақылдарын алу мақсатында шектік сұйылту және штрих әдістері қолданылды. Дақылдың тазалығын соңғы сұйылтуды агарозалық ортаға егіп, колония морфологиясын тексеру арқылы іске асырылды. Нәтижелерге толық сенімді болу үшін қосымша бактериялық 16S рРНҚ гені бойынша секвенирлеу әдісі қолданылды.

2.2.4 Жұмыста қолданылған коллекциялық штамдар

Бұл жұмыста Тайланд мемлекетінің халықаралық микроорганизмдер коллекциясынан алынған *Polycladomyces subterraneus* KSR 13^T (коллекциялық нөмірі BCC 50740) типтік штамы қолданылды.

2.3 Бактериялардың биохимиясы және морфологиясы

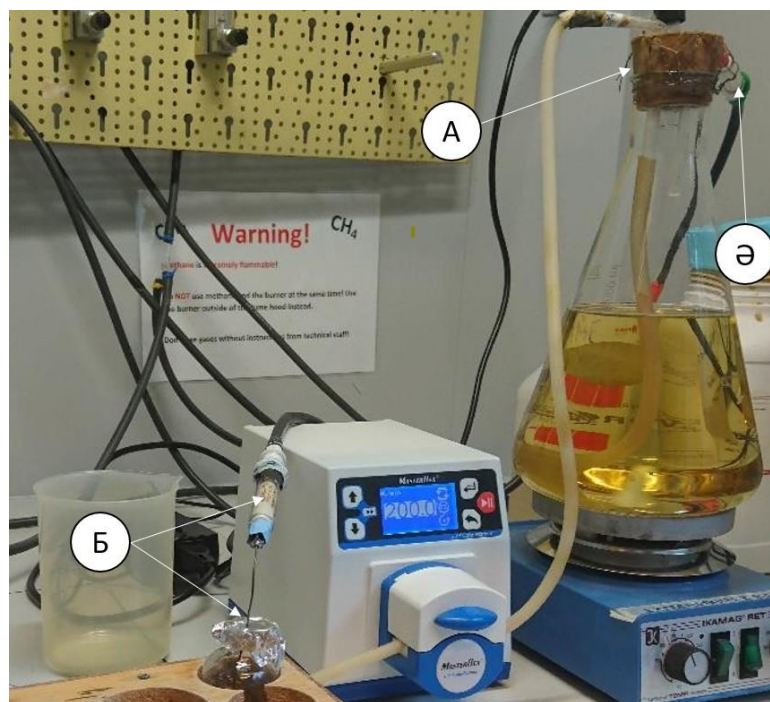
2.3.1 Қоректік орталарды дайындау

In vitro жағдайында аэробты және анаэробты бактериялардың ферментативті белсенділігін тексеруге, жинақтық және таза дақылдарды алу үшін төменде көрсетілген оңтайландырылған қоректік орталар пайдаланылды [64].

Анаэробты бактерияларға арналған оңтайландырылған MMF қоректік ортасы

NaCl	3 г/л;
NH ₄ Cl	0,25 г/л;
K ₂ HPO ₄	1 г/л;
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,7 г/л;
KCl	0,34 г/л;
Ашытқы экстракты	1 г/л.

Анаэробты қоректік орталар CO₂ газы астында модификацияланған Hungate [153] әдісі (сурет 3) көмегімен анаэробты жағдайда дайындалды.



А) Резеңке тығынмен залалсыздандырылған анаэробты MMF қоректік ортасы; Ә) N₂ газының көзі; Б) Насос

Сурет 3 - Hungate [153] әдісі бойынша анаэробты MMF қоректік ортасын дайындау көрінісі

Резазурин (0,2%) қосылған қоректік орта 30 минут бойы 121°C температурада автоклавта залалсыздандырып, қоректік ортаны стерилді N₂ газының тұрақты ағыны астында 45-50°C дейін суытып, 0,05% O₂ тотықсыздандырғыш агенті L-цистеин-HCl ерітіндісі қосылады. 6 М HCl жән 3 М NaOH ертінділері көмегімен қоректік орталардың pH көрсеткіші 6,8-7,0 мәніне теңестірілді (40-50°C). Дайын болған анаэробты қоректік ортасы N₂ газының тұрақты ағыны астында алдын ала азот газымен үрілген стерильді 50-100 мл колбаларға 10-20 мл шамасында құйып, резеңке тығындыларымен жауып алюмини қысқыштары көмегімен нығыздалып жабылды.

Аэробты бактерияларға арналған R2A агар қоректік ортасы

Ашытқы экстракты	0,5 г/л;
Протеоздық пептон (Difco № 3)	0,5 г/л;
Глюкоза	0,5 г/л;
Еритін крахмал	0,5 г/л;
Na-пируват	0,3 г/л;
K ₂ HPO ₄	0,3 г/л;
MgSO ₄ •7 H ₂ O	0,05 г/л;
C ₃ H ₃ NaO ₃	0,3 г/л;
Агар	15 г/л.

Аэробты бактерияларға арналған Spirit Blue агар қоректік ортасы

Ашытқы экстракты	0.5 г/л;
------------------	----------

Протеоздық пептон (Difco № 3)	0.5 г/л;
Казамин қышқылдары	0.5 г/л;
Глюкоза	0,5 г/л;
Еритін крахмал	0,5 г/л;
Na-пируват	0,3 г/л;
K ₂ HPO ₄	0,3 г/л;
MgSO ₄ •7 H ₂ O	0,05 г/л;
Агар	15 г/л.

Аэробты бактерияларға арналған Skim milk агар қоректік ортасы

Майсыздандырылған құрғақ сүт	28 г/л;
Триптон	5 г/л;
Ашытқы экстракты	2,5 г/л;
Декстроза (глюкоза)	1 г/л;
Агар	15 г/л;
Дистилденген су	1000 мл.

Аэробты бактерияларға арналған СМС агар қоректік ортасы

NH ₄ H ₂ PO ₄	1 г/л;
KCl	0.2 г/л;
MgSO ₄ •7 H ₂ O	1 г/л;
Ашытқы экстракты	1 г/л;
СМС	26 г/л;
Агар	3 г/л.

Аэробты бактерияларға арналған Dextrose Starch агар қоректік ортасы

Протеоздық пептон	15 г/л;
Декстроза (глюкоза)	2 г/л;
Крахмал (еритін ұнтақ)	10 г/л;
NaCl	5 г/л;
Na ₂ HPO ₄	3 г/л;
Желатин	20 г/л;
Агар	10 г/л.

Аэробты қоректік ортасы 30 минут 121°C автоклавта залалсыздандырылып, 45-50°C дейін суытылып, Петри табақшаларына 30-40 мл мөлшерінде құйылды. Агарланған қоректік орталар жоғары температурада термостатта кеуіп кетпес үшін, сыртынан зип полиэтилен пакеттері көмегімен нықталып жабылды [64].

2.3.2 Анаэробты субстратты дайындау

Еритін субстраттардың (мысалы, глюкоза, ашытқы экстаркты, пептон) сұйық анаэробты концентрлі ерітінділерін жоғарыда жазылған Hungate [153] техникасы арқылы дайындалды. 10% концентрлі глюкоза ерітіндісін алу

үшін, 8 г глюкозаны өлшеп N₂ газымен үрленген колбаға салынып беті резенке тығындысы көмегімен жабылады, сол уақытта дистилденген 100 мл суды 10 минут бойы стерилді азот ағыны астында қайнатып алынған суды стерильді шприц көмегімен глюкозаға қосылады. Шыққан концентрлі 10% глюкоза ерітіндісін 20 минут 121°C температурада автоклавта залалсыздандырылды.

Ерімейтін субстраттарда (Құс қауырсыны) жоғарыда көрсетілген әдіспен жасалады. Құс қауырсыны салынған дайын қолбаларға 50 мл MMF қоректік ортасы стерильді шприц көмегімен еңгізілді.

2.3.3 Бактериялардың өсуіне температура, рН және NaCl концентрациясының әсері

Микроорганизмдердің өсу температурасының диапазоны сұйық қоректік ортада 40-90°C аралығында 5°C қосу арқылы инкубациялау нәтижесінде анықталды. Өсудің рН диапазоны микроорганизмнің оптималды өсу температурасында анықталды. Қоректік ортаның рН деңгейін (3,0-тен 10,0 аралығында) 2М HCl немесе 5% NaOH (салмақ/көлем) стерильді анаэробты түрде дайындалған ерітінділерін қосып өзгерту арқылы жасалды. рН деңгейі бөлме температурасында рН өлшегіші (VWR, АҚШ) арқылы өлшенді. Осматикалық стресс диапазонын анықтау NaCl тұзының түрлі концентриялары (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% жән 7%) қолданылды.

2.3.4 Жарық және электронды микроскопия

Жасуша морфологиясы, спора түзу қасиеті, жасуша шығымы, қозғалғыштығы және физиологиялық жағдайы секілді сипаттамалар фаза контрасты құрылғысы бар Nikon, Eclipse E400 (1000X) (Жапония) фазалық контрастты микроскопы көмегімен бағаланды. Дайын препараттарды RA-7U 4.2 объектив жүйесі бар Nikon D7000 SLR камерасы арқылы суретке түсіріліп сақталды.

Jeol JSM-7400F сканерлеуші электронды микроскоп көмегімен жасушалардың құрылымы 2000X және 8500X үлкейту өлшем аралығында зерттелді. Ол үшін алдымен 1 мл бактерия дақылдарын 25%-дық 80 мкл глутаральдегидке (глутаральдегидтің соңғы концентрациясы 2%) бекітіліп, 25°C температурада 1 сағат инкубацияланды. Ары қарай үлгі 7 минут бойы 12500 айн/мин жылдамдықта центрифугаланып, супернатант алынып тасталды, қалған шөгінді 500 мкл 0,1 М какодилат буферінде қайта ресуспензияланды. Дайындалған үлгілер Норвегиядағы Берген университетінің Молекулалық бейнелеу орталығының платформасына (Molecular Imaging Center Platform) жіберілді (www.uib.no/en/rg/mic).

2.3.5 Аналитикалық әдістер

Протеазалық белсенділікті анықтау. Изоляттардың протеазалық қасиеттерін тексеру үшін олар Skim milk агар қоректік ортасында өсірілді. Протеазалық белсенділік өскен колониялар айналасында

майсыздандырылған құрғақ сүттің гидролиз аймақтарының көлемі бойынша бағаланды [154].

Целлюлазалық белсенділікті анықтау. Ол үшін СМС агар қоректік ортасы қолданылды. СМС ыдырағанын көру үшін өскен колониялардың беті Люголь ерітіндісімен (0,5% I₂ және 1,0% KI дистилденген суда) 1 минут бойы өңделіп, дистилденген сумен шайылды, колония айналасындағы мөлдір гидролиз аймағы целлюлазалық белсенділіктің белгісі болып есептелді [155].

Амилазалық белсенділікті анықтау. Амилазаның белсенділігін анықтау үшін Dextrose Starch агар қоректік ортасы қолданды. Крахмалдың ыдырағанын көру мақсатында өскен колониялардың беті Люголь ерітіндісімен (0,5% I₂ және 1,0% KI дистилденген суда) 1 минут бойы өңделіп, дистилденген сумен шайылды, колония айналасындағы мөлдір гидролиз аймағы амилазалық белсенділіктің белгісі болып есептеледі [9].

Липазалық белсенділікті анықтау. Изоляттардың липолитикалық белсенділігін анықтау үшін құрамына 1% Tween-80 қосылған Spirit Blue агар қоректік ортасы қолданылды. Липазалық белсенділіктің белгісі колониялар айналасындағы май қышқылдарының кальций тұздарының тұнбаға түсуі болып есептеледі [156].

Кератиназа белсенділігін анықтау. Анаэробты изоляттардың кератиназалық белсенділігін анықтау үшін MMF қоректік ортасы құйылған құс қауырсыны салынған дайын 50 мл ыдыстарға 1 мл инокулят стерильді шприц көмегімен енгізілді. Құс кеудесінен және қанаттарынан алынған түрлі қаттылық деңгейі бар қауырсындар тексерілді. Бөтелкелер изоляттың оптималды өсу температурасында инкубацияланды. Инокуляттың өсу деңгейін және қауырсындардың ыдырау деңгейін тексеру үшін дақылдар әр 24 сағат сайын тексеріліп отырды.

Фермент қарқындылығын анықтау. Изоляттармен фермент түзілу мөлшері агар диффузиялық әдіспен анықталды. Изоляттар жоғарыда сипатталған скринингтік әдістерде сипатталғандай сәйкес ферментативті белсенділікті анықтауға арналған арнайы субстраттары (СМС, крахмал, Tween-80, Skim milk) бар орталарда өсірілді және гидролиз аймақтары мен колониялардың диаметрі өлшенді. Содан кейін түзілген ферменттің мөлшері есептелді және фермент қарқындылығы (ФҚ) ретінде көрсетілді, мұнда $ФҚ = (колония\ диаметрі + гидролиз\ аймағының\ диаметрі) / колония\ диаметрі$ [157]. Анаэробты бактериялар үшін ферментативті белсенділік сұйық қоректік ортаға жалғыз энергия көзі ретінде арнайы субстраттары қосу арқылы сыналды және ассимиляциялау қарқындылығына байланысты визуалды бағаланды; жоқ О; төмен L; орташа M; жақсы H; [17, 86, 158].

API ZYM. Анаэробты және аэробты бактериялардың ферментативті белсенділігі API ZYM жолақтары арқылы анықталды. Тәуліктік R2A агар қоректік ортасында өскен бактерия колонияларын 3 мл стерильді NaCl ерітіндісімен араластырып, API ZYM жолақтарына 65 мкл шамасында құйылып, инкубаторға 40°C 4-8 сағатқа қойылды. Инкубациядан кейін 1 тамшы ZYM A, және ZYM B реагенттері қосылып, 5 мин бөлме

температурасына қалдырылды. Түс өзгерісінің қарқындылығын өндірушінің нұсқауларына сәйкес 0-5 аралығында өлшенді.

API 50CHB. Аэробты изоляттар API 50CHB жолақтарында 49 қосылыстың сіңірілуі және ферментациялануы анықталды. Тәулікті R2A агар қоректік ортасында өскен бактерия колонияларын 10 мл 50CHB/E қоректік ортасымен араластырылып, API 50CHB индикатор жолақтары беті толғанша құйылып, инкубаторға 55°C 12-24 сағатқа қойылды. 50CHB/E қоректік ортасының қанық сары түске ауысуы өндірушінің нұсқауларына сәйкес өлшенді.

2.3.6 Жасушалық май қышқыл құрамын анықтау

Жасушалық май қышқылдарын анализін жасау мақсатында іріктеп алынған штамдардың тәуліктік дақылдары Лейбниц институтының DSMZ (Брауншвейг, Германия) зертханасына жіберілді. Нәтижелер микробтық сәйкестендіру жүйесіндегі май қышқылдарының дерекқорымен салыстырылды (Sherlock 6.0 нұсқасы).

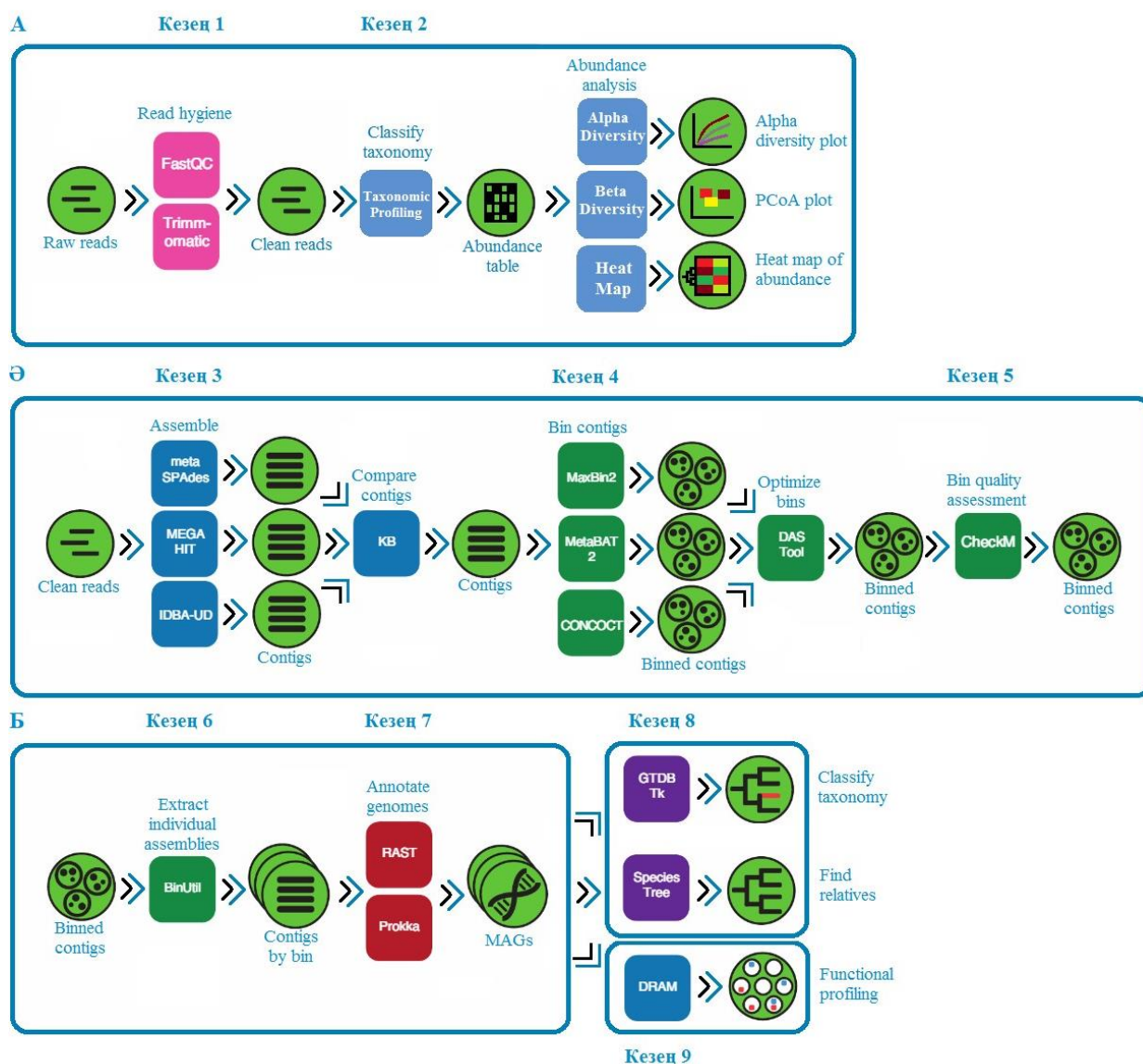
2.4 Молекулалық-генетика және биоинформатикалық әдістер

2.4.1 Метагеномдық анализ

Метагеномдық секвенирлеуге ДНҚ молекуласын бөліп алу үшін жиналған сынамаларды вакуум қысымы көмегімен өлшемі 0,2 мкм MF-Millipore мембраналық сүзгісінен өткізіліп, стерильді 50 мл фалькон типті пробиркаларына тасымалданды. Метагеномдық және жинақтаушы дақылдарының ДНҚ молекуласы GenElute бактериялық геномның нуклеин қышқылы бөліп алуға арналған жинағы арқылы өндірушінің нұсқауларына сәйкес жүзеге асырылды. ДНҚ молекуласының сапасы 0,8% агарозды гель электрофорез көмегімен (45 минут 5В/см) және концентрациясы NanoDrop-ONE (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) спектрофотометрі арқылы анықталды.

2.4.2 Секвенирлеу және деректер анализі

Метагеномды секвенирлеу Illumina HiSeq 4000 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, АҚШ) секвенаторында Eurofins Genomics (Констанс, Германия) компаниясы көмегімен орындалды. Секвенирлеу нәтижесінде алынған оқылымдардың Биоинформатикалық анализі 9 кезеңнен тұрды (сурет 4).



Ескерту - Сурет бағдарлама тілінде және дереккөз негізінде жасалған [53]
Шеңбер белгісімен, деректер нысандарын ал төртбұрышпен анализ кезеңдері көрсетілген

Сурет 4 - CLC және KBase бағдарламаларында метагеномдық анализ кезеңдері

Кезең 1: деректерді жүктеп салу және оқылымдар сапасын бағалау. Секвенирлеуден кейін алынған бастапқы оқылымдар CLC Genomic Workbench v. 20.0.01 бағдарлама жинағында талданды. Бастапқы метагеном деректерінен ең аз сапа баллы 15 және оқылым ұзындығы 30 ж.н болатын екі мағналы нуклеотидтерді жібермеу параметрлері көмегімен «Trim Reads» бағдарламасында «TruSeq3-PE» адаптерлері және төмен сапалы оқылымдар кесіліп алынды. Оқылымдардың сапасы Kbase сервиріндегі FASQC v. 0.11.9 [159] бағдарламасы көмегімен тексерілді.

Кезең 2: микробиоманың таксономиялық құрылымын бағалау. Термалды су көздерінің микробтық әралуандылығын зерттеу үшін CLC-дің «Taxonomic Profiling» бағдарламасы қолданылды. Оқылымдарды өңдеу процесі 3 негізгі қадамды қамтыды. 1 «Microbial Reference Database» бағдарламасы көмегімен

GenBank сайтынан референс дерек қорларын жүктеу (Бактерия және Архейлер). 2 «Set Up Microbial Reference Database» бағдарламасымен жүктелген дерек қорларын орнату. 3 Соңғы кезеңде секвенирлеу нәтижесінде алынған оқылымдарды жүктелген референс дерекқорларымен сәйкестендіру (бағдарламамен $< 0,995$ көрсеткішінен кіші таксондар еленбеді). «Taxonomic Profiling» құралы жұмысы нәтижесінде пайда болған әралуандылық кестесі (Abundance table) α , β әралуандылық және жылу карталарын (Heat Map) құрастыру үшін қолданылды.

Зерттелетін орталарада α -әралуандылық көрсеткіштерін Шеннон индексі арқылы есептелді [84]. Ол үшін «Alpha Diversity» бағдарламасы қолданылды. Шеннон индексі түр деңгейі үшін төмендегі формула көмегімен есептелді:

$$H' = - \sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i$$

мұндағы: $p_i = \frac{x_i}{\sum_{i=1}^n x_i}$; белгілі бір объектінің (мысалы, түрдің) белгілерінің (мысалы, даралар) санына сәйкес келеді. N-тізбектердің жалпы саны [84].

Үлгілер арасындағы әралуандылықты салыстырып есептеу мақсатында «Beta Diversity» бағдарламасы пайдаланды. Анализ 2 кезеңде жүргізілді. 1 кезеңде, бағдарлама көмегімен үлгілердің әрбір жұп арасындағы қашықтық бағаланды. Қашықтық матрицасы бағалағаннан кейін «Beta Diversity» бағдарламасы қашықтық матрицаларында негізгі координаталық анализ (Principal Coordinate Analysis plot) сызбасы салынды. β -әралуандылығын бағалау үшін төменде көрсетілген Bray-Curtis өлшемі қолданылды:

$$B = \frac{\sum_{i=1}^n |x_i^A - x_i^B|}{\sum_{i=1}^n (x_i^A + x_i^B)}$$

мұндағы: n - OTU (Operational taxonomic units) саны, x_i^A және x_i^B сәйкесінше A және B үлгілеріндегі OTU i таралуы [84].

Әрбір үлгідегі әр түрдің әралуандылығын және кластерленуін көрсететін жылу картасын құрастыру үшін «Create Heat Map for Abundance Table» бағдарламасы пайдаланылды.

Кезең 3: метагеномды жинақтау. Биоинформатикалы анализдың үшінші кезеңінде адаптерлер алынған оқылымдарды MEGANIT v. 1.2.9 [160], IDBA-UD v. 1.1.3 [161], metaSPAdes v. 3.15.3 [162] бағдарламалары көмегімен оқылымдар контигтерге жинақталды. Бұл бағдарламалармен жинақтау барысында 1500 жұп нуклеотид негізден қысқа контигтер автоматты түрде еленбеді. Метагеномды жинақтау сапасын тексеру және салыстыру мақсатында QUAST v. 1.1.2 [163] бағдарламасы қолданылды. QUAST бағдарламасы N50 (ең ұзыннан ең қысқасына қарай сұрыпталған кезде контиг ұзындығы, мұнда жалпы тізбектің 50%-ы N50 контиг өлшемінен үлкен немесе оған тең контигтермен қамтылған) және L50 (сұрыпталған контигтер тізіміндегі контигтің N50 нүктесіндегі орны) секілді жинақтау көрсеткіштерін бағалайды.

Кезең 4: биннинг. Жинақтау нәтижесінде алынған контигтерді жеке биндарға біріктіру үшін MaxBin2 v. 2.2.4 [164], CONCOCT v. 1.1 [165] және

MetaBAT2 v. 1.7 [166] биннинг бағдарламалары қолданылды. Бұл бағдарламалар метагеномдық контигтердің (жинақталған іргелес геном фрагменттері) әрқайсысын болжамды популяция геномына сәйкес келетін әртүрлі биндерге біріктіреді. Ол «Expectation-Maximization» алгоритмі көмегімен биннинг жасау үшін нуклеотидтер құрамы туралы ақпаратты және филогенетикалық маркер гендерін пайдаланады. Ыңғайлылық үшін бағдарламалар геномға қатысты статистиканы, соның ішінде болжамды толықтықты, ГЦ мазмұны және геном өлшемі жайлы ақпараттарды өндеп шығарады. MaxBin2, CONCOCT, және MetaBAT2 биннинг бағдарламалары нәтижесінде пайда болған биндарды біріктіріп оптимизациялау мақсатында DAS v. 1.1.2 [167] бағдарламасы қолданылды. DAS бағдарламасы бір жинақтаудан жасалған, бірақ әртүрлі биннинг құралдарын пайдаланану нәтижесінде алынған метагеномдық биндерді алып, олардың мазмұнын біріктіру және бағалау стратегиясын қолдану арқылы оңтайландырады.

Кезең 5: бин және геном сапасын бағалау. Биннинг нәтижесінде пайда болған биндердің сапасын бағалау мақсатында CheckM v. 1.0.18 [168] бағдарламасы қолданылды. CheckM изоляттардан, жалғыз жасушалардан немесе метагеномдардан қалпына келтірілген геномдардың сапасын бағалауға арналған құралдар жиынтығын ұсынады. Ол геномның толықтығы мен ластануын сенімді бағалауды, әмбебап және филогенетикалық линияда жалғыз көшірмелі болып табылатын гендер жиынтығын теңестіру арқылы қамтамасыз етеді.

Кезең 6: жинақтауды жүктеу. Биндарды жинақтау түрінде биндалған контигдерден экстракциялау үшін Extract Bins as Assemblies from Binned Contigs v. 1.0.2 [159] бағдарламасы қолданылды. Бұл жинақтау нысандары ары қарай МЖГ сипаттау мақсатында жасалды.

Кезең 7: геномды сипаттау. Биндарды жеке жинақтау нысандарына жүктеп алғанан кейін арнайы гендер және басқа қызығушылық тудыратын геномдық ерекшеліктерін анықтау және геномдық нысандарды жасау үшін олар функционалды түрде сипатталды, ол үшін RAST v. 1.073 [169] және Prokka v. 1.14.5 [170] бағдарламалары қолданылды.

Кезең 8: Таксономиялық және филогенетикалық тиістілік. МЖГ-дың таксономиялық тиістілігін анықтау мақсатында GTDB-Tk v. 1.7.0 [171] таксономиялық жіктеу құралы пайдаланылды. GTDB-Tk бағдарламасы RefSeq [172] және Genbank [173] дерекқорларының негізінде жасалған. МЖГ-дан филогенетикалық ағаш құрастыру мақсатында Kbase сервиріндегі Species Tree v. 2.2.0 [159] бағдарламасы қолданылды. Ол пайдаланушыға COG [174] гендік топтарын анықтайтын 49 негізгі әмбебап гендердің жиынтығын пайдаланып филогенетикалық ағашын құруға мүмкіндік берді.

Кезең 9: функционалдық профильдеу және жіктеу. Функционалдық профильдеу үшін DRAM v. 0.1.2 [175] және dbCAN2 v. 10 [176] бағдарламалары қолданылды. DRAM микробтық геномдардан енгізілген болжамды кодтау ретін (input predicted coding sequences) сипаттайды және геномдық метаболизм туралы жиынтық деректерді береді. HMMER3

бағдарламасы Multiple Sequence Alignments топтары үшін жасалған HMMER үлгілерін пайдаланып, ақуыз тізбектерін анықтайды.

2.4.3 Геномдық ДНҚ молекуласын бөліп алу

Таза термофильді изоляттардың геномдық ДНҚ молекуласын бөліп алу үшін тәуліктік 400 мкл дақылды стерильді Eppendorf (safe lock) пробиркаларына құйып 1 минут бойы 4°C температурада 6000 айн/мин жылдамдығында центрифугаланып, супернатанты төгіліп, алынған дақыл тұңбасына 200 мкл лизоцим ертіндісі құйылып 30 минут бойы 37°C температурада инкубациялап тәжірибе барысында үш-төрт рет вортекс көмегімен араластырылды. Әрі қарай өндірушінің нұсқауларына сәйкес пайда болған суспензиядан ДНҚ молекуласын GenElute жинағымен бөліп алынды.

2.4.4 ПТР әдісі

Изоляттарды анықтау 16S рРНҚ генінің [177, 178] ПТР амплификациясынан басталды; ПТР бағдарламасы және қолданылған праймерлердің реті тиісінше 1 және 2 кестелерінде көрсетілген.

Кесте 1 - 16S рРНҚ генінің ПТР амплификациясы үшін қолданылған праймерлер жұбы

Праймердің аты	Праймердің тізбектері
16S Forward (27 F)	5' - GAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S Reverse (1525 R)	5' - GAAAGGAGGTGATCCAGCC

Кесте 2 - 16S рРНҚ генін амплификациясы үшін қолданылған ПТР бағдарламасы

Қадам	Температура (°C)	Уақыт	Цикл саны
Денатурация	94	3 мин	1
	94	30 сек	30
Суыту	55	45 сек	
Элонгация	72	1 мин	
	72	5 мин	1

Мастер микс құрамы келесідей болды: 10 нг ДНҚ үлгісі, 5 мкл 10x Тақ буфері, 5 мкл әрбір дезоксинуклеозидтрифосфаттың (dNTP) 10 mM сток ерітіндісі, әрбір праймердің 0,5 мкл (100 mM ерітінді) көлемі, 0,125 мкл Тақ ДНҚ полимеразасы, және стерильді су 25 мкл көлеміне жеткенше қосылды. Барлық тәжірбиелерде бақылау ретінде ДНҚ қосылмаған реакция ерітіндісі қолданылды. Амплификация CFX96 (Bio-Rad, АҚШ) амплификаторында жүргізілді. ПТР өнімдерін тазалау үшін GenElute™ PCR Cleanup жинағы өндірушінің нұсқауларына сәйкес қолданылды.

2.4.5 Бактерия изоляттарының 16S рРНҚ гендерін секвенирлеу

16S рРНҚ гендерінің нуклеотидтер тізбегін секвенирлеу UiB Sequencing facility (Берген университеті, Норвегия) орталығында тура және кері әмбебап праймерлерді пайдалана отырып (кесте 3) Сенгер әдісімен орындалды (кесте 4).

Кесте 3 - 16S рРНҚ генінің секвенирлеу реакциясында қолданылған праймерлер жұбы

Праймердің аты	Праймердің тізбектері
16S Forward	5' - GAGTTTGATCCTGGCTCAG
575 Forward	5'-CGGAATTAAGTGGGCKTAAAG
K517 Reverse	5'-ATTACCGCGGCTCCTGG
16S Reverse	5'- GAAAGGAGGTGATCCAGCC

Кесте 4 - Сенгер реакциясы бағдарламасы

Қадам	Температура (°C)	Уақыт	Цикл саны
Денатурация	96	2 мин	1
	96	20 сек	37
Суыту	50	10 сек	
Элонгация	60	4 мин	

ПТР амплификация нәтижесінің өнімдерін өндірушінің нұсқауларына сәйкес 3500 Генетикалық анализаторында (Applied Biosystems, АҚШ) коммерциялық Big Dye Terminator v. 3.1 жинтығы арқылы секвенирленді. Секвенирлеу реакциясының жалпы көлемі 10 мкл және келесі бөліктерден тұрды: Big Dye v. 3.1 реакцияға 1 мкл, секвенирлеу буфері 1 мкл, праймер 1,5 мкл (2 М), ПТР өнімі 200 нг, және стерильді су 10 мкл көлеміне жеткенше қосылды. Пайда болған амплификация өнімдерін BigDye XTerminator Purification жиынтығы (Applied Biosystems, АҚШ) көмегімен өндірушінің нұсқауларына сәйкес байланыспаған реакция өнімдерінен тазартылды. Секвенирлеу нәтижесінде алынған нуклеотидтер тізбегін MEGA X бағдарламасы [179] көмегімен талданды және EMBOSS [180] бағдарламасы арқылы талданған праймерлер бір біріне біріктірілді.

2.4.6 Филогенетикалық ағаштарды құрастыру

16S рРНҚ гендерінің гомологиялық нуклеотидтік тізбегін анықтау BLAST бағдарламасының BLASTN suite (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) алгоритмінің көмегімен ашық GenBank халқаралық деректер қорындағы нуклеотидтік тізбектерімен салыстыру арқылы орындалды. Тізбектерді теңестіру MEGA X бағдарламасының MUSCLE [181] алгоритмінде жүзеге асты. Филогенетикалық ағаш MEGA X бағдарламасында maximum-likelihood алгоритмін қолдану арқылы құрастырылды [179]. Эволюциялық қашықтық Tamura-Nei үлгісін қолдану көмегімен есептелді [182]. Тармақталу нүктелерінің дұрыстығын анықтау үшін 1000 қайта үлгілену (resampling) пайдаланып, «maximum-likelihood» деректерінің «Bootstrap» анализы

орындалды. Жетіспейтін деректер мен бос орындарды қамтитын барлық ұяшықтар «exclude all gaps» функциясымен алынып тасталды. Типтік (type strain) штамдардың 16S рРНҚ ген тізбектері GenBank дерекқорынан жүктеліп алынды (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide).

2.4.7 Термофильді бактерияларды секвенирлеу

Перспективті штамдардың геномдық анализі Illumina технологиясына негізделген коммерциялық Next Generation DNA sequence (Eurofins Genomics, Германия) провайдерін пайдалана отырып орындалды.

2.4.8 Геномды *De novo* жинақтау

Illumina платформасында алынған тізбектерді *De novo* жинақтау Microbial Genomics модулін қолдана отырып CLC Genomic Workbench v. 20.0.01 бағдарлама жинағында «*De Novo Assemble Metagenome tool*» көмегімен оқылымдар контигтерге жинақталды. *De novo* жинақтау алдында «Trim Reads tool» көмегімен ең аз сапа баллы 15 және рид ұзындығы 30 ж.н болатын екі мағналы нуклеотидтер кесіліп адаптерлер алынды.

2.4.9 Mauve бағдарламасы

Осы жұмыста секвенирленіп *De novo* жинақталған штамдардың геномдарының дұрыс реттілікте құрастыру мақсатында оларды референс штамм геномдарымен Mauve v. 2.4.0 бағдарламасында «align with progressive Mauve» функциясын қолдану арқылы іске асырылды [183]. Филогенетикалық жақын референс геномдар Genbank дерек қорынан жүктеліп және жекеленіп Mauve бағдарламасына жүктеліп салынды. Минималды «locally collinear blocks» (LCBs) мәндері дефолт түрінде қалдырылды [183]. Геномда қате орналасқан контигтердің реттілігін қайта құру «move contigs» функциясы көмегімен жүзеге асырылды.

2.4.10 Геномды сипаттау

ORF тізбектерін іздеу және сипаттау үшін RAST серверінің SEED viewer бағдарламасы қолданылды. «Mauve» бағдарламасы көмегімен редакцияланған геномдар және олардың референс геномдары RAST серверына FASTA форматында жүктеліп RAST сипаттау схемасы ретінде «classic RAST» функциясы қолданылды. Бұл параметрлер РНҚ аймақтарында сәйкес келмейтін гендерді автоматты түрде жөндейі (automatic error fix function) және жетіспейтін гендер үшін ұзақ бос бос орындарды жояды (backfill gaps).

2.4.11 Геномдарды салыстыру

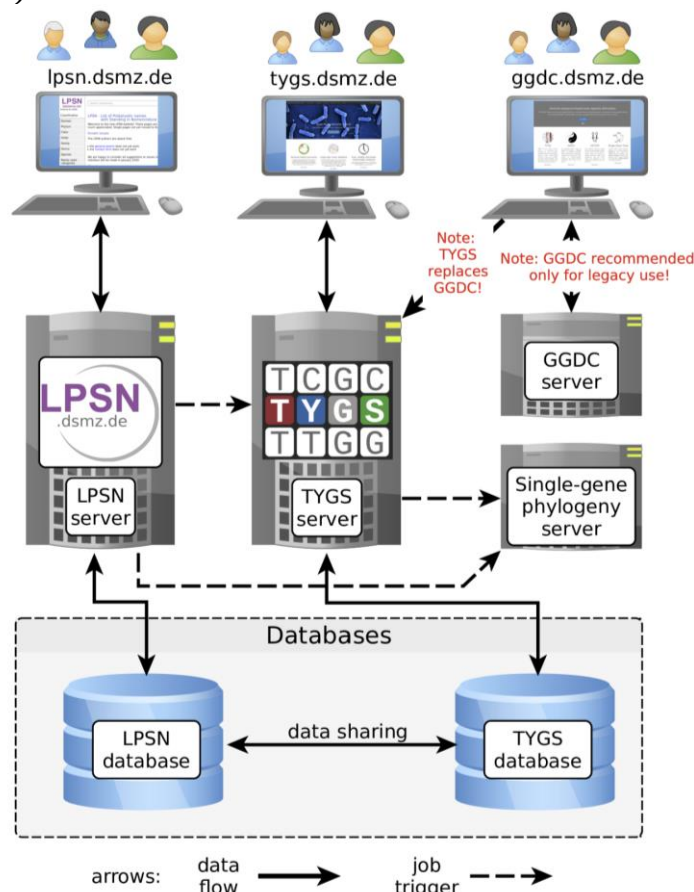
2.4.11.1 GGDC бағдарламасы

Секвенирленген изоляттардың геномдарын филогенетикалық жақын типтік штамдардың геномдарымен салыстыру мақсатында Лейбниц институтының GGDC v. 3.0 бағдарламасы көмегімен есептелді. Бұл

бағдарлама дәстүрлі ДНҚ-ДНҚ гибридизация әдісін *in-silico* жағдайында қайталап жоғары дәлдікпен есептейді [184].

2.4.11.2 TYGS сервері

Осы жұмыстағы тәжірбиелік штамдар мен типтік штамдар арасында геном негізінде филогенетикалық ағаш құрастыру мақсатында Лейбниц институтының (tygs.dsmz.de/) TYGS [185] онлайн платформасы көмегімен құрастырылды. TYGS дерекқоры TYGS жұмыс процесі механизмімен жасалатын немесе тұтынатын деректерге арналған орталық хаб болып табылады (сурет 5).



Ескерту - Сурет бағдарлама тілінде және дереккөз негізінде жасалған [186]

Бірыңғай сызықтар бағдарламаның логикалық ағынын көрсетеді, ал деректер ағыны үзік сызықтармен көрсетілген

Сурет 5 - TYGS серверінің жұмыс істеу сызбасы

GGDC [184] бағдарламасы принципін қолдану арқылы TYGS пайдаланушы геномдарын дерекқорда сақталған типтік штамм геномдарымен салыстырады. Нәтижесінде «branch» қолдауымен және «treelikeness» көрсеткіші классификациясы бар филогенетикалық ағаш (жай кластеризация орнына), түрлер мен түр іші деңгейінде геномдық G+C құрамы айырмашылықтар туралы нәтиже беріледі. Бұл сервер толық немесе ішінара аяқталған геномдық тізбектерді анализге қабілеті алгоритімі бар, дефолт бойынша енгізілген тәжірбиелік геномы үшін ең жақын сәйкес келетін 10

типтік штамдарды TYGS сервері автоматты анықтайды. Түрлер мен түр іші деңгейлерін тағайындау, белгіленген dDDH шектеріне және кластерлеу алгоритміне негізделген және келесі формулаларды есептеу үшін қолданады:

- *d0* формуласы (GGDC 1 формуласына сәйкес): жалпы геном ұзындығын барлық «high-scoring segment pairs» (HSPs) ұзындығына бөлу сомасы.

- *d4* формуласы (GGDC 1 формуласына сәйкес): HSPs жүйесінде табылған барлық сәйкестіктердің жалпы HSP ұзындығына бөлінген сомасы.

- *d6* формуласы GGDC 1 формуласына сәйкес): HSPs жүйесінде табылған барлық сәйкестіктердің жалпы геном ұзындығына бөлінген сомасы.

Осының ішінде көрсетілген *d4* формуласы геном ұзындығына тәуелсіз және осылайша толық емес драфт геномдарын қолдануға мүмкіндік береді [184].

2.4.11.3 ANI бағдарламасы

Тәжірибелік геномдар мен типтік штамдар арасындағы нуклеотидтердің сәйкестігінің қосымша ANI [187] бағдарламасы арқылы бағаланды, ол екі геномдық деректер жиынтығы арасындағы орташа нуклеотид сәйкестігін ең жақсы сәйкестіктер мәнін және өзара ең жақсы сәйкестіктер мәнін пайдалана отырып есептейді. ANI бағдарламасында қолданылған теңестіру опциялары 5 кестеде көрсетілген.

Кесте 5 - ANI бағдарламасында қолданылған нуклеотидтерді теңестіру опциялары

Теңестіру опциялары	Фрагмент опциялары
Минималды ұзындық: 700 нж	Терезе өлшемі: 1000
Минималды сәйкестілік: 70%	Қадам өлшемі: 200
Минималды теңестіру: 50	

Әдетте, бір түрдің геномдары арасындағы ANI мәндері 95% пайыздан жоғары, егер геномдар арасындағы ANI мәні 75% пайыздан төмен болса ондай мәндер сенімсіз болып келеді.

2.4.11.4 BRIG бағдарламасы

Осы жұмыста секвенирленген штамдардың геномдарын және филогенетикалық ұқсас типтік штамдардың геномдарын визуализациялау арқылы айырмашылықтарын көрсету мақсатында BRIG бағдарламасы қолданылды. BRIG прокариот геномдарының өзара салыстыру кескіндерін (дөңгелек геном түрінде) көрсететін Java v. 1.6 тілінде жазылған кросс-платформалық бағдарлама. Бағдарлама кескінді көрсету үшін CGView платформасын [188] және геномды салыстыру үшін BLAST алгоритмін [189] пайдаланады.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ

3.1 Жаркент геотермалды су көздерінің микробтық әралуандылығы

3.1.1 Метагеномдық анализ

Жаркент геотермалдық су көздері Тянь-Шань тау бөктерінде Жаркент қаласының маңында орналасқан. Оның аумағында (42-103°C) температурасы және (2385-3200 метр) тереңдікпен ерекшеленетін көптеген геотермалды су көздері орналасқан. Солардың ішінде антропогендік фактор әсері төмен және температурасы жоғары екі геотермалды су көзінен су үлгілер алынып оларға N2 және N1 белгілеулері берілді. Үлгілердің температурасы, ортаның pH көрсеткіші мен орналасқан жері 6 кестеде берілген және қосымша В суретінде үлгілердің алынған аймағы көрсетілген.

Кесте 6 - Үлгілердің сипаттамасы

Үлгі нөмірі	Температура °C	pH көрсеткіші	Тереңдігі (м)	GPS көрсеткіші
N1	76°C	6.8	0.8	43°58'47.7" N, 79°39'47.94" E
N2	98°C	7.1	2385	43°97'14.93"N, 79°66'12.09" E

Үлгілер алынған геотермиялық су көздері максималды температурасы 98°C және pH мәні 6,8-7,0 аралығында орташа сілтілігімен ерекшеленді. N1 үлгісі алынған орыны шөгінді аралас ашық геотермалды су көзі болғандықтан, түбінде және су бетінде көптеген органикалық қалдықтар байқалды. N2 үлгісі 2385 метр тереңдіктен жоғары қысым ағынымен жер бетіне құбыр арқылы шығуда, бұл өз кезегінде осы геотермалды су көзіне қандай да бір органикалық заттардың түсу мүмкіндігін төмендетеді. Алынған су үлгілерінің элементтік құрамын зерттеу барысында натрийдің және кальцийдің жоғары концентрациясы анықталды (кесте 7).

Кесте 7 - Жаркент геотермалды су көздерінен алынған N1 және N2 үлгілерінің элементтік құрамы

Элементтер	N1. (ppm*)	N2. (ppm)	Аниондар	N1. (ppm)	N2. (ppm)
Алюминий	0,164	0,027	Br	ND	0,83
Күшән	ND	0,036	NO ₃ ⁻	ND	ND
Бор	0,055	1,302	Cl	243,42	279,09
Барий	0,338	0,316	SO ₄ ²⁻	1,99	108,06
Кальций	18,391	13,095			
Темір	0,147	0,016			
Қорғасын	ND	0,012			
Литий	0,008	0,154			
Магний	1,553	1,386			
Марганец	0,008	0,008			
Никель	ND	0,009			
Натрий	157,491	364,929			
Стронций	0,389	0,351			
Күкірт	0,801	35,430			
Кремний	4,585	35,933			
Калий	0,869	5,433			
Ванадий	20,733	3,595			
Ескерту - *Миллионға бөлік					

N1 үлгісінде табылған ең көп катиондар: натрий (157,4 ppm), ванадий (20,7 ppm), кальций (18,3 ppm), кремний (4,5 ppm) және магний (1,5 ppm); ал N2 үлгісінде: натрий (364,9 ppm), кремний (35,9 ppm), күкірт (35,4 ppm), кальций (13,0 промилле), калий (5,4 ppm), ванадий (3,5 ppm), магний (1,3 ppm) және бор (1,3 ppm) болды. Аниондарға келетін болсақ N1 үлгідегі ең көп таралған хлорид (243,4 ppm) және сульфат (1,9 ppm) болды, ал N2 үлгісінде хлорид (279,0 ppm) және сульфаттың (108,0 ppm) үлкен мөлшерімен ерекшеленді. Co, Cr, Cu, Eu, La, Y, Zn және NO₃⁻ зерттелген үлгілерде анықталмады, ал As, Pb, Ni және Br⁻ тек N1 үлгісінде ғана табылды.

Сонымен, N2 үлгісі алынған ортада жоғары қысымымен ерекшелетіндіктен факультативті анаэробты архейлердің және бактериялардың өсіп дамуына өте қолайлы болса, N1 үлгісі алынған ортада органикалық қалдықтары болғандықтан гидролитикалық белсенділігі жоғары термофильді бактерияларға қолайлы орта болып табылады. Осы екі термалды су көздерінде төмен антропогендік фактордың әсері және жоғарыда айтылған ерекшеліктер олардың құндылығы мен ерекшелігін жоғарлатады.

Ары қарай Жаркенттің геотермалды су көздерінің микробтық әралуандылығын анықтау үшін үлгілерге шотган метагеномика әдісі қолданылды. Гипертермофильді микробтық қауымдастығының полисахаридтерге бейімделуін зерттеу үшін N2 үлгісінен жинақтаушы дақылдар алынды. Алынған инокуляттар энергияның негізгі көзі ретінде крахмал, КМС және ксилан полисахаридтерімен 75°C температурасында аэробты (N2_ае) және анаэробты (N2_ан) жағдайда инкубацияланып, олардың бейімделуі салыстырмалы метагеномика әдісімен зерттелінді.

Секвенирлеу нәтижесінде алынған әрбір оқылымның сапасы тексеріліп төмен сапалы оқылымдар және адаптерлер 3' және 5' ұштарынан алынып тасталды (кесте 8).

Кесте 8 - Үлгілердегі нуклеотид тізбектердің сапа статистикасы

Үлгі	Жалпы тізбектер саны	Жоғары сапалы тізбектер	Ең үлкен контиг ұзындығы	ГЦ (%)	N50*	L50*
N1	27,136,686	26,243,330	159,868	47.7	28,090	131
N2	28,955,840	28,955,840	677,570	39.12	90,847	45
N2_ае (аэробты жинақтаушы дақыл)	27,799,440	26,982,141	146,635,7	44.2	103,524	53
N2_ан (анаэробты жинақтаушы дақыл)	28,327,098	27,760,490	154,373	65.75	70,821	12
Ескерту - *N50, және L50 статистикасы геномды жинақтау сапасының өлшем бірліктері болып табылады						

Жалпы N1 үлгісінде максималды контиг ұзындығы 153 044 ж.н болатын 27 136 686 оқылым, ал N2 үлгісінде 28 955 840 оқылым анықталды. N2 үлгісінен алынған жинақтаушы дақылдарға келетін болсақ, аэробты дақылдан 27 799 440 оқылым есептелсе, анаэробты дақыл үшін 28 327 098 оқылым секвенирленді.

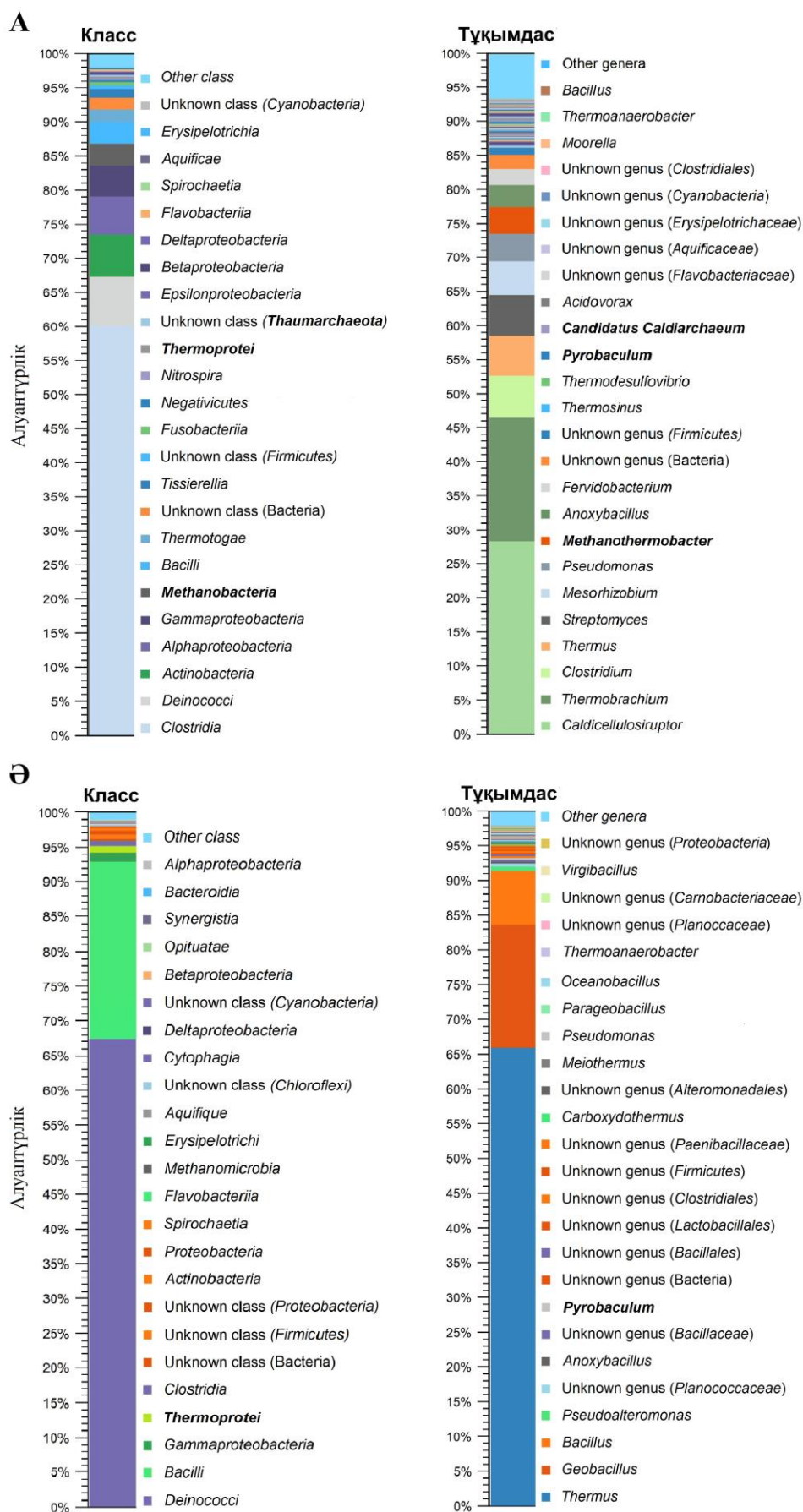
Жаркенттің геотермалды су көздерінен алынған үлгілердің микробтық әралуандылығы CLC «Taxonomic Profiling» бағдарламасымен анализ нәтижесінде тізбектерде негізінен басымдылық бактерияларға тиесілі болды (>96%) (кесте 9).

Кесте 9 - N1, N2, N2_ае және N2_ап үлгілерінде табылған микробтық тізбектерінің салыстырмалы әралуандылығы

Тіршілік	N1	N2	N2_ае	N2_ап
Архебактериялар	3,9%	1,8%	0,9%	0,3%
Бактериялар	96%	98%	99%	99%
*Эукариоттар	0,08%	0,14%	0,04%	0,03%
Вирустар	0,01%	0,06%	0,06%	0,0%
↓Қос мағыналы	0,01%	0,03%	0,10%	0,01%
Ескерту - *Қос мағыналы: Ешбір патшалыққа жатқызуға болмайтын тізбектер; ↓Эукариоттар: Паразиттік және паразиттік емес қарапайымдылар				

Әр үлгідегі бактериялардың салыстырмалы мөлшері келесі нәтижелерді көрсетті: N1 (96%), N2 (98%), N2_ае (99%) және N2_ап (99%). N1 (3,9%), және N2 (1,8%) үлгілердегі архейлердің салыстырмалы мөлшері 1,8%-дан жоғары болса, жинақтаушы дақылдарында 0,9% - дан аспады. Эукариоттық микроорганизмдерге келетін болсақ, N2_ап (0,03%) және N2_ае (0,04%) жинақтаушы дақыл үлгілерде де аз көлемде табылды. Жаркенттің геотермалды су көздерінен алынған үлгілерде архебактерияларға қарағанда термофильді бактериялардың жоғары басымдылығы мен әралуандылығы, олардың жоғары бейімділігінің нәтижесі деуге болады.

Зерттеу барысында N1 үлгісінің бактериялық қауымдастығында *Clostridia* (60%), одан кейін *Deinococci* (7,1%) және *Actinobacteria* (6%) класының түрлері басымдылық көрсетті (сурет 6).



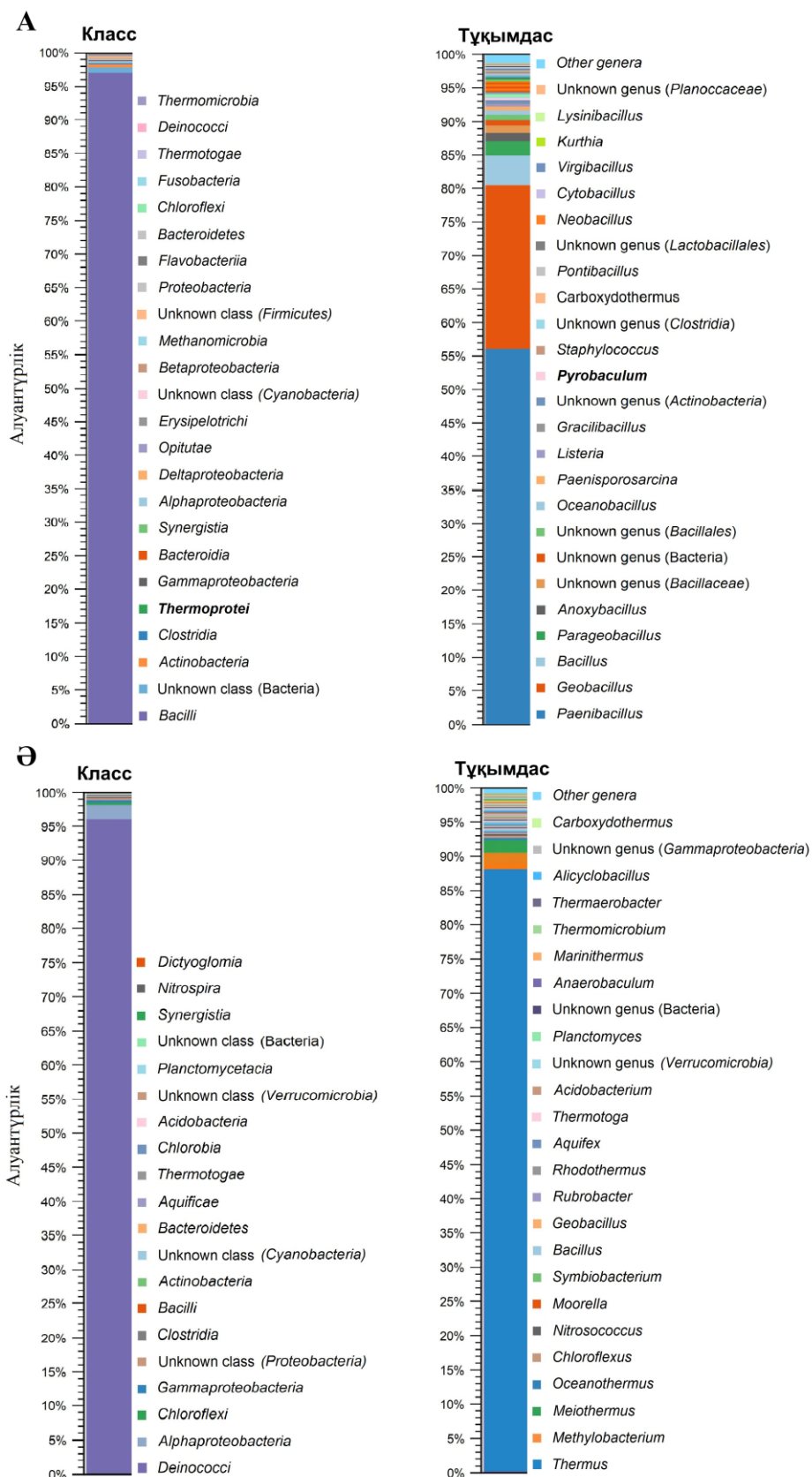
Сурет 6 - N1 (А) және N2 (Ә) үлгілерінде қауымдастық әралуандылығы

Тұқымдас деңгейінде N1 үлгісінде *Caldicellulosiruptor* (28%) және *Thermobrachium* (18,1%) тұқымдасының бактериялары жоғары басымдылық көрсетсе азырақ мөлшерде *Clostridium* (5,9%), *Thermus* (5,8%) *Streptomyces* (5,1%), *Mesorhizobium* (4,9%) және *Pseudomonas* (4,2%) бактерияларының тұқымдас өкілдері 4,2-5,9% аралығында болатыны байқалды (сурет 6, А). Сонымен қатар, біздің анализ нәтижесінде N1 үлгісінде *Caldicellulosiruptor kristjanssonii* I77R1B термофильді бактериясы 28% басымдылықпен ең көп таралған түр ретінде анықталды. Одан кейінгі *Thermobrachium celere* (18%), *Clostridium thermobutyricum* (5,1%), *Thermus oshimai* (4,9%), *Streptomyces griseorum* (4,9%), *Pseudomonas* sp. ТКР (4,2%) және *Methanothermobacter thermautotrophicus* str. Delta H (3,5%) архебактериясы болды.

N2 үлгісінде *Deinococcus* - *Thermus* (68%) және *Firmicutes* (29%) типінің микроорганизмдері басым екені көрінді, ал ең басым класс *Deinococci* (67,5%), содан кейін *Bacilli* (26%) өкілдері анықталды (сурет 6, Ә). Тұқымдас деңгейінде *Thermus* бактериялары салыстырмалы басым болды, олар метагеномның 67% құрады. Одан кейін басымдылық *Geobacillus* 17,8% және *Bacillus* 7,8% көрсетті (сурет 6, Ә). N2 үлгісінде *Thermus oshimai* JL-2 (24,5%), *Thermus* sp. CCB_US3_UF1 (17%) және *Geobacillus vulcani* PSS1 (15,2%) ең көп таралған түрлер болып анықталды.

Әрбір үлгіде табылған таксондардың салыстырмалы әралуандылығын зерттеу нәтижесінде, екі үлгіде де (N1, N2) *Firmicutes* типінің өкілдері бар екені анықталды: N1 үлгісінде 62,2% болса, N2 үлгісінде екі есе аз, 29% болды. Екінші орында көп таралған тип өкілі *Deinococcus-Thermus*, N1 үлгісінде 7,9%, ал N2 үлгісінде айтарлықтай басым, 63,5% мөлшерінде болды. Биоинформатикалық анализ нәтижесі бойынша N2 үлгісіне қарағанда N1 үлгісінде, *Proteobacteria* он есе көп тарағандығын көрсетті, яғни N1 үлгісінде - 11,6% ал N2 үлгісінде небәрі 1,1% кездесті. Үлгілерде бактериялардан басқа аз көлемде *Crenarchaeota* архебактерия тип өкілдері табылды, ол N1 үлгісінде 0,7% ал N2 үлгісінде 0,9% кездесті. Жоғарыда аталған кейбір таксондардың түрлі пайыздық мөлшерде кездесуі, бұл үлгілердің салыстырмалы ұқсастығын көрсетеді. Дегенмен N2 үлгісіне қарағанда N1 үлгісінде *Euryarchaeota* (3,6%) және *Thaumarchaeota* (0,6%) архебактерия тип өкілдері, сонымен қатар *Actinobacteria* (6%), *Thermotogae* (2%), *Negativicutes* (0,8%), *Nitrospira* (0,8%) және *Aquificae* (0,5%) сирек бактериялардың болуымен ерекшеленді.

Сондай-ақ жұмыс барысында N2 үлгісінен алынған судағы микроорганизмдердің жинақтаушы дақылдарының микробтық әралуандылығы талданды, бұл гипертермофильді микробтық қауымдастығының полисахаридтерге бейімделу потенциалын зерттеу үшін N2 үлгісінен жинақтаушы дақылдар алынды. Бұл жинақтаушы дақылдарға келесі таңбалау берілді: N2_аэробты (N2_ае) және N2_анаэробты (N2_ан). N2_ае жинақтаушы дақылының құрамында *Bacilli* (97,1%) классы басым болса, N2_ан байыту үлгісінде *Deinococcus-Thermus* (96,3%) басымдылық көрсетті (сурет 7).

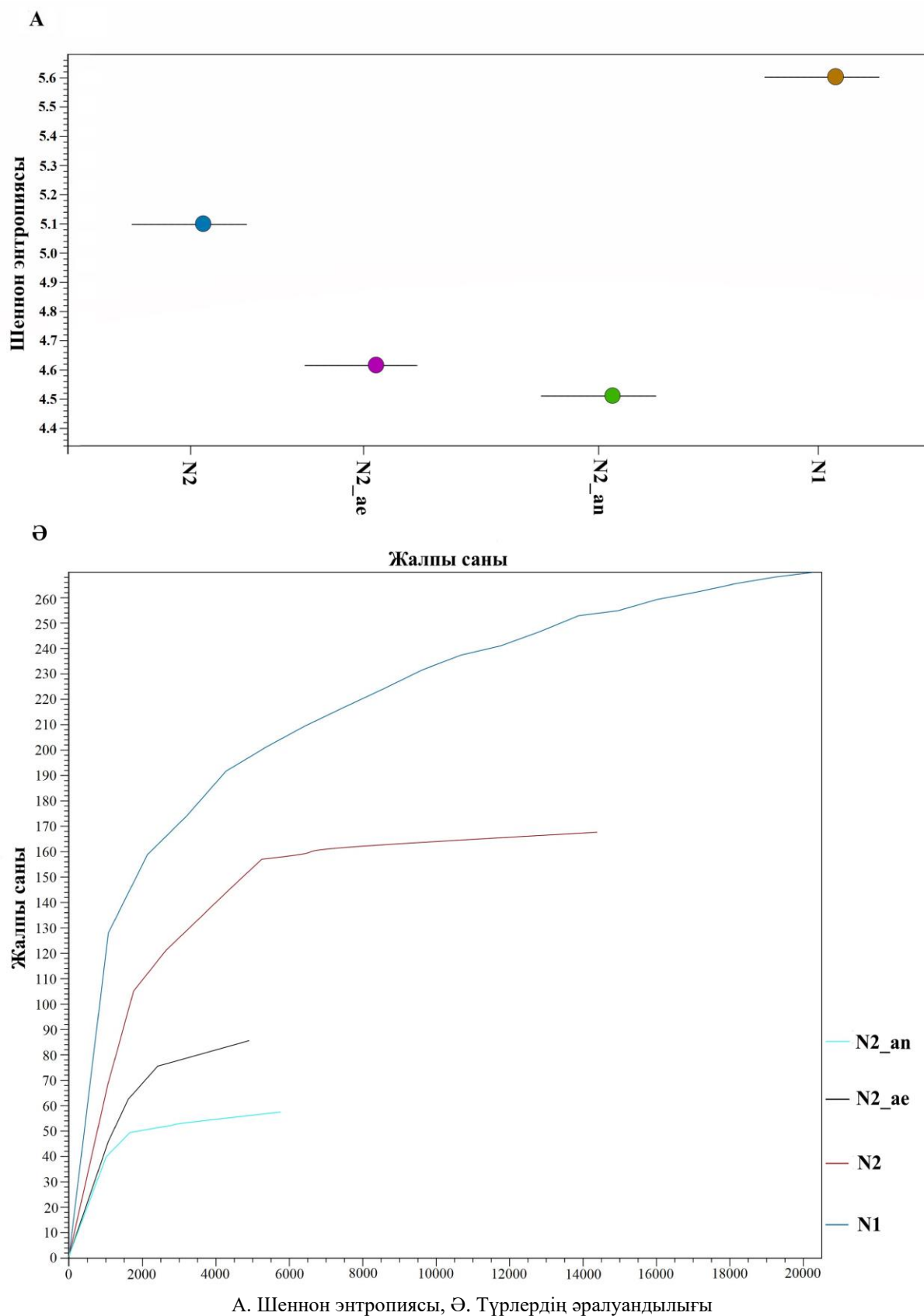


Архейлер қалың әріптермен көрсетілген

Сурет 7 - N2_ае (А) және N2_ан (Ә) үлгілерінде қауымдастық әралуандылығы

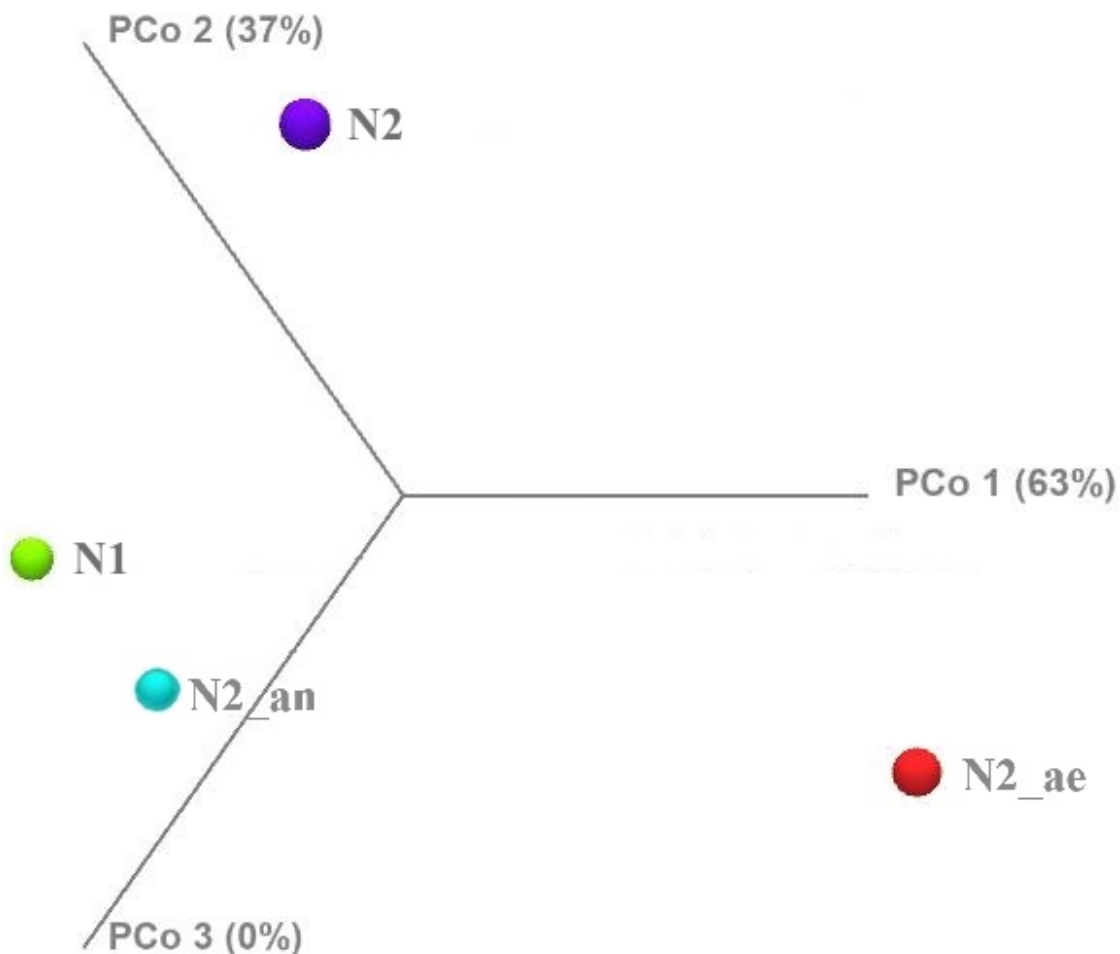
Paenibacillus (56%) және *Geobacillus* (25%) бактерияларының екі тұқымдасы N2_ае үлгісінің жалпы 81% астам әралуандылығын құраған. Осы үлгіде табылған басқа тұқымдастарға *Bacillus* (4,2%), *Parageobacillus* (2,3%), *Anoxybacillus* (1,5%), *Bacillaceae*-ға жататын белгісіз туыстас (1,2%) және *Bacteria*-ға жататын белгісіз тұқымдас (сурет 7, А). N2_ап анаэробты жинақтаушы дақыл үлгісін қарастыратын болсақ, онда жоғары басымдылықты *Thermus* (87,9%) бактериялары көрсетті (сурет 7, Ә). Сондай-ақ үлгіде *Methylobacterium*, *Meiothermus*, *Oceanothermus*, *Chloroflexus* және *Nitrosococcus* бактерия түр өкілдері де кездесті (сурет 7, Ә). Түр деңгейінде N2_ае үлгісінде оқылымдардың көпшілігі *Paenibacillus* sp. Y412MC10 (30,4%) және *Geobacillus kautophilus* (18,2%) бактерияларына сәйкестік көрсетсе, N2_ап үлгісінде басымдылық *Thermus scotoductus* SA-01 (28,03%) штамына тиесілі болды. Осылардың ішінде екі түр түпнұсқа N2 үлгісінде 0,6% (*Paenibacillus* sp. Y412MC10) және 2,5% (*Thermus scotoductus* SA-01) азырақ мөлшерінде табылды. Бұл *Paenibacillus* sp., *Thermus* sp. және *Geobacillus* sp. бактерия өкілдерінің полисахаридтерді ыдыратуда жоғары бейімділігін көрсетеді. Бастапқы түпнұсқа N2 үлгісінде ең басым түр болып табылған *Thermus oshimai* JL-2, N2_ап жинақтаушы дақыл үлгісінде небәрі 1,3% болса, ал N2_ап үлгісінде 0,008% мөлшерінде кездесті. Жинақтаушы үлгілерінде басым болған *Paenibacillus* және *Thermus* түрлерінен басқа, *Bacillus* sp. 4,2% және *Marinithermus* sp. 0,5% мөлшерлерінде кездесті түпнұсқа үлгісінде *Bacillus* sp. 7,8% болса, ал *Marinithermus* sp. бактериялары үшін тізбектер кездеспеген. Жинақтаушы дақылдарында бұл бактериялардың төмен мөлшері олардың полисахаридтерді ыдырату қарқындылығының төмендігімен байланысты болуын көрсетеді.

Метагеномдық үлгілерден Шеннон энтропиясы және α -әралуандылық мәндері CLC «Alpha Diversity» бағдарламасымен есептелді (сурет 8).



Сурет 8 - Жаркент геотермалды су көздерінен алынған үлгілердің және жинақтаушы дақылдарының α -әралуандылығы

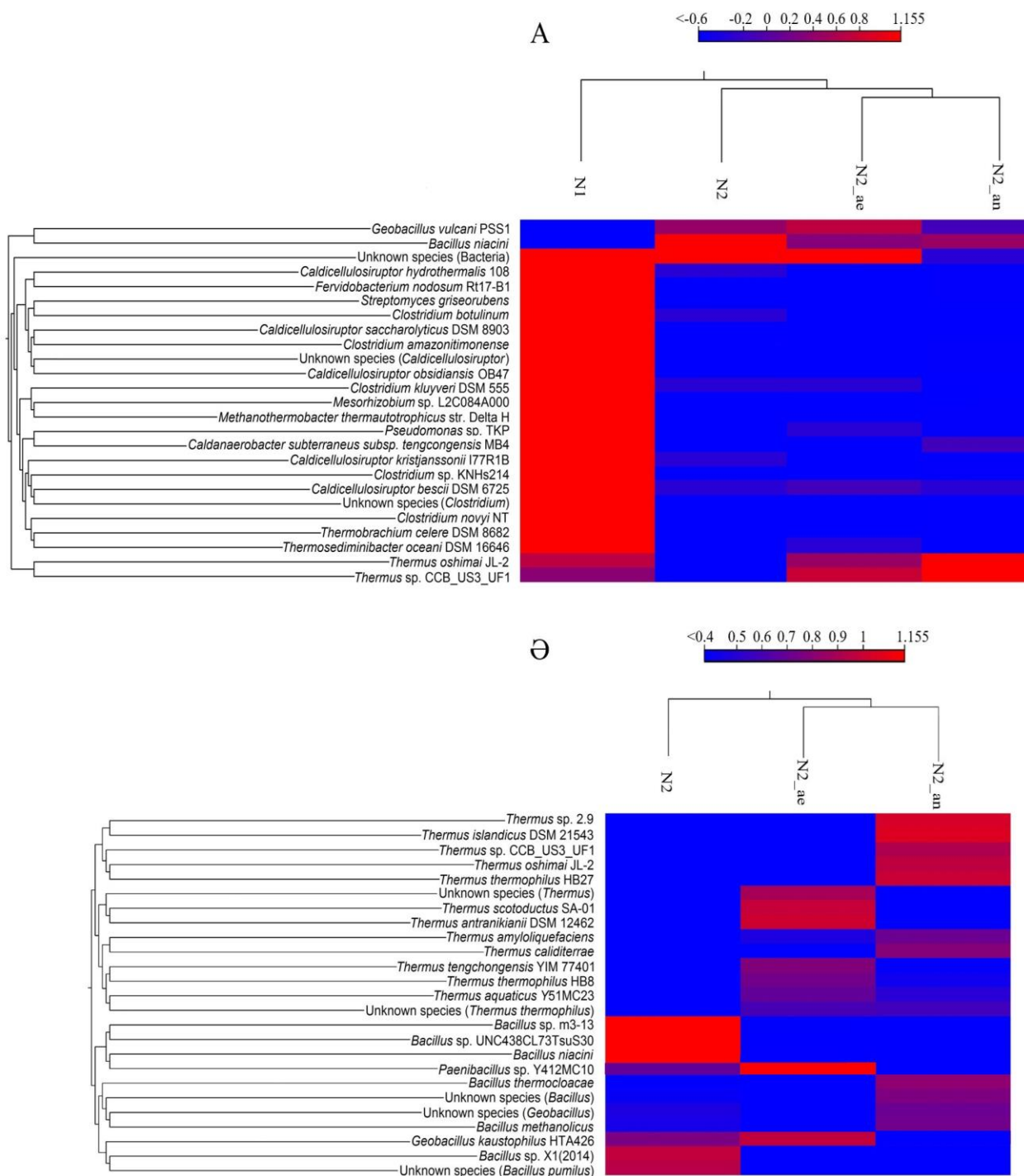
N2 үлгісінде Шеннон энтропиясы бойынша әралуандылық пен біркелкіліктің деңгейі 27 класс, 84 тұқымдас 176 түр құраса, ал N1 үлгісі 39 класс, 116 тұқымдас, 271 түрді құрады (сурет 8 А, Ә). Жинақтаушы дақылдарына келетін болсақ N2_ае (24 класс, 41 тұқымдас, 86 түр) және N2_ан (20 класс, 38 тұқымдас, 59 түр) үлгілерінде микроорганизмдердің әралуандылығы N1 және N2 үлгілерімен салыстырғанда айтарлықтай төмен болды. β -әралуандылық анализінде Bray-Curtis өлшемі қолданып PcoA сызбасы түрінде талданды, ол микробтық қауымдастықтардың бір бірінен нақты айырмашылығын көрсетеді (сурет 9).



Сурет 9 - Жаркент геотермалды су көздерінен алынған үлгілердің және жинақтаушы дақылдарының PcoA сызбасы

β -әралуандылық анализі бойынша N1 үлгідегі микробтық қауымдастық N2 үлгісінен айтарлықтай ерекшелік көрсетті. Нәтижесінде дәл сондай айырмашылық жинақтаушы дақылдарында да анықталды. N1 үлгісі мен N2_ан жинақтаушы дақылы арасында ғана айырмашылық аз болды, бұл осы екі үлгідегі метагеномдардың ұқсастығын айқындайды.

Жаркент геотермалды су көздерінен алынған үлгілерде және жинақтаушы дақылдарында салыстырмалы айырмашылықтары және ұқсастығы CLC «Heat map» бағдарламасымен құрылды (сурет 10).



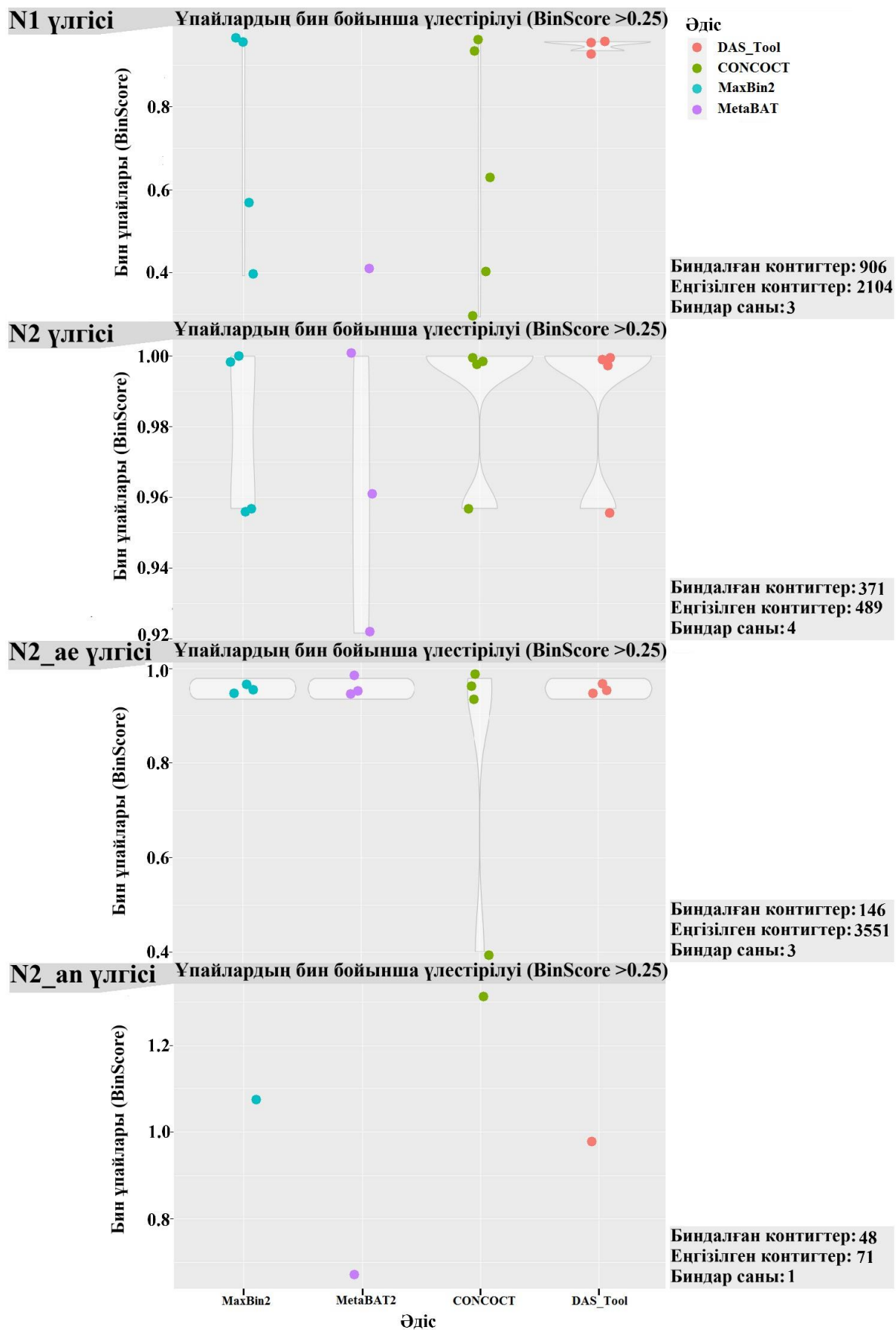
Әраландылық деңгейлері бойынша иерархиялық кластерлеуді есептеу арқылы алынған дендрограммалар, түрлер (сол жақта) және үлгілер (жоғарғы жақта) арасындағы байланысты көрсетеді

Сурет 10 - Жаркент геотермалды су көздерінен алынған үлгілердің және жинақтаушы дақылдарының жылу карталары

Үлгілердегі әралуандылығы жоғары 25 бактерия және архебактериялар түрлерінен жылу карталарын құрастырып, нәтижесінде N1, N2 және N2_ae үлгілеріндегі белгісіз түрлер (бактериялардың) N2_an үлгісіне қарағанда айтарлықтай жоғары болғаны анықталды (сурет 10, А). Жинақтаушы дақыл үлгілерінің салыстырмалы әралуандылығы бойынша иерархиялық топтастыру нәтижесінде N2, N2_ae, және N2_an үлгілері бір кластерге топтасты (сурет 10, Ә), ал N1 үлгісі бөлек кластер құрайтыны анықталды. Алынған нәтижелер N2 үлгісінде және сол үлгіден алынған жинақтаушы дақылдарында *Paenibacillus* sp., *Thermus* sp. және *Geobacillus* sp. бактерия өкілдерінің полисахаридтерді ыдыратуда жоғары бейімділігін көрсетті.

3.1.2 Метагеномнан жинақталған геномдар

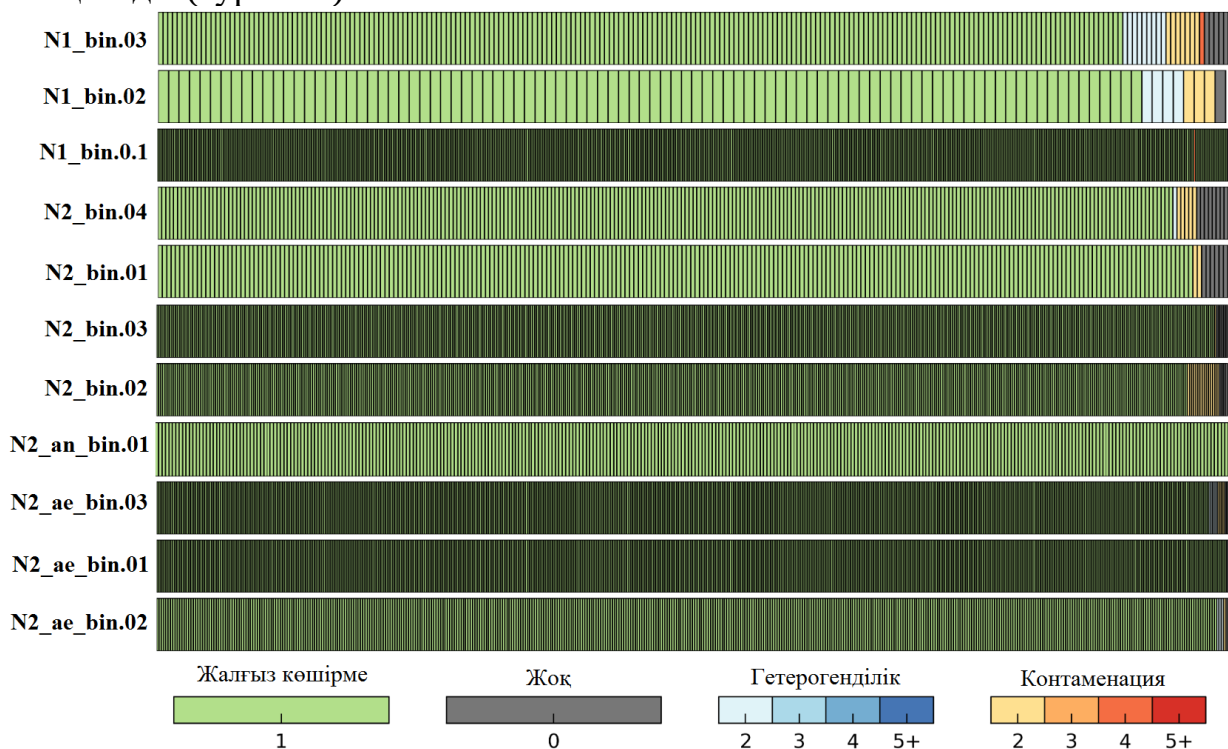
Талданған метагеномдардан бактериялардың әралуандылығы жоғары оқылымдардың жеке геномға жинақтау мақсатында метагеномнан жинақталған геномдар алынды. Алынған МЖГ саны және толықтығы метагеномдық анализдің тереңдігін және сапасын көрсетеді. metaSPAdes v. 3.15.3 [162] (контиг ұзындығы 10000 ж.н. кем емес) бағдарламасының көмегімен *de novo* [53] жинақталған барлық метагеномдар (N1, N2, N2_ae және N2_an) контигтері MaxBin2 v. 2.2.4 [164], MetaBAT2 v. 1.7 [166], және CONCOCT v. 1.1 [165] бағдарламаларымен биндерге жинақталып DAS Tool v. 1.1.2 [167] бағдарламасы көмегімен жалпы оңтайланған 11 геном жинақталды, соның ішінде N1 үлгісінде енгізілген 2104 контигтің 906 ғана топтастырылып 3 геном құрады, N2 үлгісінде енгізілген 489 контигтің тек 371 топтастырылып 4 геном алынды. Ал N2_ae үлгісінде 3551 контигтің тек 146 топтастырылып 3 геном алынса, N2_an үлгісінде 71 контигтің 48 контигі топтастырылып 1 геном алынды (сурет 11).



Сурет 11 - Das-Tool [167] бағдарламасы көмегімен оптимизацияланған үлгілердегі бин графиктері

MaxBin [164], MetaBAT [166] және CONCOCT [165] (түстеріне сәйкес) биннинг әдістері солдан оңға қарай көрсетілген, әр нүкте әр бағдарлама әдісімен топтастырылған бин санын көрсетеді. Сол жақта орналасқан BinScore шкаласы биндердің сапасын бағалайды. Сапасы 0.6% төмен биндер DAS-Tool [167] бағдарламасымен еленбеді.

CheckM v. 1.0.18 [168] бағдарламасының нәтижесі бойынша оңтайланған 11 геном 90,9% жуығы жоғары сапалы (N1_bin.01, N1_bin.02, N2_bin.01, N2_bin.02, N2_bin.03, N2_bin.04, N2_ae_bin.01, N2_ae_bin.02, N2_ae_bin.03, N2_an_bin.01) тек 9,1% орташа сапалы болып (N1_bin.03) анықталды (сурет 12).



Бин геномында бір және тек бір ғана көшірмеде кездесетін жалғыз көшірме маркер гендері жасыл түспен, бірден көп көшірме көк (бірдей таксономиялық позиция) немесе сарыдан қызылға (әртүрлі таксономиялық позиция) дейін түспен және сұр түсте мүлдем жоқ гендер көрсетілген

Сурет 12 - CheckM [168] бағдарламасының МЖГ - дың сапасын бағалау графигі

Жоғары сапалы МЖГ-дың толықтығы 98-100% аралығында, ал ластану деңгейі 5% төмен болды. Орташа сапалы МЖГ-ға келетін болсақ, толықтығы 97% жоғары, ластану деңгейі 9% жоғары болды (кесте 10).

RASTtk v. 1.073 [169], және Prokka v. 1.14.5 [170] бағдарламаларының функционалдық сипаттау нәтижелеріне сәйкес. CDS гендерінің саны 2163-6943 аралығында болды (кесте 11).

Кесте 10 - CheckM [168] бағдарламасының МЖГ-дың сапасын бағалау нәтижелері

Бин атауы	Маркер шығу тегі (lineage)	Геном саны	Маркерлар саны	0	1	2	3	4	5+	Толықтығы (%)	Ластануы (%)
N1_bin.01	g_ <i>Pseudomonas</i>	78	1044	4	1033	7	0	0	0	99.48	0.83
N1_bin.02	k_ <i>Bacteria</i>	5443	102	1	94	7	0	0	0	98.25	4.04
N1_bin.03	c_ <i>Clostridia</i>	387	223	5	201	16	0	1	0	97.43	9.81
N2_bin.01	p_ <i>Firmicutes</i>	830	245	6	237	2	0	0	0	96.77	0.77
N2_bin.02	o_ <i>Bacillales</i>	139	508	4	489	15	0	0	0	98.5	4.15
N2_bin.03	f_ <i>Bacillaceae</i>	128	561	6	554	1	0	0	0	97.81	0.07
N2_bin.04	c_ <i>Bacilli</i>	764	272	8	258	6	0	0	0	95.86	2.65
N2_ae_bin.01	k_ <i>Bacteria</i>	169	316	0	316	0	0	0	0	100.0	0.0
N2_ae_bin.02	f_ <i>Bacillaceae</i>	27	604	1	603	0	0	0	0	99.44	0.0
N2_ae_bin.03	f_ <i>Paenibacillaceae</i>	32	468	1	463	4	0	0	0	99.85	1.37
N2_an_bin.01	f_ <i>Bacillaceae</i>	27	604	2	593	9	0	0	0	98.88	1.4

Ескерту - CheckM бағдарламасының шығыс кестесі әрбір МЖГ-дың толықтығы мен ластануын есептеу үшін пайдаланылатын ақпаратты көрсетеді. Қосымша бағандар кладаға-тән маркерлерді генерациялау үшін пайдаланылған геномдардың санын, геном ішінен табылатын бір көшірмелі маркерлік гендік отбасылардың санын және солардың шығу тегі үшін маркерлер жиындарының санын қамтиды. Сондай-ақ нөл рет ('0'), дәл бір рет ('1'), күтілгеннен бір реттен көп ('2'ден '5+' ке дейін) жиі табылған бір көшірмелі гендік тоб тармақтарына тән маркерлер санының бөлінуі көрсетілген, және соңында, толықтығы мен ластану деңгейімен есептелген

Кесте 11 - 11 МЖГ-дың геномдық ерекшеліктері

Атауы	N1_bin.01	N1_bin.02	N1_bin.03	N2_bin.01	N2_bin.02	N2_bin.03	N2_bin.04	N2_ae_bin.01	N2_ae_bin.02	N2_ae_bin.03	N2_an_bin.01
G+C құрамы (%)	60.8	39.4	32.1	63.5	36.0	53.9	36.0	44.9	49.3	53.4	64.8
Салмағы (ж.н)	6,667,509	2,251,391	3,676,422	2,488,140	4,524,704	2,748,731	4,252,765	3,244,634	7,376,215	3,103,782	2,068,301
Контингтер	299	92	515	39	25	35	272	31	50	65	48
CDS	6320	2166	3985	2577	4694	3049	4422	3533	6943	3452	2163
rPHҚ	54	44	57	61	57	36	13	33	101	31	43
5S рPHҚ	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
16S рPHҚ	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
23S рPHҚ	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
CRISPR	0	2	13	4	0	3	0	0	0	4	1
N50 (ж.н)	41,669	45,080	18,004	1,040,42	4,057,32	1,068,87	27,379	2,648,38	6,811,93	1,167,11	75,214

11 кестеде көрсетілгендей рибосомалық РНҚ гендер (5S рРНҚ, 16S рРНҚ, 23S рРНҚ) тек төрт МЖГ-да (N1_bin.01, N1_bin.03, N2_bin.03, N2_ae_bin.02) бар болса, CRISPR гендері 50% артық МЖГ-да кездесті.

GTDB-Tk v. 1.7.0 [171] бағдарламасының бастапқы анализы арқылы алынған нәтижелер 11 МЖГ *Geobacillus*, *Pseudomonas*, *Fervidobacterium*, *Caloramator*, *Calditerricola*, *Sutcliffiella*, *Anaerobacillus*, *Paenibacillus*, *Parageobacillus* және *Thermus* тұқымдастарымен байланысты екенін көрсетті (кесте 12). N2_bin.01, N2_bin.02, N2_bin.04 және N2_ae_bin.02 МЖГ-ры үшін ANI мәні 93.17% аз болды [190], сондықтан ұқсастық әртүрлі түр немесе тіпті туыстас деңгейінде болса, қалған геномдарға ANI көрсеткіші 96.8% және 99.25% аралығында болды (кесте 12).

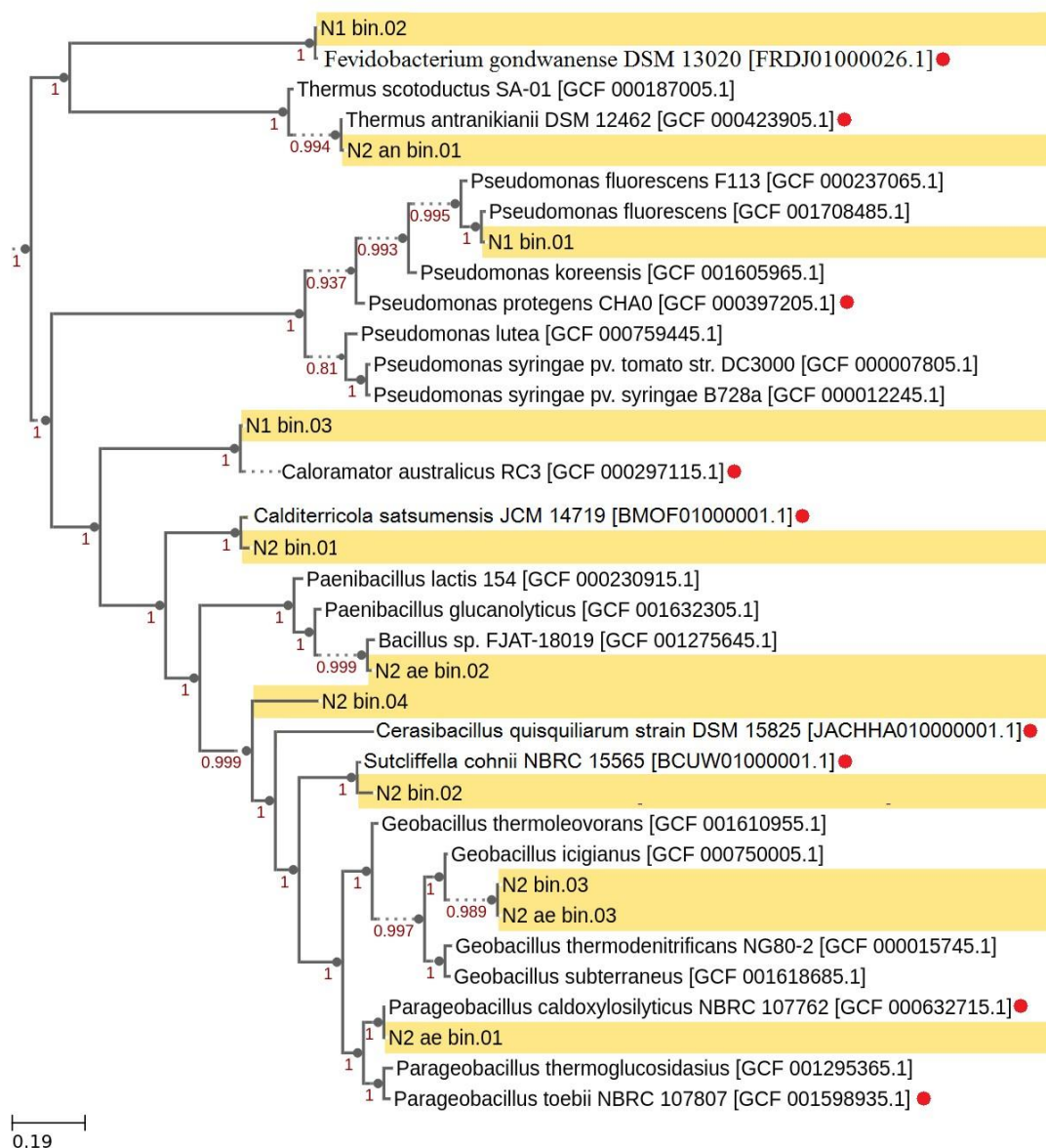
Кесте 12 - GTDB-Tk [171] бағдарламасының анализ нәтижесі бойынша МЖГ-дың таксономиялық орналасуы

МЖГ-лар	Таксономия	Ең жақын орналасқан референс нөмірі*	Ең жақын орналасқан таксономия	Ең жақын орналасқан ANI (%)
N1_bin.01	d__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Pseudomonadaceae; g__Pseudomonas_E; s__Pseudomonas_E fluorescens_AN.	GCF_001708445.1	d__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Pseudomonadaceae; g__Pseudomonas_E; s__Pseudomonas fluorescens.	99.25
N1_bin.02	d__Bacteria; p__Thermotogota; c__Thermotogae; o__Thermotogales; f__Fervidobacteriaceae; g__Fervidobacterium; s__Fervidobacterium gondwanense.	GCF_900143265.1	d__Bacteria; p__Thermotogota; c__Thermotogae; o__Thermotogales; f__Fervidobacteriaceae; g__Fervidobacterium; s__Fervidobacterium gondwanense.	98.52
N1_bin.03	d__Bacteria; p__Firmicutes_A; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Caloramatoraceae; g__Caloramator; s__Caloramator australicus.	GCF_000297115.1	d__Bacteria; p__Firmicutes_A; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Caloramatoraceae; g__Caloramator; s__Caloramator australicus.	97.82
N2_bin.01	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Calditerricolales; f__Calditerricolaceae; g__Calditerricola; s__	GCA_014646935.1	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Calditerricolales; f__Calditerricolaceae; g__Calditerricola; s__Calditerricola satsumensis.	92.04
N2_bin.02	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Bacillaceae_I; g__Sutcliffiella; s__	GCF_002250055.1	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Bacillaceae_I; g__Sutcliffiella; s__Sutcliffiella cohnii.	93.17

12 - кестенің жалғасы

N2_bin.03	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Anoxybacillaceae; g__Geobacillus; s__Geobacillus icigianus.	GCF_000750005.1	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Anoxybacillaceae; g__Geobacillus; s__Geobacillus icigianus.	96.8
N2_bin.04	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales_H; f__Anaerobacillaceae; g__Anaerobacillus; s__	-	-	-
N2_ae_bin.01	d__Bacteria; p__Bacillota; c__Bacilli; o__Caryophanales; f__Bacillaceae; g__Parageobacillus; s__Parageobacillus caldoxylosilyticus.	GCF_000632715.1	d__Bacteria; p__Bacillota; c__Bacilli; o__Caryophanales; f__Bacillaceae; g__Parageobacillus; s__Parageobacillus caldoxylosilyticus.	98.94
N2_ae_bin.02	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Paenibacillales; f__Paenibacillaceae; g__Paenibacillus; s__Paenibacillus sp. LC231.	GCF_001860525.1	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Paenibacillales; f__Paenibacillaceae; g__Paenibacillus; s__ Paenibacillus lautus NBRC 15380.	92.09
N2_ae_bin.03	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Anoxyb acillaceae; g__Geobacillus; s__Geobacillus icigianus.	GCF_000750005.1	d__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Bacillales; f__Anoxybacillaceae; g__Geobacillus; s__Geobacillus icigianus.	96.48
N2_an_bin.01	d__Bacteria; p__Deinococcota; c__Deinococci; o__Deinococcales; f__Thermaceae; g__Thermus; s__Thermus antranikianii.	GCF_000423905.1	d__Bacteria; p__Deinococcota; c__Deinococci; o__Deinococcales; f__Thermaceae; g__Thermus; s__Thermus antranikianii.	98.47
Ескерту - GTDB-дегі ең жоғары ұқсастықта орналасқа өкіл түрдің геном нөмірі (мұнда 'GCF_' таңбасынан басталатын геномдар NCBI RefSeq60-тен алынса, 'GCA_' таңбасынан басталатын геномдар NCBI GenBank82-тан алынған) геномға жақындық шегінде болса, көрсетіледі				

SpeciesTree v. 1.6.0 [53] бағдарламасында филогенетикалық анализ 49 негізгі әмбебап COG [174] гендік топтарына жататын маркерлерін қолдану арқылы құрастырылды (сурет 13).



Тармақтардағы қызыл мәндер сол тармақтарда бөліну орынын орналастыру үшін FastTree-2 [191] қолдау мәндерін көрсетеді, мұндағы 1 көрсеткіші ең сенімді топологиялық орналастыруды білдіреді. Қызыл нүктемен типтік штамдар белгіленген

Сурет 13 - МЖГ-дың филогенетикалық орналасуы

Нәтижесінде 11 МЖГ келесі кладаларда орналасты: N1_bin.01 *Pseudomonas fluorescens*, N1_bin.02 *Fervidobacterium gondwanense*, N1_bin.03 *Caloramator australicus*, N2_bin.01 *Calditerricola satsumensis*, N2_bin.02 *Sutcliffella cohnii*, N2_bin.03 және N2_ae_bin.03 *Geobacillus icigianus*, N2_ae_bin.01 *Parageobacillus caldoxylosilyticus*, N2_ae_bin.02 *Bacillus sp.* FJAT-18019 және N2_an_bin.01 *Thermus antranikianii* бактерия түр өкілдерімен орналасса, тек N2_bin.04 МЖГ ғана өзі дара кладада орналасқан, бұл осы геномның жаңа тұқымдас болуы мүмкін екендігін көрсетті. Масштаб жолақтары, ағаштағы геномдар арасындағы аминқышқылдарын алмастыру қашықтығын геномдарда табылған бір көшірмелі әмбебап COG протеин

тізбектерінің көптік теңестіру жасау арқылы өлшенген бұтақ ұзындығы аралығын көрсетеді.

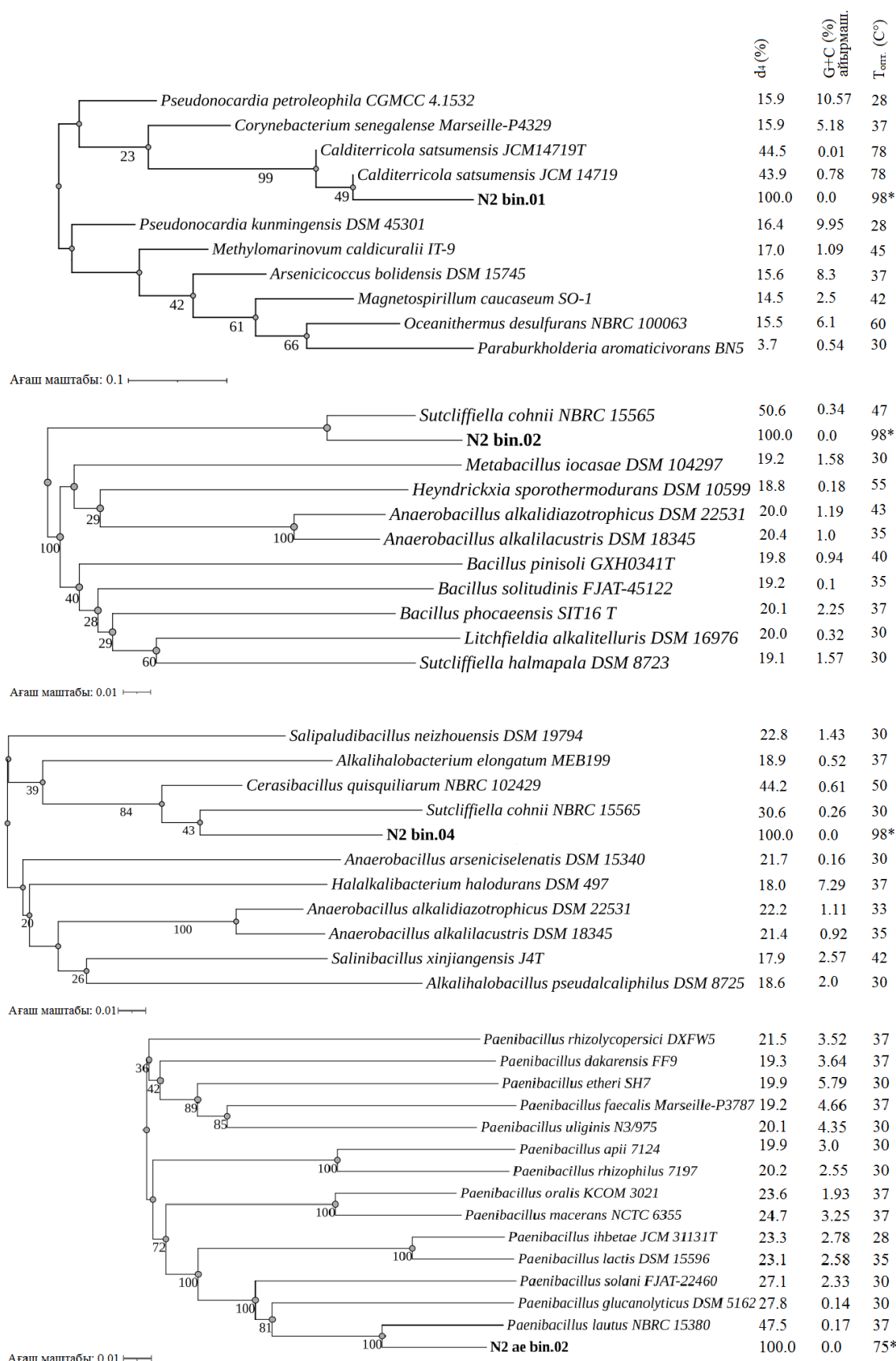
Тұтас геномға негізделген таксономиялық анализ жасау мақсатында барлық 11 МЖГ TYGS [185] бағдарламасына енгізілді (кесте 13).

Кесте 13 - 11 МЖГ-мен филогенетикалық жақын типтік-штамдардың геномдарымен жұптық салыстырудың dDDH мәндері

МЖГ-лар	Ең жақын типтік-штамдар	dDDH (d ₀ , %)	C.I. (d ₀ %)	dDDH (d ₄ , %) *	C.I. (d ₄ %)	dDDH (d ₆ , %)	C.I. (d ₆ %)	Г+Ц айырмашылығы (%)
N1_bin.01	<i>Pseudomonas fluorescens</i> L321	87.1	[83.5 - 89.9]	94.6	[93 - 95.9]	91.0	[88.4 - 93.1]	0.0
N1_bin.02	<i>Fervidobacterium riparium</i> 1445t	88.5	[85.0 - 91.2]	82.1	[79.3 - 84.7]	90.2	[87.5 - 92.4]	0.1
N1_bin.03	<i>Caloramator australicus</i> RC3	67.7	[63.8 - 71.3]	80.2	[77.3 - 82.9]	72.1	[68.6 - 75.3]	0.72
N2_bin.01	<i>Calditerricola satsumensis</i> JCM14719T	68.5	[64.6 - 72.1]	44.5	[42.0 - 47.1]	64.2	[60.9 - 67.4]	0.01
N2_bin.02	<i>Sutcliffiella cohnii</i> NBRC 15565	72.5	[68.6 - 76.3]	50.6	[48.0 - 53.3]	69.7	[66.2 - 72.9]	0.34
N2_bin.03	<i>Geobacillus icigianus</i> G1w1	65.4	[61.6 - 69.1]	72.9	[69.9 - 75.7]	68.7	[65.3 - 72.0]	1.82
N2_bin.04	<i>Cerasibacillus quisquiliarum</i> NBRC 102429	12.4	[9.8 - 15.7]	44.2	[41.7 - 46.8]	12.9	[10.6 - 15.6]	0.61
N2_ae_bin.01	<i>Parageobacillus caldoxylosilyticus</i> NBRC 107762	79.4	[75.5 - 82.9]	91.5	[89.4 - 93.3]	84.3	[81.1 - 87.1]	0.94
N2_ae_bin.02	<i>Paenibacillus lautus</i> NBRC 15380	70.8	[66.8 - 74.4]	47.5	[44.9 - 50.1]	67.2	[63.8 - 70.4]	0.17
N2_ae_bin.03	<i>Geobacillus icigianus</i> G1w1	65.3	[61.5 - 69.0]	71.5	[68.5 - 74.3]	68.4	[65.0 - 71.6]	1.36
N2_an_bin.01	<i>Thermus antranikianii</i> DSM 12462	88.2	[84.8 - 91.0]	85.3	[82.6 - 87.6]	90.5	[87.8 - 92.6]	0.01
Ескерту - Көк түспен d ₄ формуласы бойынша dDDH мәні <70% МЖГ-лар белгіленген. *d ₄ формуласы геном ұзындығына тәуелді емес, сондықтан толық емес драфт немесе МЖГ геномдарын қолдануға мүмкіндік береді								

Нәтижесінде төрт МЖГ-дың dDDH көрсеткіші 70% аз болды, оларға N2_bin.01 (d₄: 44,5%), N2_bin.02 (d₄: 50,6%), N2_bin.04 (d₄: 44,2%) және N2_ae_bin.02 (d₄: 47,5%), бұл жаңа түрлер үшін ең аз <70% [185] төмен көрсеткіш, ал бұл нәтижелер осы төрт МЖГ-дың жаңа дақылданбаған түр немесе тұқымдас өкілдері екендігін дәлелдейді және жоғарыдағы алынған нәтижелермен сәйкестік көрсетті.

dDDH мәні төмен (<70%) төрт МЖГ-дың (N2_bin.01, N2_bin.02, N2_bin.04, және N2_ae_bin.02) тұтас геномдарына негізделген филогенетикалық ағаш TYGS [185] дерекқорларындағы филогенетикалық жақын типтік штамдары негізінде құрастырылды (сурет 14).

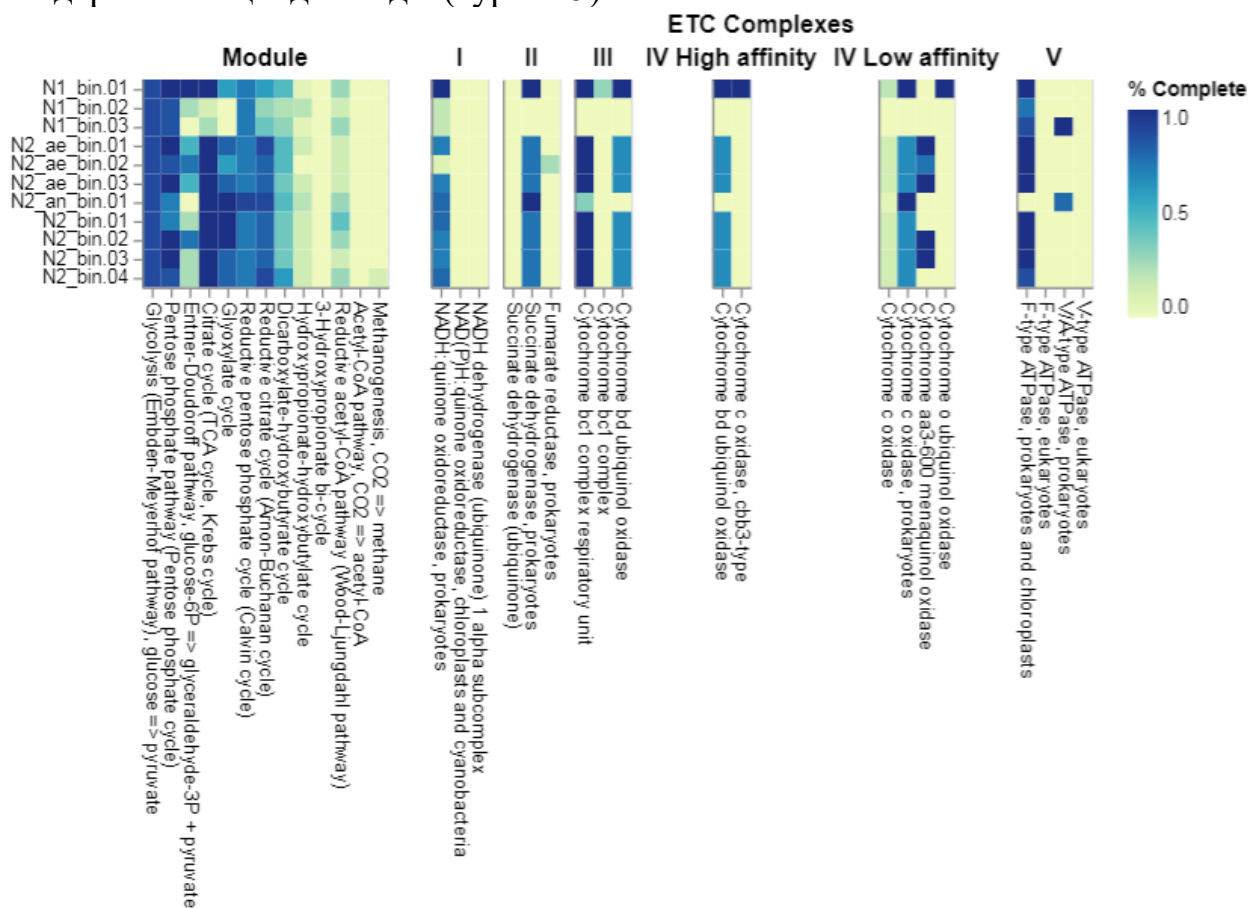


Тармақ ұзындығы GBDP d₅ қашықтық формуласы арқылы масштабталады. *N2 үлгісінен алынған МЖГ-лар үшін өсу температурасының орнына термалды су көзінің температурасы көрсетілген, N2_ae үлгісі үшін дақылдау температурасы көрсетілген

Сурет 14 - 4 МЖГ-дың тұтас геномына негізделген филогенетикалық ағаш

Тұтас геномға негізделіп құралған филогенетикалық ағаш нәтижесі бойынша N2_bin.01 бины *Calditerricola satsumensis* JCM14719^T штамымен төмен Bootstrap тірегімен және төмен dDDH мәнімен бір кластерде орналасты, N2_bin.02 және бины N2_bin.04 биндары *Sutcliffiella cohnii* NBRC 15565^T штамымен төмен Bootstrap тірегімен және төмен dDDH мәнімен бір кластерде орнықан, ал N2_ae_bin.02 бины *Paenibacillus lautus* NBRC 15380^T штамымен жоғары Bootstrap тірегін көрсетті бірақ төмен dDDH мәнін көрсетіп бір кластерде орнықты. Нәтижелерді жуықтай келе төмен ANI [190], Г+Ц, және dDDH [185] мәндері N2_bin.01, N2_bin.02, N2_bin.04, және N2_ae_bin.02 биндарының жаңа түр немесе тіпті туыстас өкілдері екендігін дәлелдей отырып, Жаркент аумағында орналасқан термалды су көздері қазіргі уақытқа дейін зерттелмеген жаңа термофильді бактериялардың көзі екендігі жайлы болжамды дәлелдейді.

Алынған МЖГ-дың функционалдық сипаттау үшін DRAM v. 0.1.2 [175] бағдарламасы қолданылды (сурет 15).

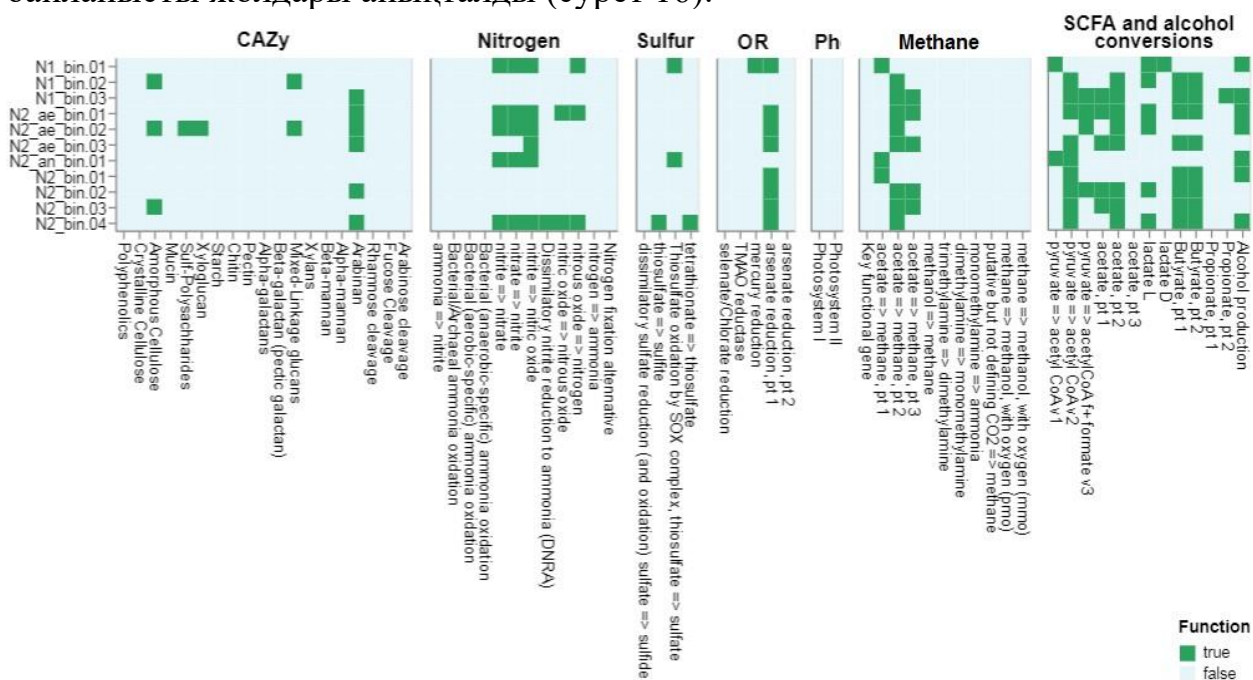


Ескерту - Сурет DRAM бағдарламасы тілінде жасалған
Жылу картасында торлардың боялу қарқындылығымен (0.0 > 1.0) көрсетілді

Сурет 15 - DRAM [175] бағдарламасында МЖГ-ды электрондық тасымалдау тізбегі кешендерінде (ETC complex) және түрлі метаболикалық жолдардың функционалдық жіктелуі

Сипаттау нәтижесінде Кребс, глиоксилат және қалпына келтіретін цитрат циклдерін (Annon-Buchanan циклі) кодтайтын гендер тоғыз МЖГ-да

11 МЖГ арасында азот материалдарын, көмірсуға белсенді фермент гендерін (CAZymes) және күкірт пен метан биогеохимиялық циклдарымен байланысты жолдары анықталды (сурет 16).



CAZy, көмірсутекті белсенді ферменттер; OR, басқа редуктазалар; Ph, фотосинтезі; SCFA, қысқа тізбекті май қышқылдары

Сурет 16 - 11 МЖГ-дың DRAM [175] бағдарламасында сипаттамасы

69

дегидрогеназаны және цитохром - С - оксидаза ферментін кодтайтын гендер табылған, 8 МЖГ-да (N1_bin.01, N2_ae_bin.01, N2_ae_bin.02, N2_ae_bin.03, N2_bin.01, N2_bin.02, N2_bin.03, N2_bin.04,) цитохром bc1 кешенінің тыныс алу бірлігі, цитохром bd, убихинон оксидаза кодтайтын гендер табылды. Бұл ақуыздарда тыныс алу мен Кребс циклына қатысын дәлелдейді [193], N1_bin.02, N1_bin.03 МЖГ-да осы ақуыздардың болмауы оларды анаэробты термофилдер тобына жататындығын көрсетеді. 10 МЖГ-да (N1_bin.01, N1_bin.02, N1_bin.03, N2_ae_bin.01, N2_ae_bin.02, N2_ae_bin.03, N2_bin.01, N2_bin.02, N2_bin.03, N2_bin.04,) F-типті АТФаза-ны кодтайтын гендердің болуы олардың протон градиентінен АТФ түзу [194] қабілеттілігінің бар екендігін көрсетеді.

4 жаңа МЖГ-да (N2_bin.01, N2_bin.02, N2_bin.04, N2_ae_bin.02) потенциалды CAZymes тобына кіретін ферменттердің бар жоғы dbCAN2 HMMs of CAZy families v. 1.9.1 [195] бағдарламасында HMMER әдісімен ген сәйкестіктері бойынша анықталды (кесте 14).

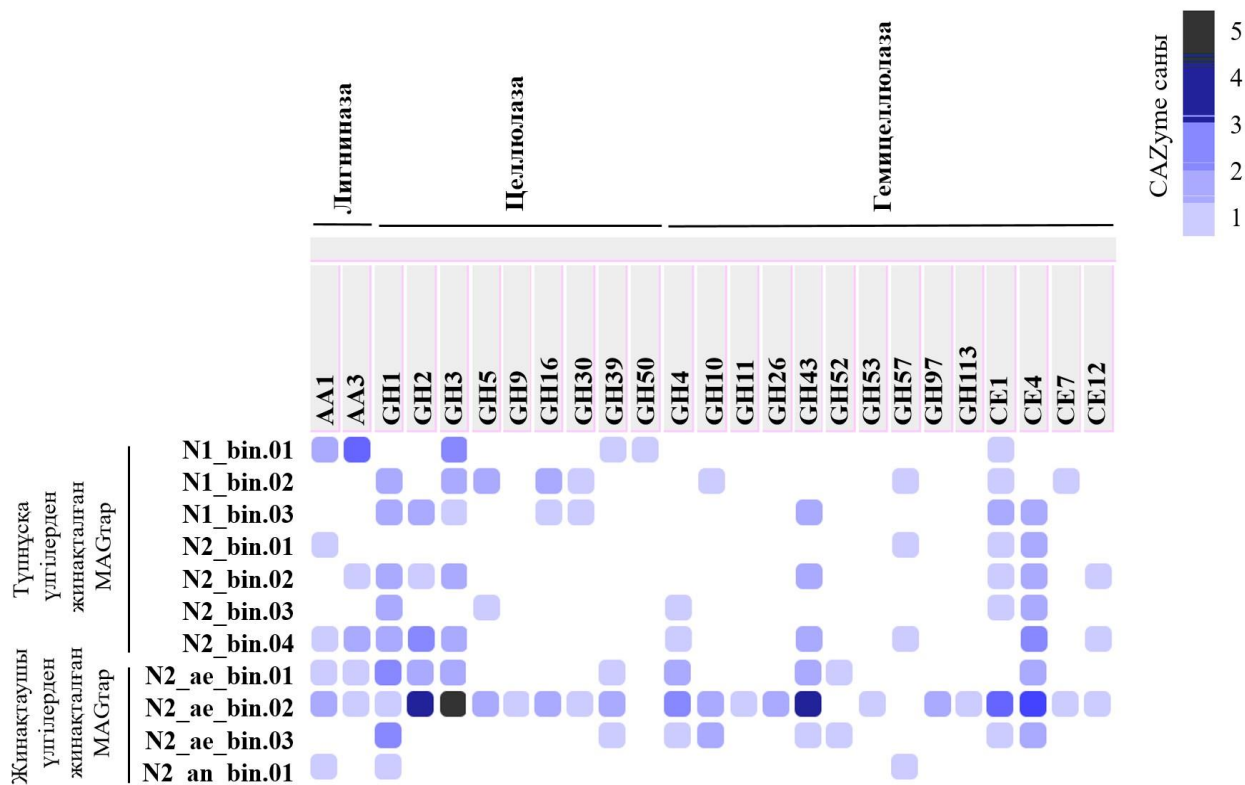
Кесте 14 - МЖГ-мен кодталған CAZyme топтары

CAZymes классы	N2_bin.01	N2_bin.02	N2_bin.04	N2_ae_bin.02
CAZyme топтары				
GH*	13 (1, 2, 12, 14, 20, 21, 23, 31, 36, 37, 39, 41), 15, 18, 23, 57, 133,	1, 2, 3, 13 (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 18, 28), 31, 32, 38, 43 (3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 31, 34, 36), 66, 85, 105, 109, 125, 171	1, 2, 3, 4, 13 (1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 39, 40, 41), 18, 28, 31, 32, 33, 36, 43 (3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 31, 34, 36), 57, 65, 68, 91, 94, 105, 109	1, 2, 3, 4, 5 (4, 9, 22, 25, 37, 46, 47, 54), 8, 9, 10, 11, 13 (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 39, 40, 41), 16 (3, 4, 5, 6, 8, 21, 25), 18, 19, 20, 23, 26, 28, 29, 30 (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9), 31, 32, 35, 36, 38, 39, 42, 43 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36), 51, 53, 63, 65, 67, 73, 76, 78, 79, 85, 87, 88, 92, 93, 94, 95, 97, 105, 106, 109, 113, 123, 125, 126, 127, 130, 136, 140, 146, 154, 161, 171
GT*	4, 5, 26, 27, 28, 51	2, 4, 5, 26, 27, 28, 35, 51	2, 4, 5, 6, 8, 35, 51, 84, 101	1, 2 (2, 3), 4, 5, 6, 8, 35, 51, 108
CBM*		34,	34	6, 9, 12, 22, 32, 34, 35, 38, 46, 51, 56, 61, 66, 67, 77
CE*	1, 4, 14	1, 4, 8, 9, 12	4, 8, 9, 12, 14, 19	1, 4, 7, 8, 9, 12, 14, 19
PL*			38	1 (2), 6 (1, 2), 7 (5), 8 (1, 3), 9 (2), 11 (1, 2), 12 (1), 15 (1), 26, 33 (1, 2), 35, 38
AA*	1 (2, 3), 6	3, 6	1 (2, 3), 3 (1, 2, 3)	1 (3), 3, 7, 10
Белгілер: GH, гликозидті гидролаза; GT, гликозилтрансфераза; CBM, көмірсуларды байланыстыру модулі; CE, көмірсутекті эстераза; PL, полисахарид-лиаза; AA, көмекші көмірсу-активті оксидоредуктаза				

МЖГ-лар dbCAN2 [195] бағдарлама нәтижесі бойынша 218 болжамды CAZymes кодтайды, бұл барлық ақуызды кодтайтын гендердің 4,5%-ы сәйкес

келеді. Ең көп CAZymes гендерін кодтайтын болжамды ақуыздар N2_ae_bin.02 МЖГ-ға тиесілі болды.

Алынған барлық МЖГ-дың биомассаны ыдырату потенциалын толық түсіну үшін CAZyme-ге [196] кіретін лигниназа, целлюлаза және гемицеллюлаза ферменттердің топтары талданды (сурет 17).



Мұндағы ақшыл (аз) көктен күңгір қара түске боялу (көп), МЖГ-да табылған гендердің санын көрсетеді; AA, көмекші көмірсу-активті оксидоредуктаза; GH, гликозидті гидролаза; CE, көмірсутекті эстераза

Сурет 17 - Мақсатты домендер (лигниназа, целлюлаза және гемицеллюлаза) отбасыларының гендік идентификациясының жылу картасы

Энергияның жалғыз көзі ретінде полисахаридтермен өсірілген жинақтаушы метагеномынан жинақталған МЖГ-лар бақылау ретінде пайдаланылды. CAZyme топтарының салыстырмалы көптігі бойынша қарастырғанда, N2_ae_bin.02 МЖГ басқа МЖГ-ға қарағанда GH2, GH3 (β -глюкозидаза (EC 3.2.1.21)) және GH43 (Эндо- α -1,5-арабинаназа (EC 3.2.1.99)) гендерінің салыстырмалы жоғарлығымен ерекшеленді. Бұл үш гликозилгидролазалар целлюлоза мен гемицеллюлозаны ыдырататын белсенділіктері үшін маңызды CAZyme тобы болып табылады. Сонымен қатар, N2_ae_bin.02 МЖГ-ның құрамында лигнинназа, целлюлаза және гемицеллюлаза ыдырататын ферменттерінің негізгі топтарды қоса алғанда 25-тен 22 CAZymes топтары бар болды. Жинақтаушы метагеномдарынан таңдалған 25 CAZyme тобы ішінен N2_ae_bin.01 МЖГ-да 10, N2_ae_bin.03 МЖГ-да 8 және N2_an_bin.01 МЖГ-да ең аз 3 сәйкестік анықталған. Түпнұсқа метагеномынан жинақталған МЖГ-ға келетін болсақ: N2_bin.02

және N1_bin.03 МЖГ-да 25-тен 8 CAZyme, ал N1_bin.01 МЖГ-да 6, N2_bin.03 МЖГ-да 5, N2_bin.01 МЖГ-да не бары 4 CAZyme топтары кездесті. Салыстырмалы ең көп CAZyme-дер N2_bin.04 МЖГ-да 10 және N1_bin.02 МЖГ-да 9 анықталды.

dbCAN2 [195] бағдарламасының шығыс деректері талданған МЖГ-лар геномдарында, сонымен қатар, лакказа (AA1; EC 1.10.3.2) және ацетилксиланэстераза (CE1, CE4; EC 3.1.1.72) гендеріне сәйкестіктер анықталды, олар лигнин құрамды және басқа да күрделі биомассаны деградациялау үшін қолданыс табуы мүмкін және теренірек зерттелуі тиісті. Байланыстырушы домендерге арналған көмірсуларды байланыстыру модулдері (CBM) МЖГ-дың биомассаны деградациялаудың жоғары потенциалын көрсетті.

Метагеномика қазір әртүрлі орталарда [33], соның ішінде ыстық бұлақтарда [1, 197, 198] жаңа және ықтимал маңызды биокатализаторларды ашуда кеңінен қолданылады. Геотермиялық аймақтар – бірегей экстремозимдер мен биомолекулалардың пайдалы көздері болып табылатын термофилдердің таңдамалы мекендеу ортасы болып табылады. Термозимдер жоғары температурада тұрақты және белсенді болып қалуға бейімделген, ол өз кезегінде оларға биокаталитикалық өндіріс операцияларына айтарлықтай үлес қосуға мүмкіндік береді. Бұл олардың беріктігімен, жоғары температурада субстраттың жоғары ерігіштігін қамтамасыз ету қабілетімен, жүйенің ластану қаупінің төмендеуімен, сондай-ақ тұтқырлықтың төмендігімен және араластырғыштығының жоғарылауымен байланысты [22, 199]. Қазіргі уақытта биотехнологияның көмегімен 500-ден астам өнім өндіріледі және 150-ге жуық өндірістік процесс микробтардан алынған катализаторларға негізделген [10]. Сонымен қатар, өндірісте 3000-нан астам белгілі ферменттер қолданылады; олардың шамамен 65%-ы крахмал жуу ұнтағы, қағаз және целлюлоза өнеркәсібінде қолданылатын гидролазалар, ал 25%-ы тамақ өнеркәсібінде қолданылады [86]. Зерттеулер көрсеткендей, экстремофильді микроорганизмдердің әртүрлілігі бұрын есептелгеннен жоғары болуы мүмкін [2]. Әдебиетке шолу нәтижелері бойынша, бұл зерттеу Қазақстанның оңтүстік-шығыс аймағында орналасқан Жаркент геотермалдық ыстық су көздерінде мекендейтін бактериялар қауымдастығының әртүрлілігін классикалық және қазіргі заманғы молекулалық әдістер арқылы көрсетілген алғашқы зерттеу болып табылады. Метагеномикалық анализ көптеген бактериялық таксондарды және бактериялардың күшті басымдылығын анықтады. Сонымен қатар, Архей доменінің өкілдерінің шағын тобы ыстық су көздерінің үлгілерінен табылды (~0,03%). Бұл басқа геотермалды су көздерін зерттеулердің нәтижелеріне сәйкес келмейді, өйткені архейлер мұндай ыстық геотермиялық ортада басым болып келеді. Мысалы, Тибеттегі 10 ыстық су көздерінің филогенетикалық анализы тиісті үлгілерде архейлердің >50% болуын анықтады [200]. Басқа зерттеу Чхаттисгарх, Үндістан, Сургужа ауданындағы Таттапани аймағының геотермалды су қоймаларындағы термофилді микробтық қауымдастыққа

анализ жалған [197]. Мұнда судың температурасы 55-98°C аралығында болады және зерттеу нәтижелері >4,8% архейдің бар екенін көрсеткен.

Өте жоғары температуралы орталарды әдетте хемолитоавтотрофты термофильді бактериялар мекендейді, олардың көпшілігін Архейлер мен *Aquificae* құрайды. Дегенмен, Жаркент ыстық бұлағында ең көп таралған түрлер *Paenibacillus*, *Geobacillus* және *Bacillus* тұқымдастары болды. Бұл ортада *Bacillales* жасақтарының көп болуы экстремофильді бациллалардың көпшілігінің спора түзу қабілетіне байланысты [78]. Дегенмен, бұл микробтар жай ғана тірі қалып қоймай, керісінше қарқынды көбейіп келеді, яғни Жаркент геотермалды сулары осы микробтық қауымдастықтың бірегей көзі болып табылады.

Метагеномикалық зерттеулер CAZymes топтарының функционалдық белсенділіктерін геномдық болжамдармен байланыстыру үшін мәліметтер базасын одан әрі кеңейтуге үлкен үлес қосады. Одан бөлек зерттелмеген түрлі тіршілік орталары мен таксондарға назар аудару нәтижесінде, биомассаны тиімдірек түрлендіру үшін биомассаны өнеркәсіптік өндеуге көмектесетін жаңа немесе әлдеқайда тиімді CAZymes-ді ашуда метагеномика әдісі үлкен рөл атқарады. Осы кезекте *Proteobacteria* (1 МЖГ), *Thermotogota* (1 МЖГ), *Firmicutes* (7 МЖГ), *Bacillota* (1 МЖГ) және *Deinococcota* (1 МЖГ) типтеріне жататын 11 бактериялық МЖГ-ды метагеномдардан жинақтап алынды. Олардың функционалдық сипаттау нәтижесінде 11 МЖГ арасында азот материалдары, көмірсуге белсенді фермент гендерін (CAZymes) және күкірт пен метан биогеохимиялық циклдарымен байланыстыратын жолдар анықталды (сурет 17). Бұл осы микроорганизмдердің қоршаған ортадағы заттардың айналымында потенциалды рөлдерін көрсетеді. Сәйкесінше МЖГ-лар N1 және N2 үлгілерінен бөлініп алғандықтан, Жаркенте орналасқан термалды су экожүйесінің бірегейлігін және осы геотермалды суларда тіршілік ететін ықтимал жаңа микроорганизмдердің биомассаны жоғары деградациялау қасиетін көрсетеді. Сонымен қатар атап кеткен дәлелдерге қосымша төмен ANI [190], dDDH [185] ұқсастық дәрежелері және метагеномнан жинақталған төрт жаңа МЖГ-лар қосымша дәлелденді.

3.2 Термофильді микроорганизмдерді оқшаулау. Олардың сипаттамасы және филогенетикалық анализі

Зерттеу барысында, Жаркент геотермалды су көздерінде тіршілік ететін бактериялардың өнеркәсіптік биотехнология үшін жоғары қызығушылық тудыратын белсенді ферменттердің көзі болып табылатындығы метагеномика әдісімен болжанып анықталды. Жиналған үлгілерден (N1, N2) ферментативті белсенділігі жоғары термофильді бактериялардың жаңа штамдарын/түрлерін табу мақсатында барлығы 50-ден астам термофильді бактерия изоляттары бөлініп алынды. Солардың ішінде 3-уі факультативті анаэробты бактерия болса, басым бөлігі аэробты болып анықталды. Үлгілерден бөлініп алынған изоляттардың 64% астамы облигатты термофильді бактерияларға тән өседі (65-79°C аралығында оптималды

көбейеді) және инокуляциядан кейін 12-24 сағат аралығында көбеюге қабілетті болды. Қалған изоляттардың 36% жуығы қарапайым термофильді бактериялар болып анықталды (50-64°C аралығында оптималды көбейеді). Олар инокуляциядан кейін 18-24 сағат аралығында көбеюге қабілетті. Изоляттардың көпшілігі рН көрсеткіші 4,0 пен 10,0 аралығында және NaCl концентрациясы 0-6% диапазонында оптималды өсті. Сонымен қатар изоляттардың басымы температура және рН көрсеткіштерінің кең диапазонында өсуге қабілеттілігін көрсетті.

N1 және N2 үлгілерінен бөлініп алынған 16 ферментативті белсенділігі жоғары штамдардың 16S рРНҚ генінің реттілігі анықталды. Өңделген нуклеотидер тізбегін GenBank дерекқорында орналасқан тізбектермен салыстыру арқылы, нәтижесінде 96-100%-ға дейінгі аралықта ұқсастық көрсетті (кесте 15).

Кесте 15 - N1 және N2 үлгілерінен бөлініп алынған штамдардың тізімі және 16S рРНҚ ген тізбектерінің BLAST нәтижелері

Үлгі нөмірі	Штамм нөмірлер	GenBank нөмірі	Тізбек ұзындығы (нж)	Ең жақын сәйкестік	Ең жақын сәйкестікке ұқсастық %
N1	3SAk6	OR755649	1478	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i> DSM 22626 ^T	99.5
	3SAk7	OR755650	1031	<i>Anoxybacillus karvacharensis</i> K1 ^T	99.6
	3SAk8	OR755651	1471	<i>Anoxybacillus gonensis</i> G2 ^T	99.5
	3SAk9	OR755652	1481	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> G10	99.4
	3SAk10	OR755653	1482	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> TS13	99.6
	ZKZ2	OR351227	1452	<i>Polycladomyces abyssicola</i> JIR-001 ^T	99.1
	KAk	OQ843466	1463	<i>Caldanaerobacter tengcongensis</i> MB4 ^T	98.6
N2	3SAk1	MW485510.2	1472	<i>Geobacillus kaustophilus</i> NBRC 102445 ^T	99.5
	3SAk2	MW485512.1	1474	<i>Geobacillus lituanicus</i> N-3 ^T	99.7
	3SAk3	MW485515.1	1475	<i>Geobacillus lituanicus</i> N-3 ^T	99.6
	3SAk4	MW485516.2	1471	<i>Geobacillus lituanicus</i> N-3 ^T	99.8
	3SAk5	MW485517.2	1473	<i>Geobacillus kaustophilus</i> NBRC 102445 ^T	99.3
	3Wak1	MW485511.2	1470	<i>Geobacillus lituanicus</i> N-3 ^T	99.7
	3Wak2	MW485513.2	1472	<i>Geobacillus lituanicus</i> N-3 ^T	99.8
	3Wak3	MW485514.2	1470	<i>Geobacillus kaustophilus</i> NBRC 102445 ^T	99.5
	SAk	OR755661	1459	<i>Caldicellulosiruptor acetigenus</i> DSM 7040 ^T	96.9

16S рРНҚ гені бойынша барлық анықталған штамдар 5 тұқымдасқа жататыны анықталды. Атап айтқанда: *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Polycladomyces*, *Caldicellulosiruptor* және *Caldanaerobacter* өкілдері болды. Бұлардың ішінде үш тұқымдас *Geobacillus*, *Anoxybacillus* және *Polycladomyces* өзара отбасы деңгейінде жақын болды. Жалпы үлгілерден 8 *Geobacillus*, 5 *Anoxybacillus*, 1 *Polycladomyces*, 1 *Caldicellulosiruptor* және 1 *Caldanaerobacter* штамдары анықталды. Барлық штамдардың секвенирленген 16S рРНҚ гендері GenBank дерекқорында тіркеліп нөмірлері тағайындалды [158].

3.2.1 N1 үлгісінен бөлініп алынған микроорганизмдердің сипаттамасы
Anoxybacillus spp. штамдары. N1 үлгісінен бөлініп алынған 3SAk6, 3SAk7, 3SAk8, 3SAk9 және 3SAk10 штамдарын оқшаулау 65°C температурасында жүргізілді. Штамдардың колониялары 12-24 сағат аралығында өсіп, мөлшері 0,9-8,0 мм-ге дейін аралықта болды. Колониялар пішіні, түсі, құрылымы және жиектері бойынша ерекшеленді (кесте 16).

Кесте 16 - N1 үлгісінен бөлініп алынған 5 штамның колония өсу ерекшеліктері және морфологиясы

Штамдар	3SAk6	3SAk7	3SAk8	3SAk9	3SAk10
Өсу температурасы (°C) аралығы оптимум	40–75	40–75	45–73	40–70	45–70
	70	70	70	68	65
Өсу pH мәні аралығы оптимум	5–10	5–10	5–10	5–10	5–10
	7.2	7.2	7.0	7.1	7.4
Оксидаза	+	+	v*	+	+
Факультативті анаэроб	+	+	+	+	+
Облигатты анаэроб	-*	-	-	-	-
Колониялардың морфологиялық және құрылымдық әртүрлілігі: Мөлдірлігі Консистенциясы Пішіні Жиегі Рельефті Түсі	Мөлдір	Мөлдір	Мөлдір	Мөлдір	Мөлдір
	Шырышты	Шырышты	Құрғақ	Шырышты	Шырышты
	Дөңгелек	Амеба тәрізді	Амеба тәрізді	Амеба тәрізді	Амеба тәрізді
	Тегіс емес	Тегіс емес	Тегіс емес	Тегіс емес	Тегіс емес
	Тегіс	Тегіс	Дөңес	Тегіс	Тегіс
	Мөлдір	Ақ – кілегей түстес	Сары	Ақ – кілегей түстес	Ақ – кілегей түстес
*Белгілер: v, өзгерінкі; +, оң; -, теріс					

16 кесте нәтижелері бойынша барлық 5 түрлі штамда каталаза, оксидаза реакциясы оң болды, қозғалғыштық және анаэробты ортада өсуге қабілеттілік көрсетпеді. Олар pH 5-10 және температурасы 40-75°C (оптимум 65-70°C) аралығында өсуге қабілетті болды. Соның ішінде 3SAk6, 3SAk7 және 3SAk8 штамдары өздерінің жоғары термофильділіктерімен ерекшеленді (кесте 16). Оның үстіне бұндай жоғары температурада өсу қазіргі уақытта белгілі *Anoxybacillus* тұқымдастарының ішінде байқалмаған [201]. Бұл олардың жаңа жоғары термофильді штамм болу мүмкіндігін болжамдайды.

1 тәулік бойы өсірілген штамдардың дақылдары API 50CHB жолақтарында 49 түрлі қосылыстың ассимиляциясы мен ашыту қабілеттіліктеріне тексерілді (кесте 17).

Кесте 17 - N1 үлгісінен бөлініп алынған 5 *Anoxybacillus spp* штамдарының API 50 CH жолақтарындағы ассимиляциялау профильдері

Көмірсулар*	Штамдар				
	3SAk6	3SAk7	3SAk8	3SAk9	3SAk10
Глицерин	-*	±	-	-	+

17 - кестенің жалғасы

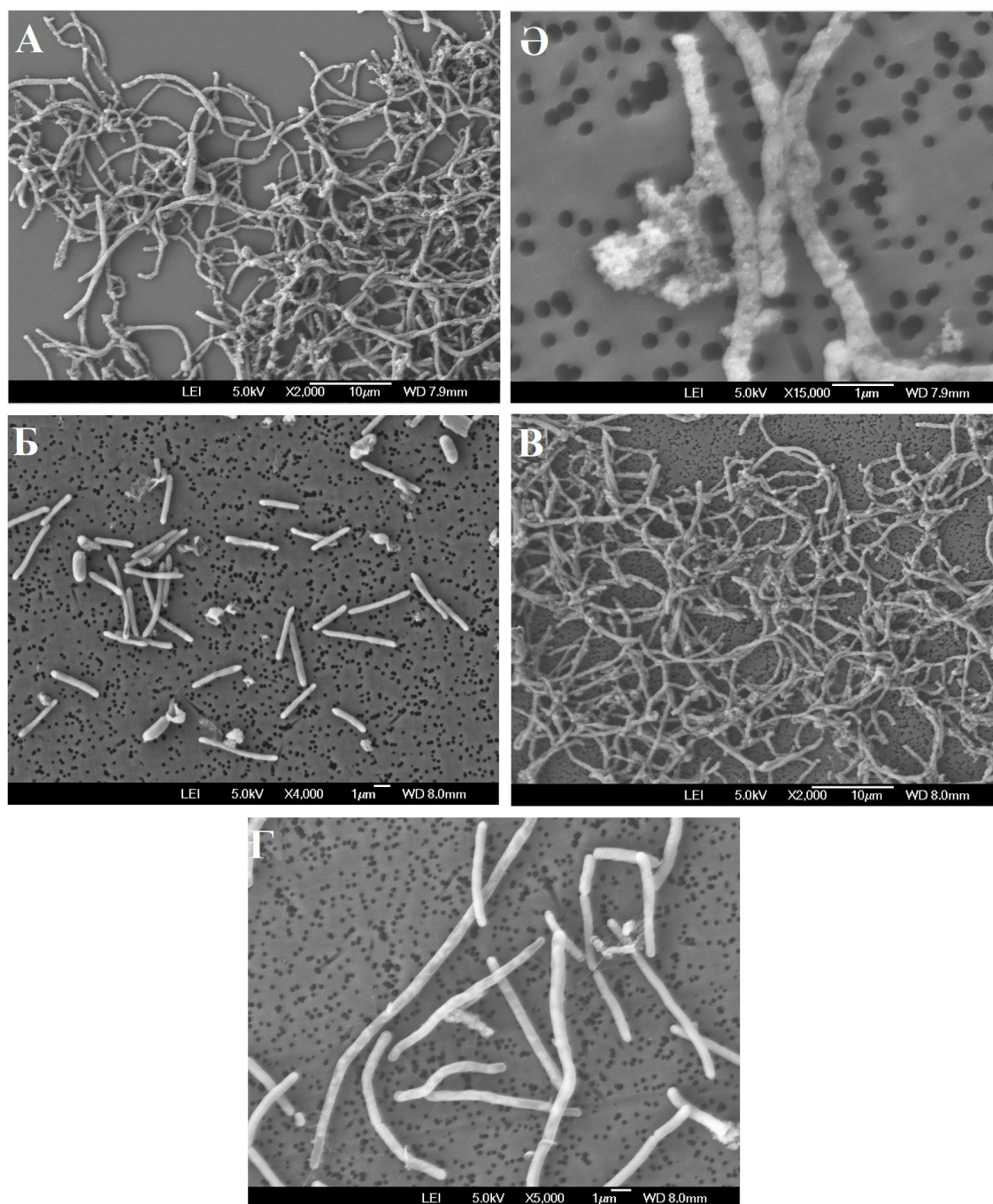
Эритритол	-	±	-	-	-
D-арабиноза	-	+	-	-	-
L-арабиноза	-	+	-	-	-
Рибоза	+	-	+	+	+
D-ксилоза	-	-	-	-	-
L-ксилоза	-	-	-	-	-
Адонитол	-	-	-	-	-
Метил-D-ксилопиранозид	-	-	-	-	-
Галактоза	-	-	-	-	-
D-глюкоза	+	-	+	-	+
D-фруктоза	+	±	+	+	+
D-манноза	-	-	+	-	+
L-сорбоза	+	v	+	v	-
Рамноза	-	-	-	-	v
Дульцитол	-	-	-	-	-
Инозитол	-	-	-	-	-
D-маннитол	+	+	+	-	+
D-сорбит	-	-	-	-	-
Метил-D-маннопиранозид	-	-	-	-	-
Метил-D-глюкопиранозид	+	-	+	-	-
N-ацетилглюкозамин	+	-	-	-	-
Амигдалин	+	-	+	-	+
Арбутин	-	-	-	-	-
Эскулин	+	+	+	+	+
Салицин	-	-	-	-	+
D-целлобиоза	+	-	+	-	+
D-мальтоза	+	-	+	-	+
D-лактоза	+	-	-	-	+
D-мелибиоза	-	-	-	-	-
D-сахароза	v*	-	+	-	+
D-трегалоза	+	-	+	+	+
Инулин	-	-	-	-	+
D-мелезитоза	+	-	+	-	±
D-раффиноза	+	-	+	-	+
Крахмал	+	-	+	-	+
Гликоген	-	-	-	-	±
Ксилит	-	-	-	-	-
Гентиобиоз	-	-	-	-	-
D-тураноза	+	-	+	+	+
D-ликсоза	+	+	-	-	±
D-тагатоza	+	+	+	-	+
D-фукоза	-	-	-	-	-
L-фукоза	-	-	-	-	-
D-арабитол	+	-	-	-	-
L-арабитол	+	-	-	-	-
Глюконат	-	-	-	-	-
2-кетоглюконат	-	-	-	-	-
5-кетоглюконат	-	-	-	-	-

*Белгілер: v, өзгерінкі; +, оң; -, теріс; ±, әлсіз оң;

Барлық 5 штамм фенотиптік әртүрлілікті, көрсетіп бір-бірінен ерекшеленді, мысалы *Anoxybacillus* 3SAk10 штамы 49 көмірсудың ішінен 19 көмірсуды ассимиляцияласа *Anoxybacillus* 3SAk6 штамы 21 көмірсуды ассимиляциялауға қабілетті болды. Барлық штамдар эскулинен қышқыл түзе алды, бірақ тестіленген штамдардың ешқайсысы D-ксилоза, L-ксилоза,

адонитол, метил-D-ксилопиранозид, галактоза, дульцитол, инозитол, D-сорбит, метил-D-маннопиранозид, арбутин, D-мелибиоза, ксилит, гентиобиоз, D-фукоза, L-фукоза, глюконат, 2-кетоглюконат, және 5-кетоглюконат көмірсуларынан қышқыл түзбеді.

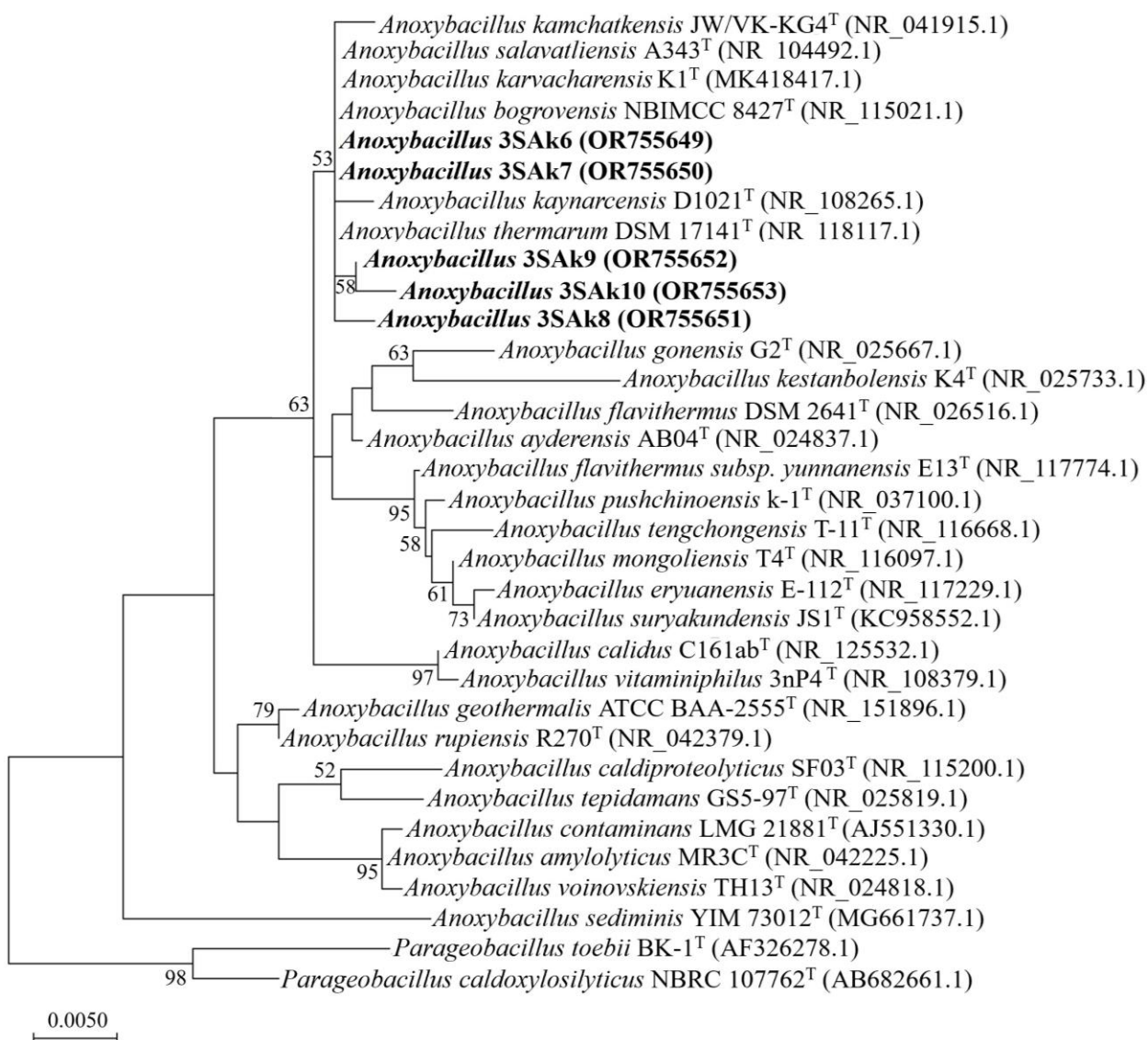
Сонымен, *Anoxybacillus* тұқымдасына жататын барлық 5 штамдардың жасушалары электронды микроскопия суреттерінде *Bacillaceae* отбасысына тән морфологияға сәйкес келетін қысқа және ұзын келген жасушалар, кейде оларда сәл қисық және дөңес ұштары болғандығы байқалды (сурет 18).



A: 3SAk6; Б: 3SAk7; В: 3SAk8; Г: 3SAk9; Д: 3SAk10. Масштаб: 1 және 10 мкм аралығында

Сурет 18 - Сканерлеуші электронды микроскоп көмегімен жасалған штамдардың суреттері

3SAk6, 3SAk7, 3SAk8, 3SAk9 және 3SAk10 штамдарының өңделген 16s рРНҚ генінің нуклеотидер тізбегін BLASTn бағдарламасымен теңестіру нәтижесі 99,4-99,6% аралығында сәйкестік көрсетті. Ең жоғары ұқсастық 3SAk7 штамы және *Anoxybacillus karvacharensis* K1^T бактерия арасында байқалып 99.6% тен болды. *Anoxybacillus* түрлерінің типтік штамдарымен және осы жұмыста бөлініп алынған 5 *Anoxybacillus* spp штамдары арасында құрастырылған филогенетикалық ағашы оларды 3 кластерге топтастырды (сурет 19).

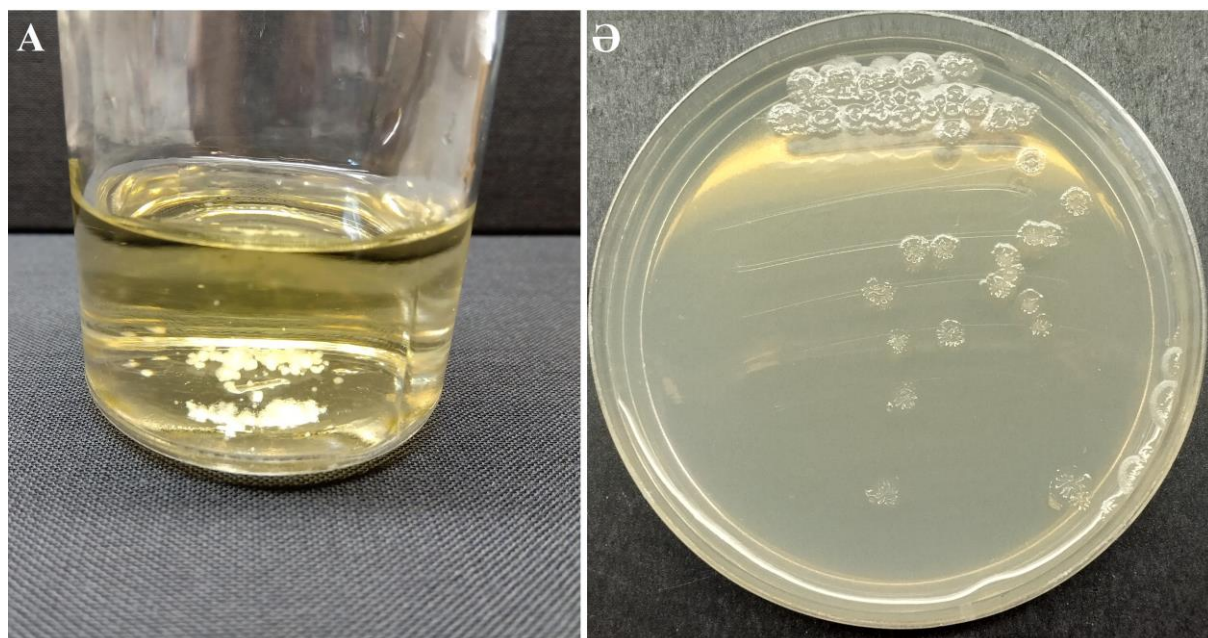


Тіркеу нөмірлері жақшада берілген. Bootstrap мәндері (>50%) тармақтарда пайызбен көрсетіледі. Ағаш maximum-likelihood әдісімен құралған. Сыртқы топ ретінде *Parageobacillus caldxylosilyticus* NBRC 107762^T (AB682661.1) және *Parageobacillus toebii* BK-1^T (AF326278.1) пайдаланылды

Сурет 19 - *Anoxybacillus* түрлерінің типтік штамдарымен және N1 үлгісінен бөлініп алынған 5 *Anoxybacillus* spp штамдарының (қалын қаріппен) 16S рРНҚ генінің тізбегі негізінде құрылған филогенетикалық ағаш

Anoxybacillus bogrovensis айналасында тығыз топтастырылған өте ұқсас *Anoxybacillus* 3SAk6 және *Anoxybacillus* 3SAk7 штамдары жоғары Bootstrap тірегімен орнықты, бұл осы екі штамның осы түрге жататынын дәлел бола алады, сол кезде *Anoxybacillus* 3SAk8, *Anoxybacillus* 3SAk9 және *Anoxybacillus* 3SAk10 штамдары жекелей клада құрды. Бұл 3SAk8, 3SAk9 және 3SAk10 штамдарының *Anoxybacillus* тұқымдасының жаңа өкілдері болуы мүмкіндігін көрсетеді.

Polycladomyces ZKZ2 штамы. N1 үлгісінен бөлініп алынған ZKZ2 штамы 70°C температурада (24 сағат) R2A агар қоректік ортасында өсіру нәтижесінде бөлініп алынды. R2A агар қоректік ортасында ZKZ2 штамының колониялары дөңгелек пішінді, беткейі кедір-бұдыр, жиегі тегіс емес, ақ түсті болды. Колония консистенциясы құрғақ және бактерия колониялары R2A агар қоректік ортасына жабысып өсіп, кейінірек радиалды қыртыстар қалыптастыратыны анықталды. Сұйық қоректік ортада өсіргенде флокуленттік жасушаларды құрай өсті (сурет 20).



А) R2A қоректік ортасында 24 сағатт өсіруден кейін; Б) R2A агар қоректік ортасына өскен колониялар

Сурет 20 - *Polycladomyces* ZKZ2 штамының колониялары және пигментациясы

Polycladomyces ZKZ2 штамы келесі қоректік орталарда өсуге қабілетті: R2A агар; СМС агары; ISP 2; Spirit Blue агары; декстроза крахмал агары; Майсыздандырылған сүт агары; сұлы агары; қоректік агар; және глицерин аспарагинді агар. ZKZ2 Грам оң және каталаза теріс болды. *Polycladomyces* ZKZ2 шатмы аэробты жағдайда 55-75°C (оптимум 65-70°C) аралығында және рН көрсеткіші 6,5-тен 8-ге (оптимум рН 7-7,5) дейінгі концентрацияда өсуге қабілеттілік көрсетті (кесте 18).

Кесте 18 - *Polycladomyces* ZKZ2 штамының және басқа *Polycladomyces* түрлерінің дифференциалды фенотиптік сипаттамалары

Ерекшелік	*1	*2	*3
Грам реакциясы	+	+	+
Спора түзу қабілеті	+	+	+
Қозғалғыштық	-	-	-
Ауа мицелиің түзу қабілеті	+	+	+
Субстрат мицелиін түзу қабілеті	+	+	+
Колония түсі	Ақ	Кілегей түстес	Ақ
Өсу уақыты (күндер)	1	7	1
Өсу температурасы (°C)			
Аралығы	55-75	55-73	45-65
Оптимум	65-70	55-60	50-55
Өсу pH көрсеткіші			
Аралығы	6,5-8,5	6,5-8,5	5,0-8,0
Оптимум	7,0-7,5	7,0-8,0	6,0-7,0
Крахмал гидролизі	+	-	-
Төмендегі қосылыстарды қорыту қабілеті:			
Казеин	+	+	+
Глюкоза	+	+	+
Сахароза	+	-	+
D-Рибоза	+	+	-
D-Ксилоза	+	-	-
L-Арабиноза	+	-	-
D-Фруктоза	+	-	+
D-Рафиноза	+	±	-
D-Сорбитол	-	±	±
D-Лактоза	-	±	-
Галактоза	v	+	=
Глицерол	+	+	+
Рамноза	+	±	-
Аланин	+	+	+
D-Маннитол	+	+	-
D-Манноза	+	+	+
D-Трегалоза	+	+	+
Глицин	+	+	-
Аспарагин	+	+	+
Аргинин	+	+	+
Рафиноза	+	-	±
Лактоза	-	-	±
D-целлобиоза	+	-	-
Мальтоза	+	-	+
D-галактоза	-	v	+
*Белгілер: v, өзгерінкі; +, оң; -, теріс; ±, әлсіз оң; 1, <i>Polycladomyces</i> ZKZ2 (осы зерттеу деректері); 2, <i>Polycladomyces abyssicola</i> JIR-001T [202]; 3, <i>Polycladomyces subterraneus</i> KSR13T (осы зерттеу деректері) [203]			

18 кестеде көрсетілгендей *Polycladomyces* ZKZ2 штамы жақын түрлерінен оптималды өсу температурасымен (65-70°C), D-Ксилоза, L-Арабиноза, D-целлобиоза көмірсуларын ассимиляциялауға және крахмал гидролиздеуге қабілетті болды.

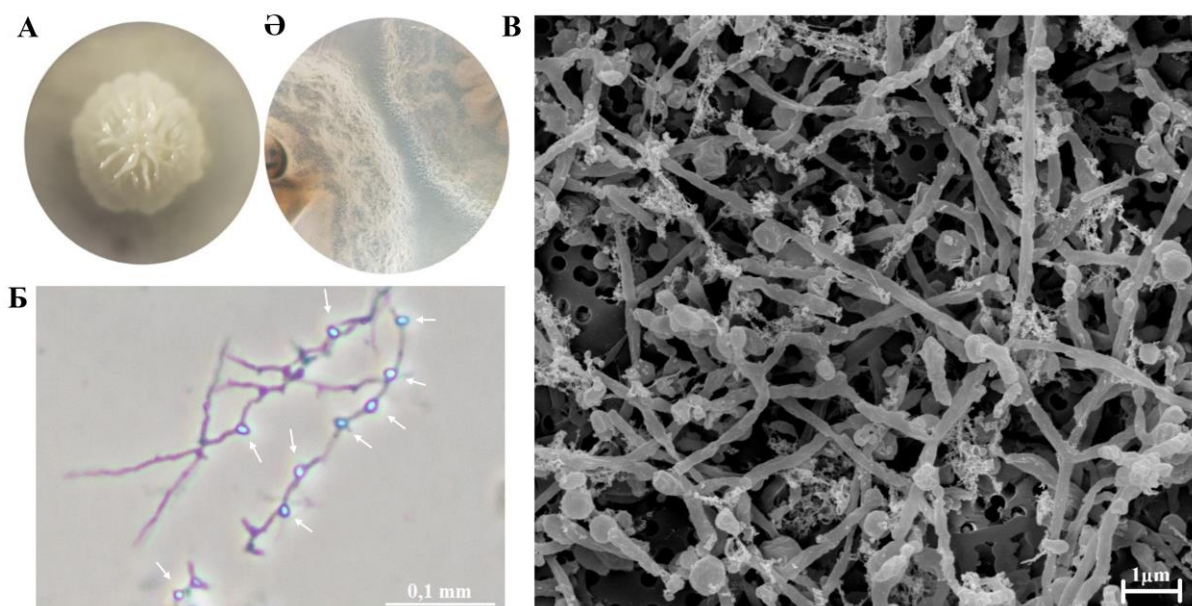
Polycladomyces ZKZ2 штамының түрлі көмірсуларды ассимиляциялау мүмкіндігі API 50 СНВ жолақтары көмегімен бағаланды (кесте 19), ZKZ2 штамы 49 көмірсудың 22 ассимиляциялауға қабілетті болды.

Кесте 19 - *Polycladomyces* ZKZ2 штамының API 50 CH тесті бойынша нәтижелері

Көмірсулар	ZKZ2*
Глицерин	+
Эритритол	-
D-арабиноза	-
L-арабиноза	+
Рибоза	+
D-ксилоза	+
L-ксилоза	-
Адонитол	-
Метил-D-ксилопиранозид	-
Галактоза	v
D-глюкоза	+
D-фруктоза	+
D-манноза	+
L-сорбоза	-
Рамноза	+
Дульцитол	-
Инозитол	-
D-маннитол	+
D-сорбит	-
Метил-D-маннопиранозид	-
Метил-D-глюкопиранозид	+
N-ацетилглюкозамин	-
Амигдалин	±
Арбутин	-
Эскулин	+
Салицин	+
D-целлобиоза	+
D-мальтоза	+
D-лактоза	-
D-мелибиоза	+
D-сахароза	+
D-трегалоза	+
Инулин	-
D-мелезитоза	+
D-раффиноза	+
Крахмал	+
Гликоген	-
Ксилит	-
Гентиобиоз	±
D-тураноза	+
D-ликсоза	±
D-тагатоза	±
D-фукоза	-
L-фукоза	-
D-арабитол	-
L-арабитол	-
Глюконат	-
2-кетоглюконат	-
5-кетоглюконат	+
*Белгілер: v, өзгерінкі; +, оң; -, теріс; ±, әлсіз оң.	

Фазалық-контрасты микроскопия көмегімен зерттеу барысында ZKZ2 штамының жасушалары ұзын, тік, жиі шағын толқынды иректері байқалды

(сурет 21, А, Ә, Б), сонымен қатар жасушаларда мицелий түзу, пигментация және жасуша қозғалғыштығы анықталды (сурет 21, Б).



Ақ жебелермен эндоспоралар көрсетілген

Сурет 21 - 24 сағат бойы R2A қоректік ортасында 75°C температурада өсірілген *Polycladomyces* ZKZ2 штаммының фазалық-контрасты (А, Ә, Б) және электронды микроскопия кескіндері (Ә)

Электронды микроскопия кесікіндерінде штамм жасушаларының жіп тәрізді тармақталған ауа мицелийлерімен қоса споралары байқалды (сурет 21, В). *Polycladomyces* ZKZ2 штамында жасушалық май қышқылдары *P. abyssicola* JIR-001^T штаммының профиліне ұқсастығын көрсетті (кесте 20).

Кесте 20 - *Polycladomyces* ZKZ2 штаммының жасушалық май қышқылдарының құрамы және ұқсас *Polycladomyces* тұқымдасына жататын жақын типтік штамдары

Май қышқылы	ZKZ2*	JIR-001 ^T *	KSR13 ^T *
C _{14:0}	1.57	0.52	1.8
C _{15:0}	4.69	-	-
C _{16:0}	13.99	4.74	6.1
C _{17:0}	1.56	-	0.2
C _{18:0}	0.46	-	0.1
C _{15:0} ^{2OH}	-	-	0.1
C _{15:1} ^{ω6c}	-	-	0.2
C _{16:1} ^{ω5c}	-	-	0.5
C _{17:1} ^{ω6c}	-	-	0.2
C _{18:1} ^{ω9c}	-	-	0.3
iso-C _{17:1} ^{ω9c}	-	1.56	-
iso-C _{13:0}	-	-	0.2
iso-C _{14:0}	0.52	1.03	1.4
iso-C _{15:0}	29.18	33.50	50.1
iso-C _{16:0}	16.32	22.54	9.0
iso-C _{17:0}	26.67	28.11	9.8

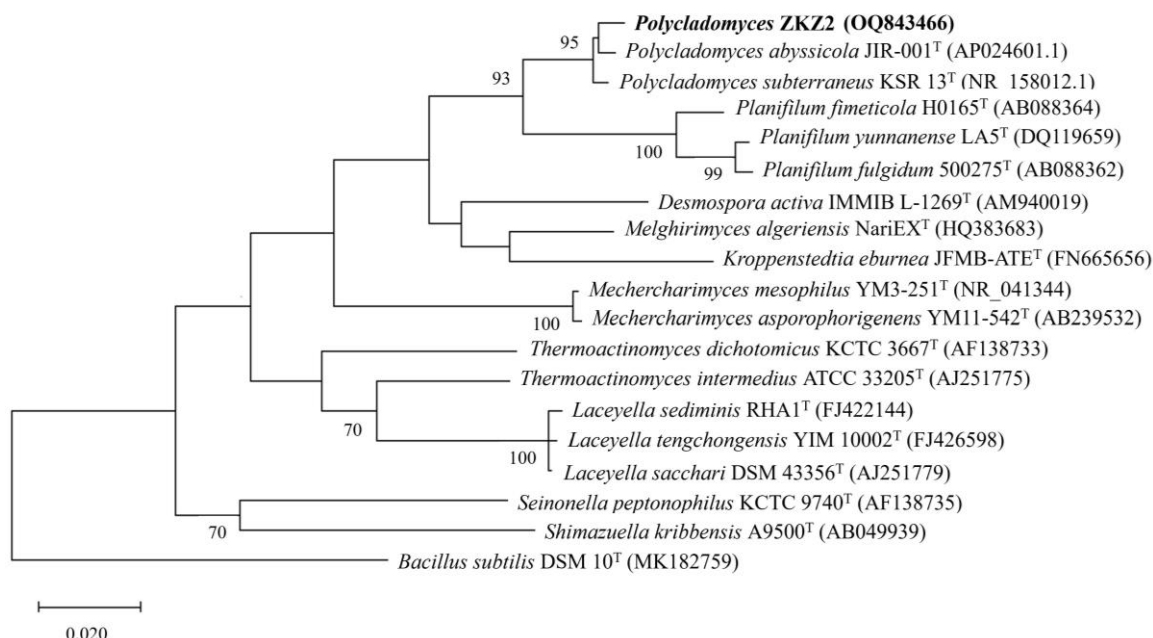
20 - кестенің жалғасы

<i>iso-C_{18:0}</i>	0.50	0.63	-
<i>iso-C_{16:0}</i> H	-	1.52	1.3
<i>iso-C_{18:0}</i> H	-	0.46	-
<i>iso-C_{18:0}</i> H	-	-	0.1
<i>anteiso-C_{15:0}</i>	1.50	0.79	7.7
<i>anteiso-C_{17:0}</i>	3.02	1.11	3.6
<i>anteiso-C_{17:0}</i> ^{ω9c}	-	-	0.5

*Белгілер: Май қышқылдарының негізгі компоненттері (> 10%) қою шрифтпен көрсетілген; -, анықталмаған. ZKZ2 (осы зерттеу деректері); *P. abyssicola* JIR-001^T; *P. subterraneus* KSR13^T; Мәндер % түрінде берілген, олар жалпы май қышқылдарының көлемінен әрбір штамға көрсетілген.

20 кестеде көрсетілгендей негізгі май қышқылдарына *iso-C_{15:0}* (33,50%), *iso-C_{17:0}* (28,11%) және *C_{16:0}* (22,54%) жатты, ал *P. subterraneus* KSR13^T штамының май қышқылдары ZKZ2 штамынан мүлде өзгеше болды.

BLASTn бағдарламасы көмегімен GenBank дерекқорларында іздеу нәтижесінде ZKZ2 штамының ең жақын түрлері болып 99,18% *P. abyssicola* JIR-001^T және 99,3% *P. subterraneus* KSR 13^T типтік штамдары анықталды. Сәйкесінше *Polycladomyces* ZKZ2 штамы, *P. abyssicola* JIR-001^T, *P. subterraneus* KSR13^T және *Thermoactinomycetaceae* тұқымдасының кейбір өкілдері арасындағы филогенетикалық ағаш құру нәтижесінде ZKZ2 штамы *Polycladomyces* түрлерінің өкілдерімен топтасып *P. abyssicola* JIR-001^T типтік штамымен бір кластерде орналасты, бұл олардың 16S рРНҚ гендерінің жоғары ұқсастығын және ZKZ2 штамын *Polycladomyces* тұқымдасына жататынын көрсетті (сурет 22).

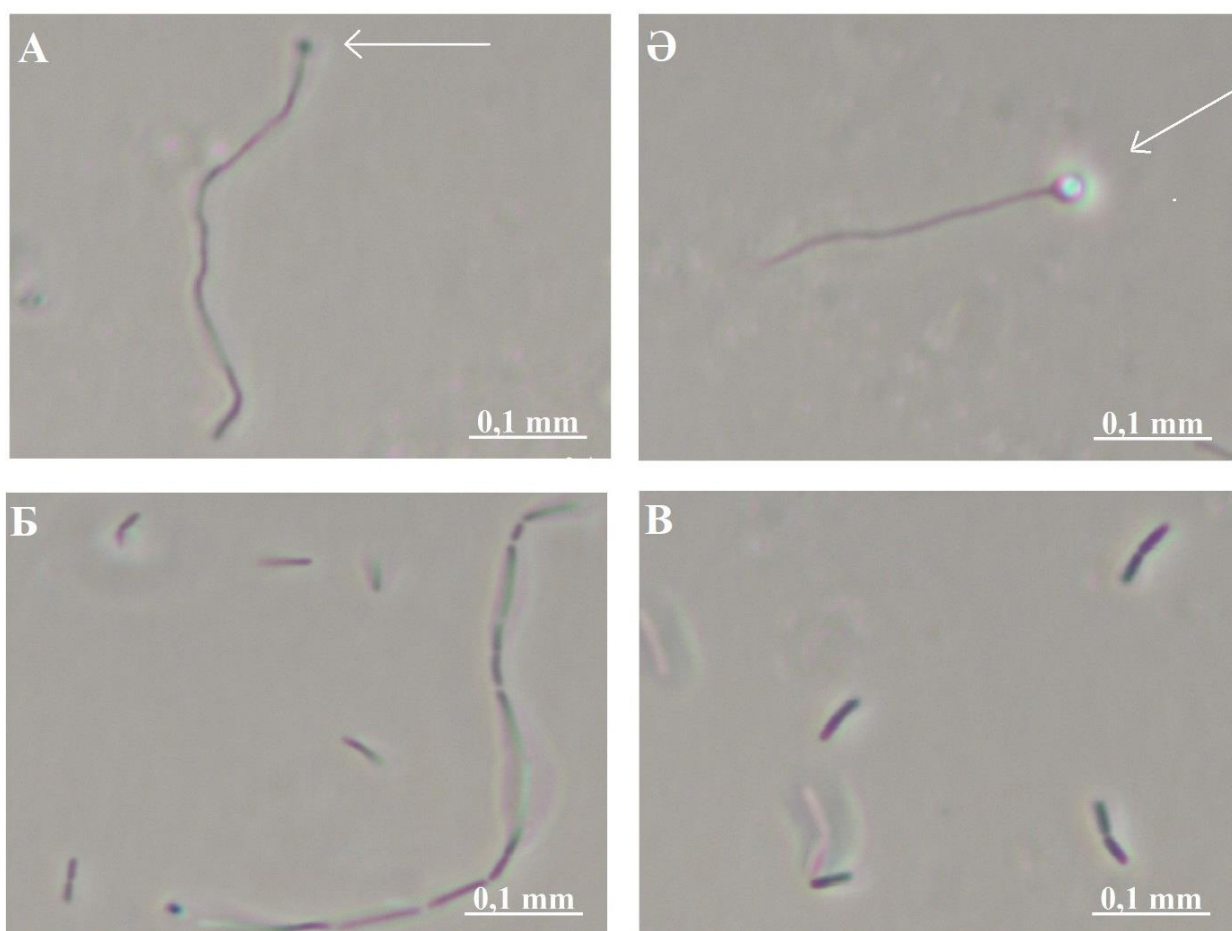


Тіркеу нөмірлері жақшада берілген. Bootstrap мәндері (>70%) тармақтарда пайызбен көрсетіледі. Ағаш maximum-likelihood әдісімен құралған. Сыртқы топ ретінде *Bacillus subtilis* DSM10^T (MK182759) пайдаланылды

Сурет 22 - *Thermoactinomycetaceae* тұқымдастарының типтік штамдары бар және ZKZ2^T штамының 16S рРНҚ генінің тізбектеріне негізделген филогенетикалық ағаш

Caldanaerobacter KAk штаммы. КАк штаммы анаэробты жағдайда N1 үлгісінің жинақтаушы дақылынан бөлініп алынды. Инкубация 48 сағат 70°C температурасында тауық жүні қосылған модификацияланған MMF қоректік ортасында жүргізілді. КАк штаммы таза дақылы сериялық сұйылту әдісімен алынды.

Штамның анаэробты жағдайда жасалған тығыз қоректік ортада колония түзуге қабілетсіз, Грам оң және тек оттегісіз ортада ғана көбеюге қабілетті болды. Жасушалары дара, жұп, сирек тізбектеліп орналасқан (0.1-0.9 мм) және көмірсу қосылған MMF қоректік ортада өсіргенде спор түзілуі байқалмады (сурет 23, Б, В), егер қоректік ортаға көмірсу орнына негізгі субстрат ретінде тауық қауырсынын қосатын болсақ, онда жасушаларының пішіні өзгереді, олар жіп тәріздес болды (0,3-0,7 мм), және споралар байқалды (сурет 23, А, Ә).

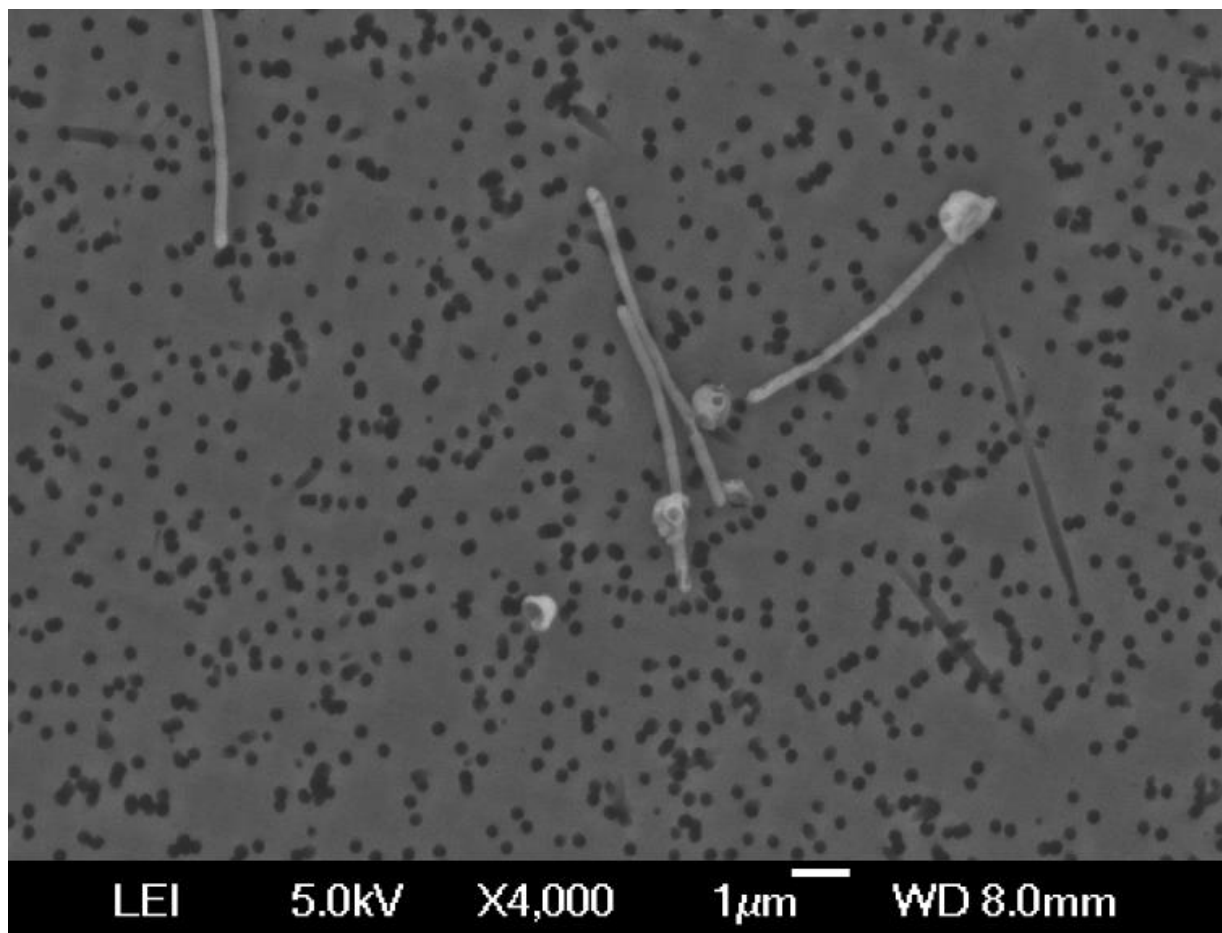


А, Ә тауық қауырсыны қосылған MMF қоректік ортада өсірілген жасушалар, және Б, В глюкоза қосылған MMF ортасында өсірілген жасушалар (инкубация температурасы 70°C). Тауық қауырсыны қосылған қоректік ортада өскен жасушалардың жарық сынбайтын (А) және сынғыш (Ә) споралары ақ жебемен көрсетілген. Глюкоза қосылған қоректік ортада өскен жасушалар көбіне бір-бірден, жұппен (Б) немесе сирек тізбектеліп (В) орналасқан. Масштаб: 1 мкм

Сурет 23 - КАк штаммының фазалық-контрасты микроскопия кескіндері

Споралар штамм жасушасының бір шетінен орналасып пішіні домалақ терминалды болып келеді. Фазалық-контрасты микроскоппен қарағанда кейбір спораларға жарық сынса (сурет 23, Ә) кейбіреулерінде ондай қасиет

байқалмады (сурет 23, А). Электронды микроскопия кесікіндерінде, КАк штамның *Bacillaceae* тұқымдасына тән морфологияға сәйкес ұзындығы 6-15 микрон аралығында келген жұп немесе дара жасушалары байқалды (сурет 24).



Сурет 24 - Сканерлеуші электронды микроскопта КАк штамының кескіні

КАк анаэробты жағдайда 55-85°C температура (оптимум 65-70°C) аралығында және рН көрсеткіші 4,5-9,0 дейінгі аралықта өседі (кесте 21).

Кесте 21 - КАк штамының және басқа белгілі *Caldanaerobacter* түрлерінің дифференциалды фенотиптік сипаттамалары

Ерекшелік	*1	2	3	4	5	6	7
Жасуша морфологиясы	Таяқшалар дара, жұп, сирек тізбек/жіп тәріздес	Таяқшалар, жалғыз немесе жұптастырылған	Таяқшалар	Таяқшалар	Таяқшалар, жалғыз, жұп немесе шынжырлаған	Таяқшалар	Бұтақталған таяқшалар
Спора түзуге қабілеттілік	+	+	-	-	-	+	-
Грам реакциясы	+	+	+	+	-	+	+

21 - кестенің жалғасы

Қозғалғыштық	-	-	-	-	-	+	-
Өсу температура сы (°C)							
Аралығы	55-85	50-75	40-75	40-80	50-80	50-85	50-80
Оптимум	65-70	68-70	65	65-75	75	75	70
Өсу pH көрсеткіші							
Аралығы	4,5-9,0	4,8-8,0	6,0-8,5	5,7-9,2	5,5-9,0	4,5-9,0	5,8-7,6
Оптимум	7,0	6,8	7,5	7,0-7,5	7,0-7,5	6,5	6,8-7,2
Ашытқы экстрактін өсу факторы ретінде	+	+	+	+	+	+	v
пептон	v	+	±	+	±	+	+
триптон	+	±	±	±	±	+	±
D-рибоза	±	-	+	-	-	±	±
D-фруктоза	-	+	+	+	+	+	+
D-галактоза	+	+	+	+	+	+	+
мелибиоза	+		+	+	±	±	±
целлюлоза	±	±	±	±	-	-	±
ксилан	+	±	+	+	-	-	±
пируват	±	+	+	+	-	±	+
API 20A:							
L-триптофан	-	v	±	±	±	±	±
Несепнәр	-	±	±	±	±	±	±
D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
D-маннитол	+	-	+	+	+		
D-лактоза	+	+	+	+		+	+
D-сахароза	+	+	-	-	-	+	-
D-мальтоза	+	+	+	+	+	+	+
салицин	+	±	±	±	±	±	±
D-ксилоза	+	+	+	+	-	+	
L-арабиноза	+	+	-	-	-	-	
желатин	+	±	±	±	±	-	±
эскулин темір цитраты	+	±	±	±	±	±	±
глицерин	+	±	+	+	-	±	±
D-целлобиоза	+	+	+	+	+	+	+
D-манноза	+	+	+	+	+	+	
D-мелезитоза	+	±	±	±	±	±	±
D-раффиноза	+	-	±	±	±	±	±
D-сорбитол	+	+	±	±	±	-	±
L-рамноза	+	-	-	-	±	±	±
D-трегалоза	+	+	±	±	±	±	±
Глюкозаның ашыту өнімдері:							
этанол	+	+	+	-	-	+	-
ацетат	±	+	+	+	+	+	+
лактат	±	+	+	+	+	+	-
H ₂ S	+	±	±	-	±	+	±

*Белгілер: v, өзгерінкі; +, оң; -, теріс; ±, әлсіз оң; КАк штамы; 2, *Caldanaerobacter uzonensis* K67^T [204]; 3, *Caldanaerobacter subterraneus* DSM 13054^T 4 [205], *C. subterraneus subsp. subterraneus* DSM 13054^T; 5, *C. subterraneus subsp. tengcongensis* JCM 11007^T [206]; 6, *C. subterraneus subsp. yonseiensis* DSM 13777^T [207]; 7, *C. subterraneus subsp. pacificus* DSM 12653^T [208]

КАк штамының 20 түрлі қосылыстарды пайдалану мүмкіндігін анықтау АРІ 20 А жолақтарымен тестіленді (кесте 21), штамм 20 қосылыстың 18-ін ыдыратуға қабілетті болса, солардың ішінде тек L-триптофан және несепнәр КАк штамымен ыдыратуы байқалмады. Барлық штамдар D-глюкозаны, D-мальтозаны, D-целлобиозаны, D-галактозаны және ашытқы экстрактын энергия көзі ретінде қолдана алады. Бірақ ешқайсысы сульфат, сульфит немесе нитратты электрон акцепторлары ретінде қолданбайды.

КАк штамында жасушалық май қышқылдарының анықтау нәтижелері 22 кестеде көрсетілген.

Кесте 22 - КАк штамның жасушалық май қышқылдарының профайлы

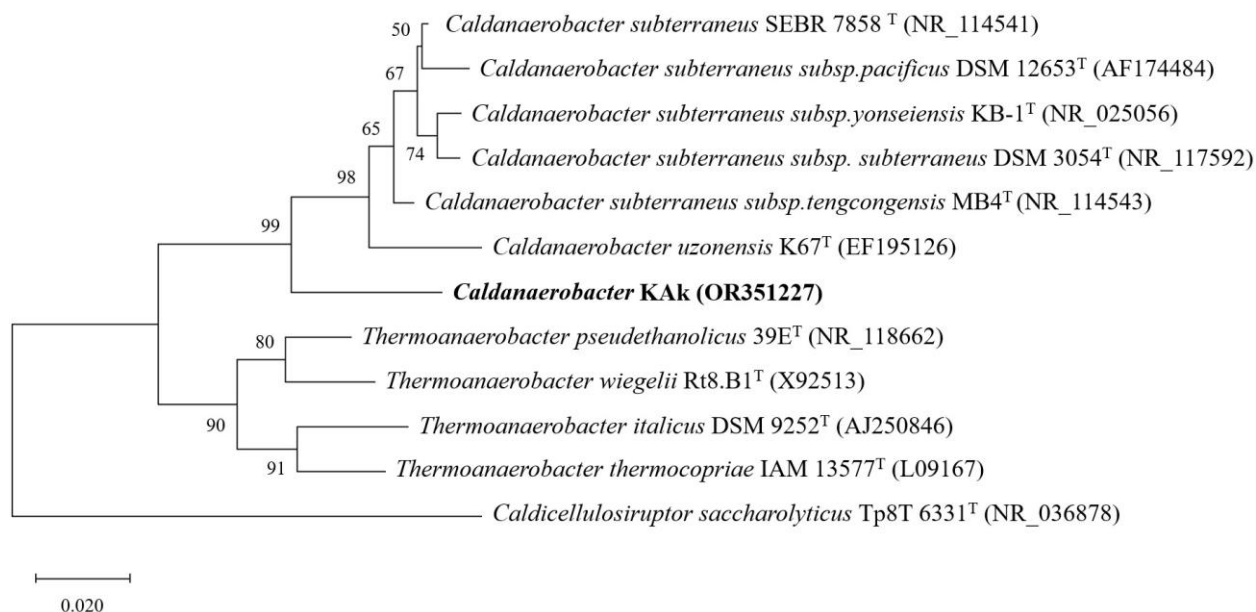
Май қышқылы	КАк
C _{12:0}	0,54
C _{14:0}	5.25
C _{14:0} ^{DMA}	0.78
C _{15:0}	0.37
C _{15:0} ^{ANTEISO}	4.11
C _{16:0}	10.22
C _{17:0}	-
C _{18:0}	0.55
C _{14:0} ^{2OH}	0.51
C _{15:0} ^{2OH}	-
C _{15:1} ^{ω6c}	-
C _{16:1} ^{ω5c}	-
C _{17:1} ^{ω6c}	-
C _{18:1} ^{ω9c}	-
iso-C _{11:0}	0.58
iso-C _{17:1} ^{ω9c}	-
iso-C _{13:0}	0.90
iso-C _{14:0}	-
iso-C _{15:0}	52.37
iso-C _{15:0} ^{DMA}	7.12
iso-C _{16:0}	-
iso-C _{17:0}	7.71
iso-C _{18:0}	0.50
iso-C _{16:0} H	-
iso-C _{18:0} H	-
iso-C _{18:0} H	-
anteiso-C _{15:0}	4.11
anteiso-C _{17:0}	1.77
anteiso-C _{17:0} ^{DMA}	1.10
anteiso-C _{17:0} ^{ω9c}	-
Ескерту - Май қышқылдарын MMF қоректік ортасында 70°C температурада 48 сағат бойы өсірілген стационарлық фазалық жасушалардан алынды. Май қышқылдарының негізгі компоненттері (> 5%) қою шрифтпен көрсетілген; -, анықталмаған	

Негізгілеріне C_{16:0} (10,22%), iso-C_{15:0} (52,37%), iso-C_{15:0}^{DMA} (7,12%) және iso-C_{17:0} (7,71%) май қышқылдары жатса, аз мөлшерде C_{12:0}, C_{18:0}, C_{14:0}^{2OH}, iso-C_{11:0} және iso-C_{18:0} май қышқылдары кездесті.

КАк штамының 16S рРНҚ (1452 ж.н) ген тізбегін BLASTn бағдарламасы көмегімен GenBank дерекқорларында белгілі реттіліктерге сәйкестендірілген кезде, КАк штамының нуклеотид тізбегіне *C. subterraneus* штамдарына

жақындығы анықталды. KАк штамы мен *C. subterraneus subsp. tengcongensis* DSM 15242^T штамы арасындағы 16S рРНҚ ген тізбегінің ұқсастығы 98,5% құраса, басқа осы түр іші штамдарымен алшақтығы 1-1,5% аралығында болды.

KАк штамының 16S рРНҚ генінің тізбегіне негізделген филогенетикалық ағаш MEGA X бағдарламасымен жүзеге асырылды (сурет 25).



Тіркеу нөмірлері жақшада берілген. Bootstrap мәндері тармақтарда пайызбен көрсетіледі. Ағаш maximum-likelihood әдісімен құралған. Сыртқы топ ретінде *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* Trp8T 6331^T (NR_036878) пайдаланылды

Сурет 25 - 16S рРНҚ генінің тізбектеріне негізделген *Thermoanaerobacteraceae* отбасысының түрлерінің типтік штамдары бар және KАк штамының филогенетикалық ағашы

KАк штамы басқа *Caldanaerobacter* штамдарымен топтастырылды, дегенмен оның басқа *Caldanaerobacter* типтік штамдарынан қашықтықта жеке клада құрып орналасуы KАк штамының жаңа түр немесе түр іші екенін көрсетеді.

3.2.2 N2 үлгісінен бөлініп алынған микроорганизмдердің сипаттамасы

Geobacillus spp. штамдары. 8 *Geobacillus* тұқымдасының өкілдері (3SAk1, 3SAk2, 3SAk3, 3SAk4, 3SAk5, 3WAk1, 3WAk2, 3WAk3) штрих әдісімен қоректік агар ортасында таза дақылдары алынды. Байыту және оқшаулау 65°C, 70°C және 75°C температураларында жүргізілді. Колониялар 12-24 сағат инкубация аралығында өсіп дамып, мөлшері 0,9-8,0 мм дейін аралықта болды. Штамдардың колониялары бір бірінен пішіні, түсі, құрылымы және жиектері бойынша ерекшеленді (кесте 23).

Кесте 23 - 8 *Geobacillus* spp. штамдарының колония морфологиясы және өсу ерекшеліктері

Изоляттар	3Wak1	3Wak2	3Wak3	3SAk1	3SAk2	3SAk3	3SAk4	3SAk5
Өсу температурасы (°C) аралығы оптимум	40-85	40-85	45-85	40-85	45-85	45-85	45-85	40-85
	65	65	75	65	70	70	75	65
Өсу pH мәні аралығы оптимум	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10	5-10
	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
Оксидаза	+	+	+	+	+	-	+	+
Колониялардың морфологиялық және құрылымдық әртүрлілігі: Мөлдірлігі	Мөлдір	Мөлдір	Мөлдір	Мөлдір	Мөлдір	Мөлдір	Мөлдір	Мөлдір
	Құрғақ	Шырышты	Шырышты	Құрғақ	Шырышты	Құрғақ	Шырышты	Құрғақ
Консистенциясы	Амеба тәрізді	Дөңгелек	Дөңгелек	Амеба тәрізді	Дөңгелек	Дөңгелек	Амеба тәрізді	Дөңгелек
Пішіні	Тегіс емес	Тегіс	Тегіс	Тегіс	Тегіс	Тегіс емес	Тегіс	Тегіс
Жиігі	Дөнес	Дөнес	Тегіс	Тегіс	Тегіс	Тегіс	Дөнес	Дөнес
Рельефті	Кілегей түстес	Ақ кілегей түстес	Кілегей түстес	Ақ	Кілегей түстес	Ақ кілегей түстес	Ақ кілегей түстес	Ақ
Түсі								
*Белгілер: +, оң; -, теріс								

Барлық колониялар жартылай мөлдір, консистенциясы шырыштан құрғаққа дейін, біркелкі емес немесе дөңгелек пішінді, каталаза реакциясын оң, қозғалғыш және спора түзуге қабілетті болды. Бірақ H₂S тестіне теріс реакция көрсетті. Штамдар pH 5-10 (оптимум pH 7,4) және 40 пен 85°C температура (оптимум 65-75°C) диапазоны аралығында өсуге қабілетті болды. 3Wak3 және 3SAk4 штамдары басқаларына қарағанда ең жоғары өсу температурасын көрсетті, оптимум температура 75°C және максималды температурасы 85°C тең болды. 3SAk2 штамынан басқа барлық штамдарда оксидаза ферментіне оң нәтиже көрсетті. Штамдардың ешқайсысы анаэробты жағдайда өсіп көбеюге қабілеттілік көрсетпеді.

Штамдардың тәуліктік дақылдарын API 50CHB жолақтарында 49 түрлі қосылыстың ассимиляциясы мен ашыту қабілетіліктеріне тексеру нәтижелері бойынша олардың профильдерінде фенотиптік әртүрліліктері бар екендігі белгілі болды (кесте 24).

Кесте 24 - N1 үлгісінен бөлініп алынған штамдардың API 50 CH жолақтарында ассимиляциялау профильдері

Көмірсулар	Штамдар							
	3SAk1	3SAk2	3SAk3	3SAk4	3SAk5	3Wak1	3Wak2	3Wak3
Глицерин	+	±	+	+	+	+	+	-
L-арабиноза	+	-	-	-	-	+	-	-

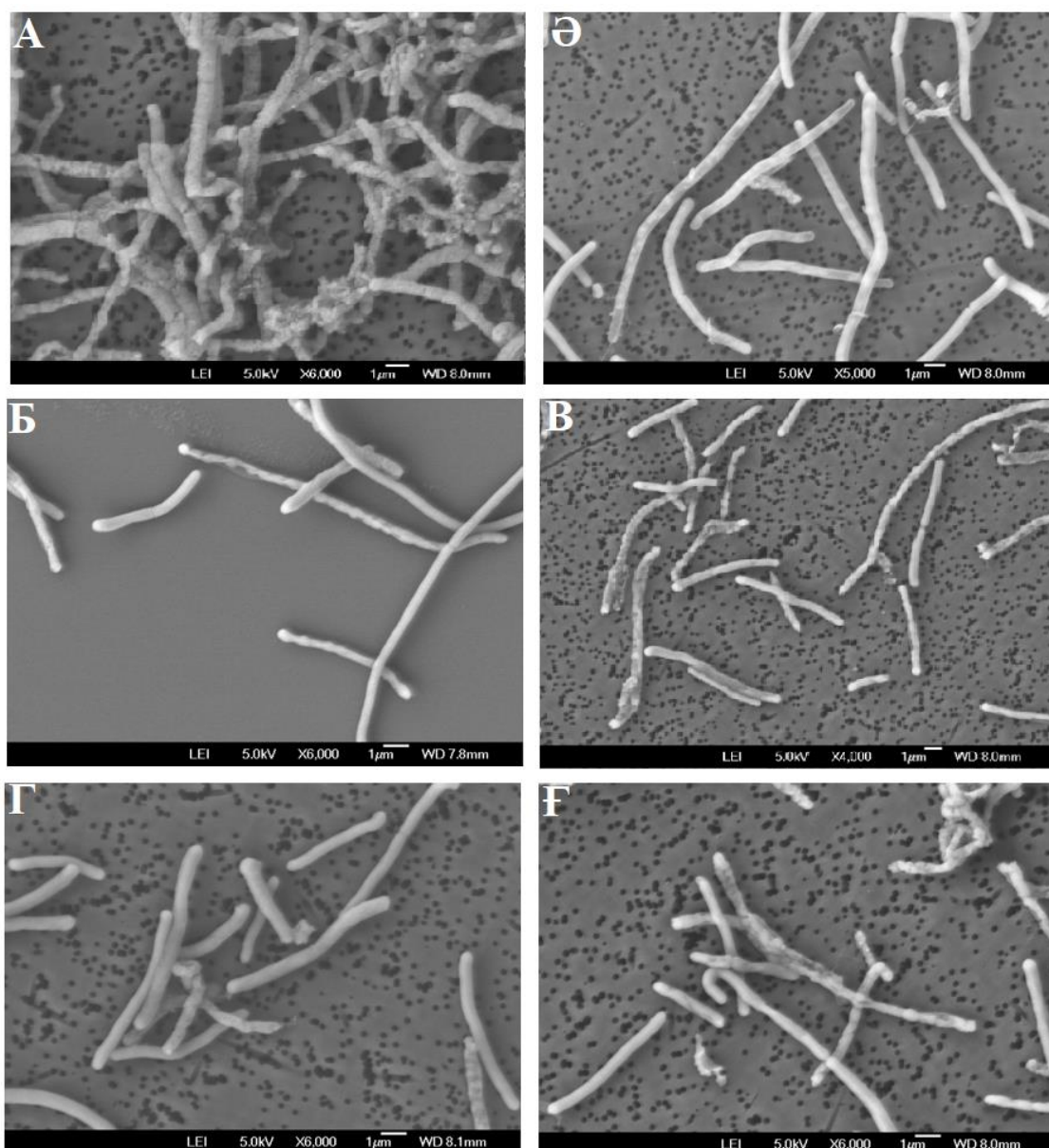
24 - кестенің жалғасы

Рибоза	+	-	+	-	+	+	+	-
D-ксилоза	+	-	+	-	+	+	+	-
Адонитол	±	-	-	-	-	-	-	-
Галактоза	-	-	-	+	+	-	v	-
D-глюкоза	-	+	+	v	+	+	+	+
D-фруктоза	-	+	+	-	+	+	+	+
D-манноза	+	+	+	-	-	+	+	+
L-сорбоза	±	-	-	-	-	v	-	-
Рамноза	+	-	-	-	-	+	-	v
Инозитол	-	-	-	-	-	-	+	-
D-маннитол	+	-	+	-	+	+	+	±
Метил-D-глюкопиранозид	+	v	-	+	+	+	-	-
Амигдалин	-	-	-	+	±	+	-	-
Арбутин	-	±	-	-	-	-	-	-
Эскулин	-	+	+	+	+	+	+	+
Салицин	±	-	-	-	-	±	±	-
D-целлобиоза	+	-	-	±	-	+	-	-
D-мелибиоза	+	-	+	+	+	-	±	-
D-сахароза	+	-	±	+	+	+	+	±
D-трегалоза	+	+	+	±	-	+	+	±
D-мелезитоза	-	±	+	+	+	+	±	-
D-раффиноза	-	-	+	+	±	+	+	-
Гликоген	-	+	-	-	-	+	-	v
D-тураноза	+	v	-	-	+	+	+	-
D-ликсоза	-	±	-	-	-	-	-	-
D-тагатоza	-	±	+	+	+	-	-	-

*Белгілер: v, өзгерінкі; +, оң; -, теріс; ±, әлсіз оң

Сыналған 8 штамның ешқайсысында бірдей фенотиптік белгілер байқалмады, мысалы 3SAk1 және 3WAK1 штамдары 3WAK3 штамына қарағанда әлдеқайда көбірек субстраттарды ассимиляциялауға қабілетті болды. Ал 3WAK3 тек D-мальтоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-манноза және эскулин көмірсуларын ассимиляциялай алатыны анықталды. Барлық штамдар D-мальтозадан қышқыл түзе алды, бірақ штамдардың ешқайсысы эритритол, D-арабинозы, L-ксилозы, метил-D-илопиранозид, дульцита, D-сорбита, D-сорбита, метилового эфира. -D-маннопиранозид, N-ацетилглюкозамин, D-лактоза, инулин, ксилит, гентиобиоза, D-фукоза, L-фукоза, D-арабитол, L-арабитол, глюконат, 2-кетоглюконат, және 5-кетоглюконат көмірсуларынан қышқыл түзбеді.

Барлық 8 *Geobacillus* штамдарының жасушалары фазалық-контрасты микроскопия нәтижесі бойынша Грам оң, таяқша тәрізді және эндоспора түзуге қабілетті болды. 8 штамның 6 электронды микроскоп көмегімен зерттелді (сурет 26).

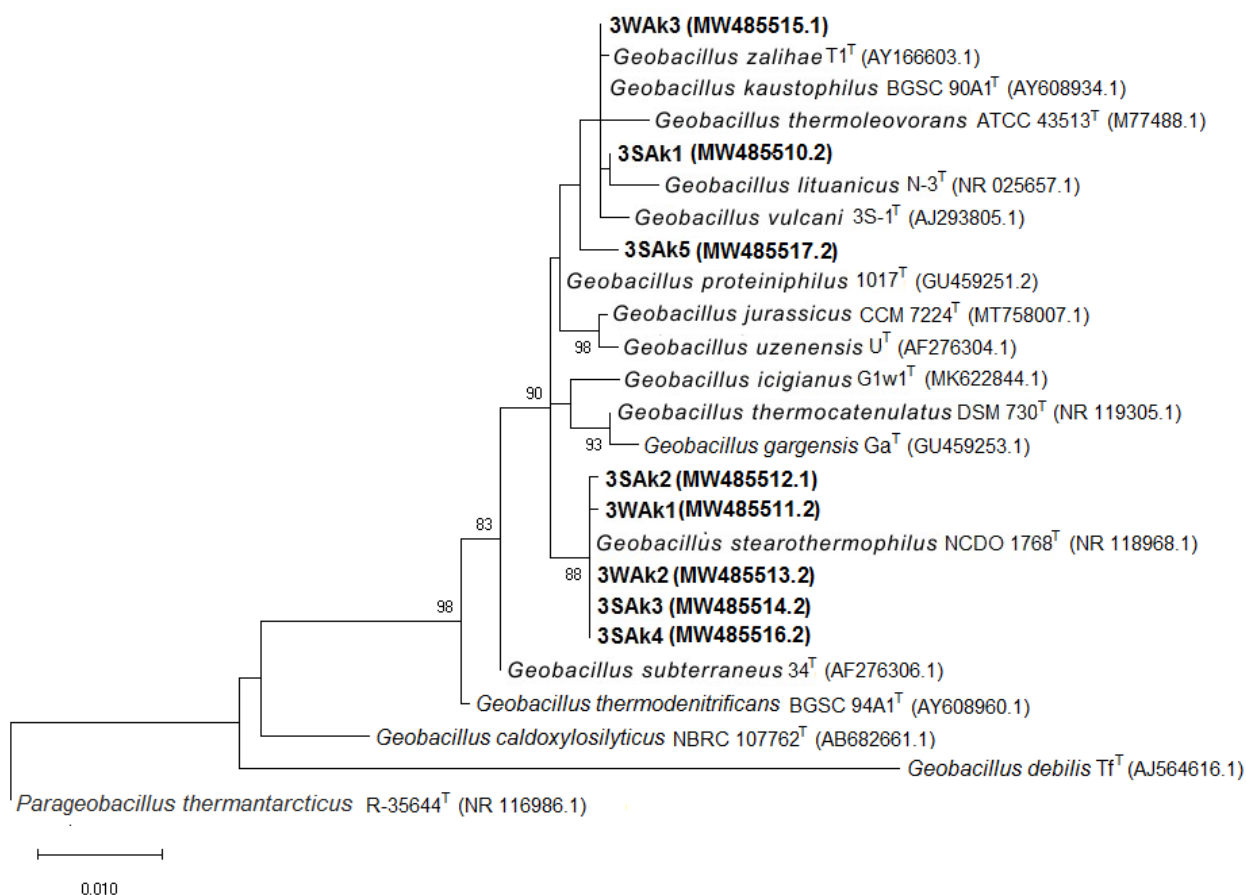


A) 3SAk1; Б) 3SAk2; В) 3SAk3; Г) 3SAk5; Д) 3Wak2; Е) 3Wak3. Масштаб: 1 мкм

Сурет 26 - Сканерлеуші электронды микроскоп көмегімен жасалған штамдардың суреттері

Суретте көрсетілгендей штамдар *Bacillaceae* тұқымдасына тән морфологияға сәйкес келетін қысқа және ұзын келген жасушалар, қисық және дөңес ұштары байқалған.

3Wak1, 3Wak2, 3Wak3, 3SAk1, 3SAk2, 3SAk3, 3SAk4, 3SAk5 штамдардың өңделген нуклеотидтер тізбегін BLASTn құралымен теңестіру нәтижесінде олардың барлығы 99,4-99,8% аралығында *Geobacillus* туыстас өкілдерінің 16S рРНҚ геніне сәйкестік көрсетті. 3SAk4 және 3Wak2 штамдары *Geobacillus lituanicus* N-3^T штамымен жоғары ұқсастық көрсетті. *Geobacillus* түрлерінің типтік штамдары бар және осы жұмыста бөлініп алынған *Geobacillus* штамдарының филогенетикалық ағашы MEGA X [179] бағдарламасы көмегімен құрастырылды (сурет 27).



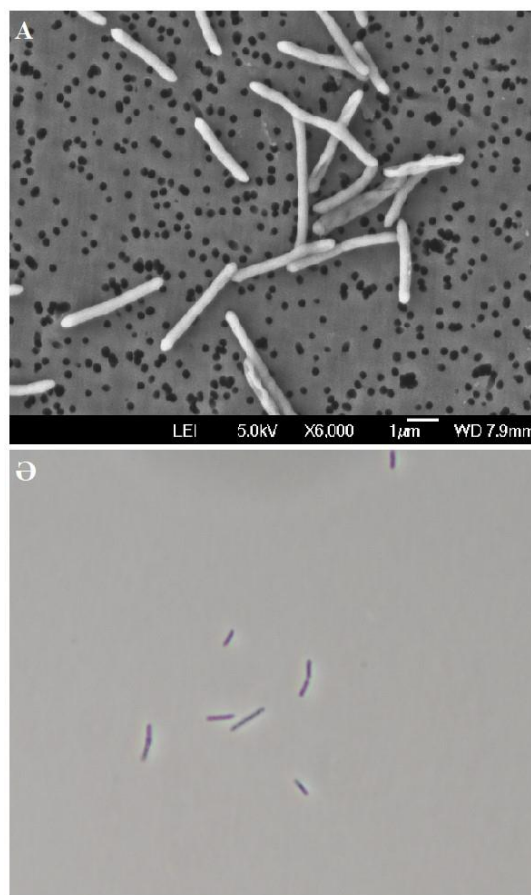
Тіркеу нөмірлері жақшада берілген. Bootstrap мәндері (>70%) тармақтарды пайызбен көрсетіледі. Ағаш maximum-likelihood әдісімен құралған. Сыртқы топ ретінде *Parageobacillus thermantarcticus* R-35644^T (NR_116986.1) пайдаланылды

Сурет 27 - *Geobacillus* түрлерінің типтік штамдары бар және N2 үлгісінен бөлініп алынған штамдардың (қалын қаріппен) 16S рРНҚ генінің тізбегіне негізделген филогенетикалық ағашы

Филогенетикалық ағашты анализ нәтижесінде штамдар бес кластерге бөлінді, солардың бірінде *Geobacillus stearothermophilus* NCDO 1768^T айналасында тығыз топтастырылған өте ұқсас 3 штамм (3SAk3, 3SAk4 және 3Wak2) жоғары bootstrap тірегімен орнықты. 3SAk2 және 3Wak1 штамдары да *G. Stearothermophilus* NCDO 1768^T штамымен бір кластермен байланыстырылды. Бұл осы 5 штамның *G. Stearothermophilus* түріне жататынын көрсетеді. 3SAk1 штамы *Geobacillus lituanicus* N-3^T штамымен тығыз топтастырылған, ал 3SAk5 және 3Wak3 штамдары жекелей кладаларда орналасты, сәйкесінше оларды *Geobacillus* түрінің жаңа өкілдері ретінде болу мүмкіндігін көрсетеді.

Caldicellulosiruptor SAk штамы. Sak штамы анаэробты жағдайда N2 үлгісінен сериялық сұйылту әдісімен таза дақылы алынды. Грам теріс, және тек оттегісіз ортада ғана көбейуге қабілеттілік көрсетті. *Caldicellulosiruptor* SAk жасушалары дара, жұп, сирек тізбектеліп орналасқан, спора түзуі байқалмады, тығыз қоректік орталарда колония түзбейді. Электронды микроскопия және фазалық-контрасты микроскопия кесікіндерінде,

Caldicellulosiruptor SАк жасушалары ұзындығы 3.1-10.2 мкм аралығында кездеседі, жұп немесе дара орналасуы байқалады (сурет 28).



Масштаб: 1 мкм

Сурет 28 - *Caldicellulosiruptor* SАк штамының фазалық-контрасты (А) және электронды микроскопия кескіндері (Ә)

Caldicellulosiruptor SАк штамы анаэробты жағдайда 50-72°C температура (оптимум 68-70°C) аралығында, және рН көрсеткіші 5-8,2 (оптиму рН 7,2) аралығында болды (кесте 25).

Кесте 25 - *Caldicellulosiruptor* SАк штамының және үш филогенетикалық жақын типтік штамдардың физиологиялық сипаттамасы

Ерекшелік	*1	2	3	4
Жасуша морфологиясы	Таяқшалар дара, жұп, сирек тізбек/жіп тәріздес	Таяқшалар, жалғыз немесе жұптастырылған	Таяқшалар	Таяқшалар
Спора түзуге қабілеттілік	-	-	-	-
Жасуша мөлшері (мкм)	3.1-10.2 x 0.4-0.6	3.6-5.9 x 0.7-1.0	1.5-3.5 x 0.7	МЖ
Грамм реакциясы	-	-	-	-
Қозғалғыштық	-	-	-	-
Өсу температурасы (°C)				
Аралығы	55-72	50-78	50-78	42-90

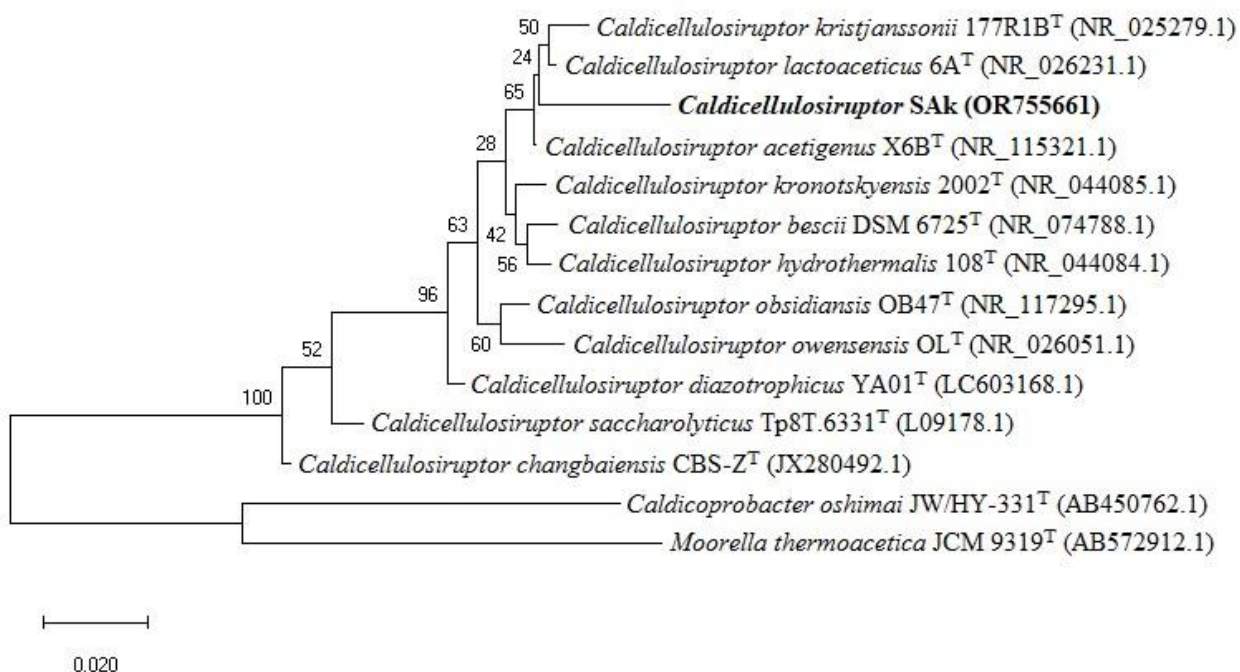
25- кестенің жалғасы

Оптимум	68-70	65-68	68	78-80
Өсу рН көрсеткіші				
Аралығы	5,0 - 8,2	5,2 - 8,5	5,8 - 8,2	5,0 - 8,3
Оптимум	7,2	7,0	7,0	7,2
Ашытқы экстракты	+	-	-	±
пептон	+	+	-	МЖ
казейн	+	-	-	-
D-рибоза	МЖ	-	-	v
D-фруктоза	-	+	-	+
D-галактоза	-	+	-	+
арабиноза	МЖ	+	МЖ	+
СМ-целлюлоза	+	+	+	+
б-циклодекстрин	МЖ	МЖ	v	+
мелибиоза	-	МЖ	МЖ	+
целлюлоза	-	-	МЖ	+
ксилан	+	+	+	+
ацетат	МЖ	-	-	-
лактат	МЖ	МЖ	-	-
декстран	МЖ	-	-	-
пируват	v	-	-	МЖ
сүзгі қағазы	-	-	-	+
крахмал	+	+	+	+
пектин	+	-	+	+
авицел	МЖ	-	+	+
API 20A:				
L-триптофан	-	МЖ	МЖ	МЖ
несепнәр	-	МЖ	МЖ	МЖ
D-глюкоза	+	+	-	+
D-маннитол	+	-	-	±
D-лактоза	+	+	+	+
D-сахароза	+	+	-	+
D-мальтоза	+	+	+	+
салицин	+	МЖ	МЖ	МЖ
D-ксилоза	+	+	+	
L-арабиноза	+	+	-	+
желатин	+	МЖ	МЖ	МЖ
эскулин темір цитраты	+	МЖ	МЖ	МЖ
глицерин	-	МЖ	МЖ	МЖ
D-целлобиоза	±	+	+	+
D-манноза	+	+	-	+
D-мелезитоза	-	МЖ	МЖ	МЖ
D-раффиноза	+	+	-	±
D-сорбитол	-	-	-	±
L-рамноза	-	v	-	+
D-трегалоза	-	+	-	+
Көмірсуларды ашыту өнімдері:				
этанол	МЖ	+	+	МЖ
ацетат	МЖ	+	+	+
лактат	МЖ	-	+	+
H ₂	+	+	+	+
CO ₂	+	+	+	+
H ₂ S	МЖ	-	-	МЖ

*Белгілер: v, өзгерінкі; +, оң; -, теріс; ±, әлсіз оң; МЖ, мәлемет жоқ; 1, *Caldicellulosiruptor* SAk штаммы; 2, *Caldicellulosiruptor acetigenus* strain X6B^T [209]; 3, *Caldicellulosiruptor lactoaceticus* strain 6A^T [15]; 4, *Caldicellulosiruptor bescii* strain DSM 6725^T [210]. Барлық штамдар СМ-целлюлозаны, ксиланды, крахмалды, D-лактозаны, D-мальтозаны, және D-целлобиозаны энергия көзі ретінде қолдана алды.

SAk штамының түрлі қосылыстарды ассимиляциялау мүмкіндігін анықтау API 20 A жолақтары көмегімен және қоректік ортаға негізгі энергия көзі ретінде басқа қосылыстарды қосу арқылы үш қайталанумен тестіленді (кесте 25). *Caldicellulosiruptor* SAk штамы API 20 A жолақтарында 20 қосылыстың 13-ін ыдыратуға қабілетті болды, SAk штамының оған филогенетикалық ең жақын түрлерінен казеинді және D-маннитолды жалғыз энергия көзі ретінде қолдануға қабілеттілігімен ерекшеленді. Сонымен қатар *Caldicellulosiruptor* SAk штамының максималды және минималды өсу температурасы 72-55°C болса, басқа филогенетикалық жақын түрлерінде 42-90°C аралығында байқалған, бұл оның басқа *Caldicellulosiruptor* түрінің типтік штамдарына қарағанда орташа термофильді екендігін көрсетеді.

Caldicellulosiruptor SAk штамының 16S рРНҚ (1459 ж.н) ген тізбегін GenBank дерекқорларында жарияланған реттіліктерге сәйкестендірген кезде, SAk штамының тізбегіне ең жақын ұқсастық *Caldicellulosiruptor* түрінің типтік штамдарымен байқалды, айта кетерлік *Caldicellulosiruptor* SAk штамы мен *Caldicellulosiruptor acetigenus* X6B^T (NR_115321.1) арасындағы 16S рРНҚ ген тізбегінің ұқсастығы 97,02% құраса *Caldicellulosiruptor lactoaceticus* 6A^T (NR_026231.1) типтік штамымен 96,71% құрады.



Тіркеу нөмірлері жақшада берілген. Bootstrap мәндері тармақтарда пайызбен көрсетіледі. Ағаш maximum-likelihood әдісімен құралған. Сыртқы топ ретінде *Caldicoprobacter oshimai* JW/HY-331^T (AB450762.1) және *Moorella thermoacetica* JCM 9319^T (AB572912.1) пайдаланылды

Сурет 29 - *Caldicellulosiruptor* түрлерінің типтік штамдары бар және *Caldicellulosiruptor* SAk штамының (қалын қаріппен) 16S рРНҚ генінің тізбектеріне негізделген филогенетикалық ағаш

Филогенетикалық ағаш құру нәтижесі бойынша *Caldicellulosiruptor* SAk штамы басқа типтік *Caldicellulosiruptor* штамдарымен топтастырылды.

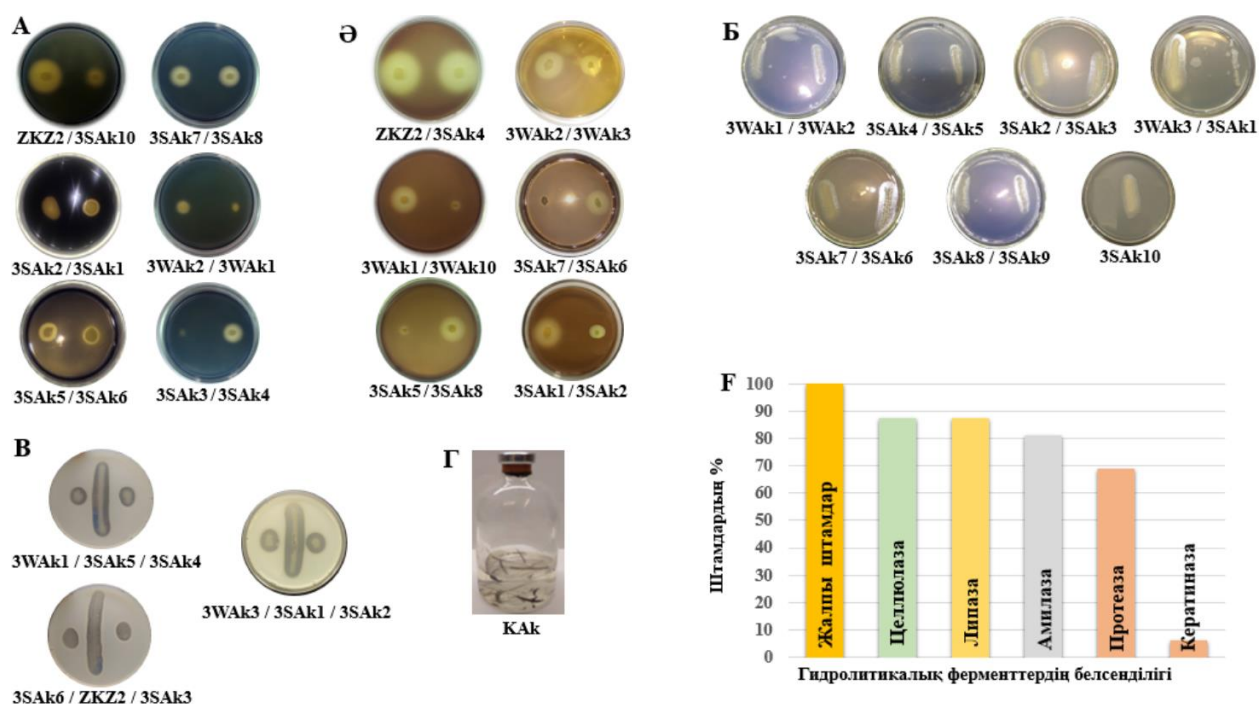
Дегенмен *Caldicellulosiruptor* SAk штамының ең жақын *Caldicellulosiruptor lactoaceticus* 6A^T типтік штамынан қашықтығы және дара кластерде орналасу SAk штамының жаңа түр немесе түріші екенін болжауға болады.

3.3 Жаркент геотермалды су көздерінен бөлініп алынған штамдардың жасушадан тыс гидролитикалық белсенділігі

Геотермалды микробтық қауымдастықтардың құрылымын сипаттау кезінде гидролиздік белсенділігі бар организмдерге басты назар аударылады. Оған бірден бір себеп олар органикалық заттардың және табиғи текті жоғары молекулалық полимерлерді (ақуыздар, целлюлоза, майлар, крахмал) бірінші реттік ыдырауын қамтамасыз ететін гидролитиктер болып табылады. Сонымен қатар, гидролиздік белсенділігі бар микроорганизмдер биотехнология саласы үшін маңызды ферменттердің продуценттері ретінде қызығушылық тудырады, сондықтан осындай биотоптарда мекен ететін күрделі полимерлерді ыдырататын микроорганизмдер қауымдастығын зерттеу өзекті бағыттардың біріне жатады.

Жаркент геотермалдық су көздерінен оқшауланған штамдардың гидролитикалық белсенділіктерін анықтау үшін зерттеу әдістерінде көрсетілген селективті қоректік орталарда, аэробты және анаэробты жағдайда өсірілді. Сонымен қатар ферменттік белсенділіктері API ZYM жолақтарын қолдану арқылы бағаланды. Аэробты штамдармен фермент түзілу мөлшері зерттеу әдістерінде сипатталған агар диффузиялық әдіспен анықталды [211]. Анаэробты бактериялар үшін ферментативті белсенділігі сұйық қоректік ортаға жалғыз энергия көзі ретінде арнайы субстраттарды қосу арқылы тесттен өткізілді және ассимиляциялау қарқынына байланысты визуалды бағаланды (жоқ; O) (төмен; L) (орташа; M) (жақсы; H) [17, 86];

Штамдардың жасушадан тыс гидролазаларды өндіру қабілеттілігі олардың өсу температура аралықтарында тексерілді. Барлық штамдардың кем дегенде бір немесе бірнеше жасушадан тыс гидролитикалық ферменттерді (целлюлазалар, протеазалар, амилазалар, липазалар, кератиназалар) белсенді түрде өндіретіні анықталды (сурет 30, кесте 26).



Бөлінген бактериялардың (А) амиолитикалық, (Ә) целлюлолитикалық, (Б) липолитикалық, (В) протеолитикалық, (Г) кератинолитикалық белсенділігін көрсететін анализ. F) Жасушадан тыс гидролиздік ферменттердің белсенділігінің штамдар арасында таралуы (%)

Сурет 30 - Жаркент геотермалдық су көздерінен бөлініп алынған штамдардың жасушадан тыс гидролиздік ферменттерді өндіру

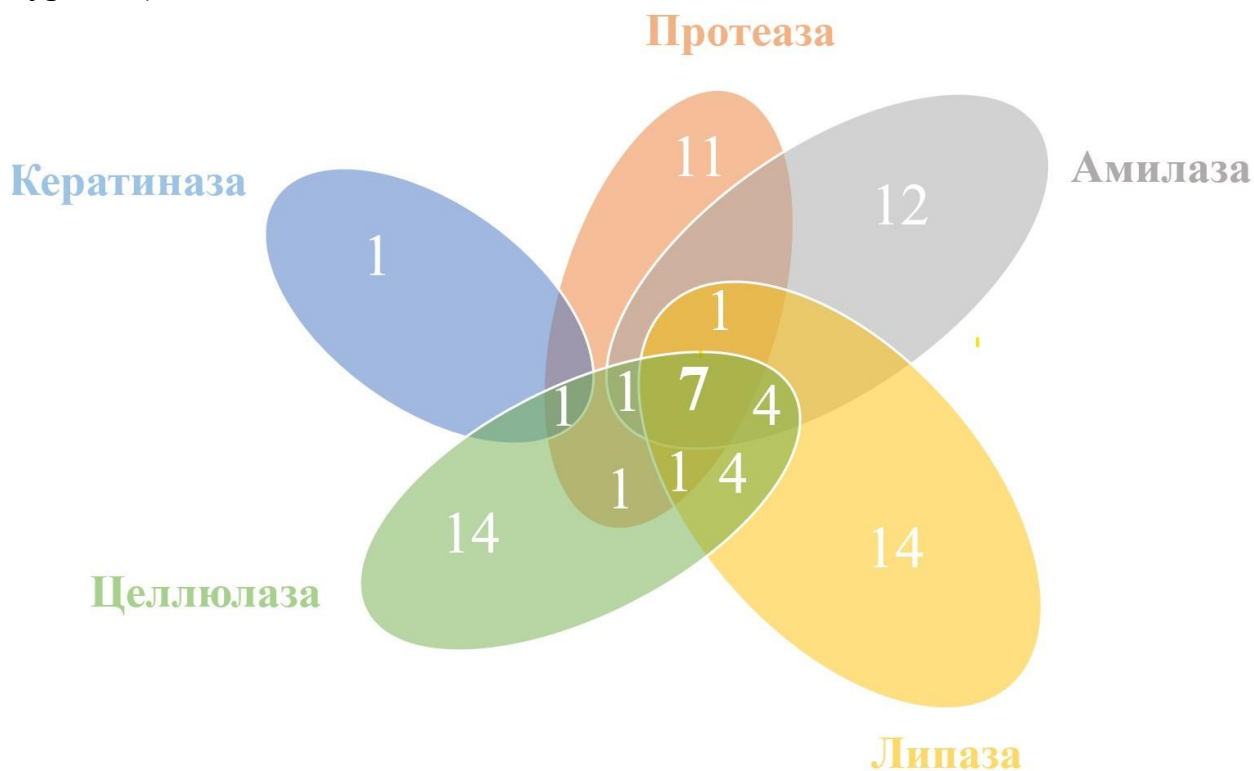
Кесте 26 - Жаркент геотермалдық су көздерінен бөлініп алынған штамдардың ФҚ

Штамдар*	Ферментативті белсенділік (°C)*																			
	Протеаза				Целлюлаза				Амилаза				Липаза				Кератиназа			
	65	70	75	80°C	65	70	75	80°C	65	70	75	80°C	65	70	75	80°C	65	70	75	80°C
3Wak1	O	M	L	O	O	M	L	O	O	L	L	O	L	H	L	O	O	O	O	O
3Wak2	O	O	O	O	O	H	L	O	L	H	L	O	L	H	L	O	O	O	O	O
3Wak3	L	H	M	O	L	M	M	L	O	O	O	O	L	H	O	O	O	O	O	O
3SAk1	L	H	L	O	O	M	L	O	O	H	M	O	L	M	L	O	O	O	O	O
3SAk2	O	H	L	O	L	M	L	O	O	H	L	O	L	H	O	O	O	O	O	O
3SAk3	O	M	O	O	O	O	O	O	O	L	O	O	O	H	L	O	O	O	O	O
3SAk4	O	M	M	L	L	H	M	L	O	H	M	L	O	H	O	O	O	O	O	O
3SAk5	O	H	L	L	L	L	L	O	O	M	L	O	O	L	O	O	O	O	O	O
3SAk6	O	L	L	O	O	O	M	L	O	M	L	O	O	H	L	O	O	O	O	O
3SAk7	O	O	O	O	O	O	L	O	O	L	O	O	O	M	H	L	O	O	O	O
3SAk8	O	O	O	O	L	M	H	O	O	L	M	O	O	H	M	O	O	O	O	O
3SAk9	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	M	O	O	O	O	O	O
3SAk10	O	O	O	O	L	L	O	O	L	L	O	O	O	M	O	O	O	O	O	O
ZKZ2	L	M	L	O	M	H	H	O	O	H	M	O	O	M	O	O	O	O	O	O
KAk*	L	H	H	L	L	H	H	L	O	O	O	O	O	O	O	O	M	H	M	L
SAk	O	L	O	O	M	H	M	O	L	H	L	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Белгілер: ■ Барлық төрт гидролазаны түзуге қабілетті штамдар; ■ целлюлаза, амилаза, және липазаны түзуге қабілетті штамдар; ■ протеаза, целлюлаза, және липазаны түзуге қабілетті штамдар; ■ протеаза, амилаза, және липазаны түзуге қабілетті штамдар; ■ протеаза, целлюлаза, және амилазаны түзуге қабілетті штамдар; ■ протеаза, кератиназа және целлюлаза түзуге қабілетті штамдар; ■ липаза түзуге қабілетті штамдар; Ескерту, кестеде көрсетілген деректер үш тәуелсіз эксперименттің орташа ± стандартты ауытқуын білдіреді және ФҚ ретінде көрсетілді, мұнда ФҚ = (колония диаметрі + гидролиз аймағының диаметрі) / колония диаметрі (0 mm; O) (< 6 mm; L) (6–12 mm; M) (> 12 mm; H) [157]

Протеазалық белсенділік барлық сыналған штамдардың ішінде 11-інде (68.7%) анықталды, солардың ішінде ең жоғары көрсеткіш көрсеткен *Geobacillus* 3WAK3, *Geobacillus* 3SAk1, *Geobacillus* 3SAk2, *Geobacillus* 3SAk5 және *Caldanaerobacter* KAK штамдары болды. 14 (87.5%) штамда целлюлазалық белсенділік анықталды, солардың ішінде ең жоғары көрсеткіш көрсеткендері *Geobacillus* 3WAK2, *Geobacillus* 3SAk4, *Polycladomyces* ZKZ2, *Caldanaerobacter* KAK және *Caldicellulosiruptor* sp. SAK штамдары болды. 13 (81.2%) штамда амилазалық, ал 14 (87.5%) штамда липазалық белсенділік көрсетті, ішінде ең жоғары белсенділік көрсеткендер келесілер болды: *Geobacillus* 3WAK2, *Geobacillus* 3WAK3, *Geobacillus* 3SAk2, *Geobacillus* 3SAk3, *Geobacillus* 3SAk4, *Anoxybacillus* 3SAk6 және *Anoxybacillus* 3SAk8 болды. Ал кератиназалық белсенділік тек *Caldanaerobacter* KAK штамында байқалды (6.2%).

Geobacillus 3WAK1, 3SAk1, 3SAk2, 3SAk4, 3SAk5, 3SAk6 және *Polycladomyces* ZKZ2 штамдары сыналған 5 ферменттің төртеуін (протеаза, амилаза, липаза, целлюлаза) комбинация түрінде өндіре алады (кесте 26, сурет 31).

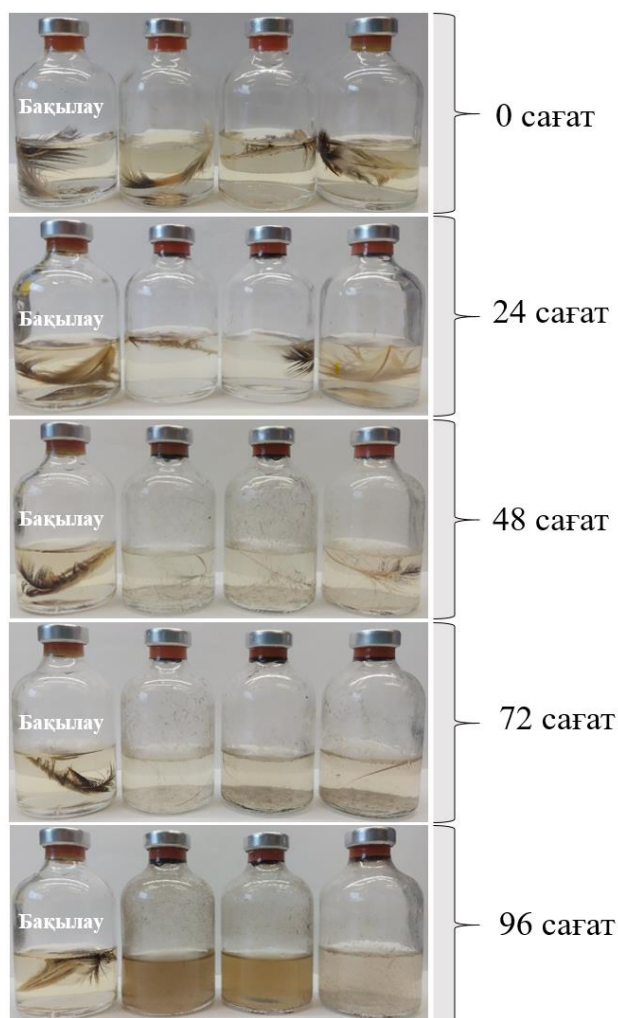


Сурет 31 - Жасушадан тыс гидролитикалық ферменттерді синтездейтін штамдардың санын көрсететін диаграмма

Протеаза және целлюлазаны түзу қабілеті 1 штамда байқалса (*Geobacillus* sp. 3WAK3), целлюлаза, амилаза және липаза түзу қабілеті 3 штамда байқалды (*G. stearothermophilus* 3WAK2, *Anoxybacillus* 3SAk7, *Anoxybacillus* 3SAk8, *Anoxybacillus* 3SAk10). Протеаза, амилаза және липаза түзу қабілеті тек *Geobacillus* 3SAk3 штамында көрінсе, протеаза, целлюлаза және амилазаны түзу *Caldicellulosiruptor* SAK штамында байқалды. 7 (43.7%)

штамда (*Geobacillus* 3WАk1, *Geobacillus* 3SAk1, *Geobacillus* 3SAk2, *Geobacillus* 3SAk4, *Geobacillus* 3SAk5, *Anoxybacillus* 3SAk6, *Polycladomyces* ZKZ2) 4 термотұрақты ферменттерді түзуге қабілетті, 7 (43.7%) штамда үш түрлі термотұрақты ферменттерді түзуге қабілетті және бір *Anoxybacillus* sp. 3SAk9 штамы липазалық белсенділікті ғана көрсетті. Бөлінетін ферменттердің қарқындылығын көрсететін колониялардың айналасындағы гидролиз аймақтар инкубациялық температураға байланысты өзгеріп отырды, бірақ 70-75°C температура аралықтарында максималды, ал 65°C температурада минималды қарқындылық көрсетті.

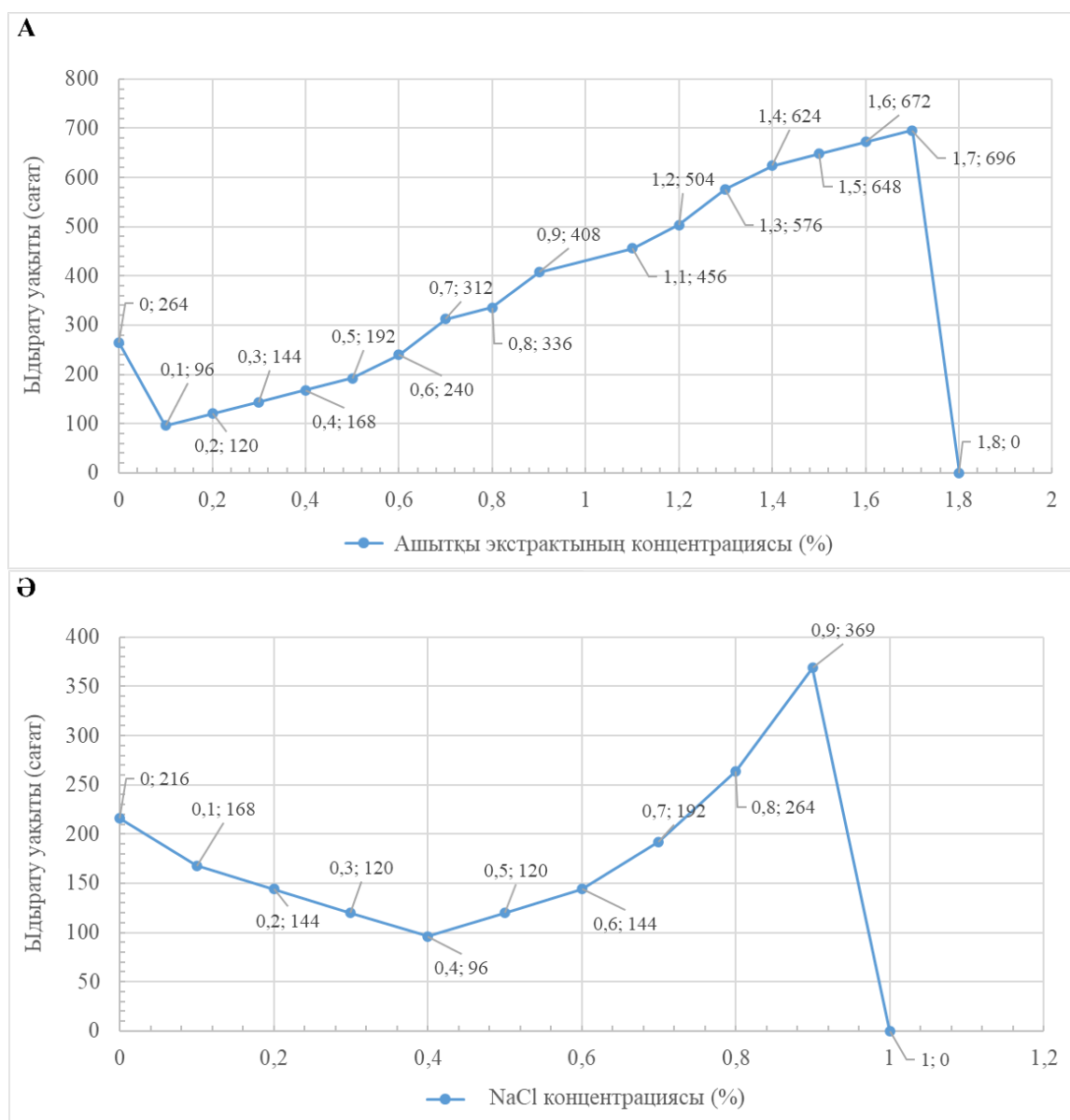
Polycladomyces ZKZ2 штамы басқа штамдардан ең жоғары целлюлазалық белсенділікпен ерекшеленсе, N1 үлгісінен бөлініп алынған анаэробты *Caldanaerobacter* sp. КАk штамы басқа штамдардан кератиназалық белсенділігімен ерекшеленді. КАk штамының кератиназалық белсенділігі анаэробты MMF қоректік ортасында тауық қауырсынымен (β -кератин) (мамық және қатты) сыналды (сурет 32).



Сурет 32 - *Caldanaerobacter* КАk штамының кератиназалық белсенділігін тексеру үшін тауық қанат қауырсынында 4 тәулік бойы 70°C температурада инкубациялаудың нәтижесі

Осы субстратта өсу барысында газ түзілу байқалды және құрамында орта есеппен 8,9% сутегі (H_2) және 4,1% көмірқышқыл газы (CO_2) болатындығы анықталды. Тауық қауырсынында КАк штаммын инкубациялау барысында, мезгілді шыны ыдыс ішінде қысымды азайту дақылдарының санының ұлғаюына және субстраттың тез ыдырауына алып келді.

Caldanaerobacter КАк штаммының тауықтың төсінен алынған мамық және қанатынан алынған қауырсындарын ыдырату жылдамдығын арттыру мақсатында әр түрлі субстраттар сынақтан өткізілді, оның ішінде: майсыздандырылған сүт ұнтағы, казеин, пептон және ашытқы экстракты болды (сурет 33, А).



Сурет 33 - Ашытқы экстрактының (А) және NaCl (Ә) концентрацияларының *Caldanaerobacter* КАк штаммының кератиназалық белсенділігіне әсері

Нәтижесінде осы сыналған субстраттар ішінде ашытқы экстракты *Caldanaerobacter* КАк штаммының кератиназалық белсенділігін

жоғарлататыны анықталды. Мысалы, MMF қоректік ортасына 0,1% ашытқы экстрактісі қосылса орта есеппен 70°C температурада мамық қауырсынды ыдырату ± 4 тәулік, ал қанаттан алынған қауырсынды ыдырату ± 6 тәулік алатыны анықталды. Дәл осындай жағдайда MMF қоректік ортасына ашытқы экстрактісін қоспаған жағдайда тауық қауырсындарын ыдырату уақыты 3 есе ұлғайды және ашытқы экстрактісін қоректік ортаға қосу нәтижесінде қымбат дәрумендер ерітіндісіз толығымен алмастыра алатыны байқалды. Бұл ашытқы экстрактісінің *Caldanaerobacter* KAK штамм дақылдарын дәрумен ерітіндісіне қарағанда әлдеқайда тезірек бөлінуіне және кератиназалық белсенділігіне әсер ететінін көрсетеді. Сонымен қатар ашытқы экстрактісінің оң әсерімен қатар теріс әсері де байқалды, егер қоректік ортада ашытқы экстрактісінің концентрациясы 1,7% асатын болса, бұл *Caldanaerobacter* KAK штамының кератиназалық белсенділігін толығымен тежейтіні анықталды. Ашытқы экстрактісінен басқа *Caldanaerobacter* KAK штамының кератиназалық белсенділігіне NaCl тұзы оң әсер ететіні және оның 0.4% мөлшері оптималды екені белгілі болды (сурет 33, Ә). Ұқсас нәтижелер Stanly Merin Liya, Mridul Umesh, Anish Nag, және басқа да (2023) авторлармен жазылған жұмыста NaCl тұзы кератиназа ферментінің белсенділігін жоғарлататыны көрсетілген [212]. *Caldanaerobacter* KAK штамының кератиназалық белсенділігіне қоректік орта құрамдас бөліктерінен басқа ерекше әсер етуші фактордың бірі инкубация температурасы. Кератиназалық белсенділік 55-80°C аралықтарында зерттеліп, нәтижесінде ең жоғары белсенділік 70°C температурасында байқалатындығы көрсетілді.

Caldanaerobacter KAK штамы *Bacillota* типіне, *Clostridia* класына, *Thermoanaerobacterales* отрядына, *Thermoanaerobacteraceae* тұқымдасына, және *Caldanaerobacter* туыстасына жатады [206]. BLASTn нәтижесі бойынша ең жақын 98.55% ұқсастығымен *Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis* (DSM 15242^T) болды, бірақ бұл типтік штамда және басқа да *Caldanaerobacter* түр өкілдерінде β -кератинді (тауық қауырсыны) ыдырату қасиеттері байқалмады [204-206]. Осыған орай бұл жұмыста KAK штамы *Caldanaerobacter* түр өкілдері ішінде бірінші белгі кератиназалық қасиеті бар термофильді бактерия анықталу және оның кератиназалық белсенділігін 0,01% ашытқы экстрактын қоректік ортаға қосу арқылы арттыруға болатынын, 70°C оптималды ыдырату температурасы екендігі тәжірибе барысында анықталды.

Жұмыстың келесі кезеңінде API ZYM жолақтары көмегімен сыналған барлық штамдар келесі ферменттер қатысында белсенділік көрсетті: сілтілі фосфатаза, эстераза (C4), эстеразды липаза (C8), нафтол-AS-BI-фосфогидролаза. *Geobacillus* және *Anoxybacillus* штамдарының ешқайсысы β -глюкуронидаза ферментін түзуге қабілеттілік көрсетпеді. Бұл ферментті түзуге тек *Caldicellulosiruptor* sp. SAK штамы ғана қабілетті болды. Егер *Geobacillus* штамдарының барлығы β -галактозидаза ферментіне белсенділік көрсетпесе, *Anoxybacillus* штамдары N-ацетил- β -глюкозаминидаза, α -

маннозидаза, α -фукосидаза ферменттеріне белсенді болмады. Бұл үш ферментті бірдей түзуге тек *G. stearothermophilus* 3SAk2 қабілетті болса α -маннозидаза және α -фукосидазаны *G. stearothermophilus* 3SAk4 штамы түзе алды, ал *Caldanaerobacter* sp. KAK және *Caldicellulosiruptor* sp. SAK штамдары N-ацетил- β -глюкозаминидаза мен α -фукосидаза ферменттерін сәйкесінше жекелей түзуге қабілетті болды. API ZYM жолақтарын қолдану арқылы алынған нәтижелер осы жұмыста оқшауланған термофильді бактериялардың жоғары ферментативті белсенділігін тағы бір рет дәлелдейді және *Geobacillus* штамдарының ерекше ферментативті белсенділігін көрсетеді (кесте 27).

Кесте 27 - Оқшауланған штамдардың API ZYM жолақтарында ферментативті белсенділігі

Штамдар	Анықталған ферменттің аты*																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
3Wak1	0	4	4	4	4	4	2	0	0	4	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0
3Wak2	0	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0
3Wak3	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0
3SAk1	0	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	0	0	4	2	0	0	0
3SAk2	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	4	4	4	1	4
3SAk3	0	4	4	4	4	4	2	2	3	4	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0
3SAk4	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	4	0	0	4	4
3SAk5	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0
3SAk6	0	4	4	4	1	0	0	0	0	0	4	4	4	0	0	2	0	0	0	0
3SAk7	0	4	4	4	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	4	2	0	0	0
3SAk8	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1	4	0	3	4	0	0	0
3SAk9	0	4	4	4	0	0	0	0	4	0	2	4	0	0	0	4	1	0	0	0
3SAk10	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4	4	0	0	0
ZKZ2	0	4	4	3	0	4	0	0	0	4	4	4	4	0	0	4	0	0	0	0
KAK	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0	0	4	4	4	0	0
SAK	0	2	2	1	4	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	0	0	2

Белгілер: *1, Теріс бақылау; 2, сілтілі фосфатаза; 3, эстераза (C4); 4, эстеразды липаза (C8); 5, липаза (C14); 6, лейцинарламидаза; 7, валинарламидаза; 8, цистинарламидаза; 9, трипсин; 10, α -химотрипсин; 11, қышқыл фосфатаза; 12, нафтол-AS-BI-фосфогидролаза; 13, α -галактозидаза; 14, β -галактозидаза; 15, β -глюкуронидаза; 16, α -глюкозидаза; 17, β -глюкозидаза; 18, N-ацетил- β -глюкозаминидаза; 19, α -маннозидаза; 20. α -фукосидаза. Фермент түзілу дәрежесі 0-ден 4-ге дейінгі шкаласы бойынша сапалы бағаланды, мұнда 0 фермент мүлде түзілмеуі болса, 4 ферменттің жоғары белсенділігін көрсетеді. Белгілер: 1. *G. stearothermophilus* 3Wak1; 2. *G. stearothermophilus* 3Wak2; 3. *Geobacillus* sp. 3Wak3; 4. *G. lituanicus* 3SAk1; 5. *G. stearothermophilus* 3SAk2; 6. *G. stearothermophilus* 3SAk3; 7. *G. stearothermophilus* 3SAk4; 8. *Geobacillus* sp. 3SAk5; 9. *A. bogrovensis* 3SAk6; 10. *A. bogrovensis* 3SAk7; 11. *Anoxybacillus* sp. 3SAk8; 12. *Anoxybacillus* sp. 3SAk9; 13. *Anoxybacillus* sp. 3SAk10; 14. *Polycladomyces* sp. ZKZ2; 15. *Caldanaerobacter* sp. KAK; 16. *Caldicellulosiruptor* sp. SAK

Осы зерттеуде N1 және N2 үлгілерінен бөлініп алынған 16 штамның ферментативті белсенділігі сыналып, ішінде *Geobacillus* 3Wak1, 3SAk1, 3SAk2, 3SAk4, 3SAk5, 3SAk6, *Polycladomyces* ZKZ2 және *Caldanaerobacter* KAK штамдары салыстырмалы жоғары фермент қарқындылығымен (ФҚ) ерекшеленді. Термофильді протеаза, кератиназа, целлюлаза, амилаза және липаза ферменттеріне қатысты белсенділік аталған штамдарды биотехнологияда қолдану мүмкіндігін көрсетеді. Термофильді бактериялар ішінде *Geobacillus* түрлері өнеркәсіптік маңызды экстремозимдерді өндіруіне

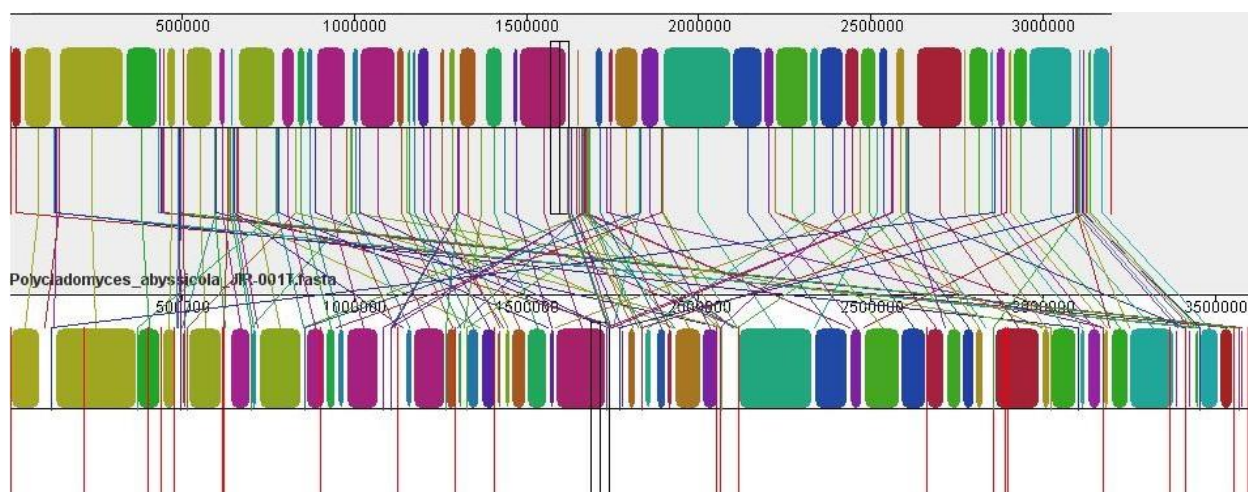
байланысты үлкен маңызға ие. Қазіргі уақытта осы бактерияларды 20-дан астам типтік штамдары белгілі. *Geobacillus* термофильді бактериясының түр өкілдері қарапайым қоректік орталарда өсуімен және қысқа уақыт аралығында көбеюімен ерекшеленеді және қазіргі уақытта биотехнологияның көптеген салаларында қолданыс тапқан [213]. Мысалы *Geobacillus* sp. T1 штамының целлюлазасы өңделмеген бидай мен арпа сабанының биомассасынан биоотын алуда [213, 214], ал *G. thermodenitrificans* IBRL-nra штамының термотұрақты липазасы ацетон, этанол және ацетонитрил секілді химиялық қосылыстарына жоғары тұрақтылық көрсетіп, тамақ өнеркәсібінде детергент ретінде қолданыс тапқан [213, 215]. Осыған байланысты, осы жұмыста бөлініп алынған *G. stearothermophilus* 3SAk4, және *G. stearothermophilus* 3SAk2 штамдары ерекше көңіл бөлуді қажет етеді, өйткені олар осы зерттеуде басқаларына қарағанда жоғары фермент қарқындылығымен және 5 гидролитикалық ферменттердің 4 түрін өндіре алу қабілетімен ерекшеленді. Сонымен қатар, зерттелген штамдардың ішінде жалғыз кератинолитикалық белсенділігімен ерекшеленген *Caldanaerobacter* KAk штамы, қысқа уақыт аралығында тауық қауырсынын (β -кератин) салыстырмалы арзан қоректік ортада ыдыратуымен ерекшеленіп, аталған штамның биотехнологиялық потенциалын көрсетеді. Мысалы, *Caldanaerobacter* KAk штамымен тауық қауырсынынан алынған кератин гидролизаттары биологиялық белсенді қоспалар немесе сүтті алмастырғыш (мал шаруашылығында), азотты тыңайтқыш, биологиялық ыдырайтын пленкаларды алмастырғыш ретінде пайдалануға болады [18, 146]. Кератиндердің гидролиздік өнімдерін және тікелей кератиназаны медицинада, сондай-ақ косметология, былғары өнеркәсібінде және жуғыш заттар өндірісінде қолдану мүмкіндігіне ие [92, 146, 147].

3.4 Перспективті жаңа штамдардың геномдарын секвенирлеу, *de novo* жинақтау және оларды сипаттау

Құрамында лигноцеллюлоза және кератин биомассаның компоненттерін гидролиздеуге қабілетті ферменттердің гендерін анықтау, сонымен қатар жаңалығын дәлелдеу мақсатында Жаркент аймағындағы геотермалды су көздерінен алынған үлгілерінен оқшауланған екі перспективті ZKZ2^T мен KAk термофильді микроорганизмдердің геномдары секвенирленді.

Polycladomyces zharkentensis ZKZ2^T. ZKZ2^T штамын осы уақытқа дейін барлық белгілі *Polycladomyces* типтік штамдарының геномдарымен салыстыру мақсатында GenBank қорында жоқ *Polycladomyces subterraneus* KSR 13^T штамының геномы қоса секвенирленді. Геном тізбектері GenBank қорына жүктеліп келесі тіркеу нөмірлерімен депозиттелді: *P. zharkentensis* ZKZ2^T үшін JAFHAP000000000 және *P. subterraneus* KSR 13^T үшін JANRHH000000000. Геном өлшемі *P. zharkentensis* ZKZ2^T үшін 22 контигке бөлінген 3, 317, 478 жұп негізін құраса *P. subterraneus* KSR 13^T үшін 56 контигке бөлінген 3, 361, 078 жұп негізін құрады. ZKZ2^T штамының

жинақталған (FASTQ файлы) геном тізбектерін *P. abyssicola* JIR-001^T штаммы геномымен теңестірілді (сурет 34).



Түрлі-түсті сызықтар екі геном арасындағы қайта құруларды көрсетеді. Тік қызыл сызықтар контиг шекараларды білдіреді

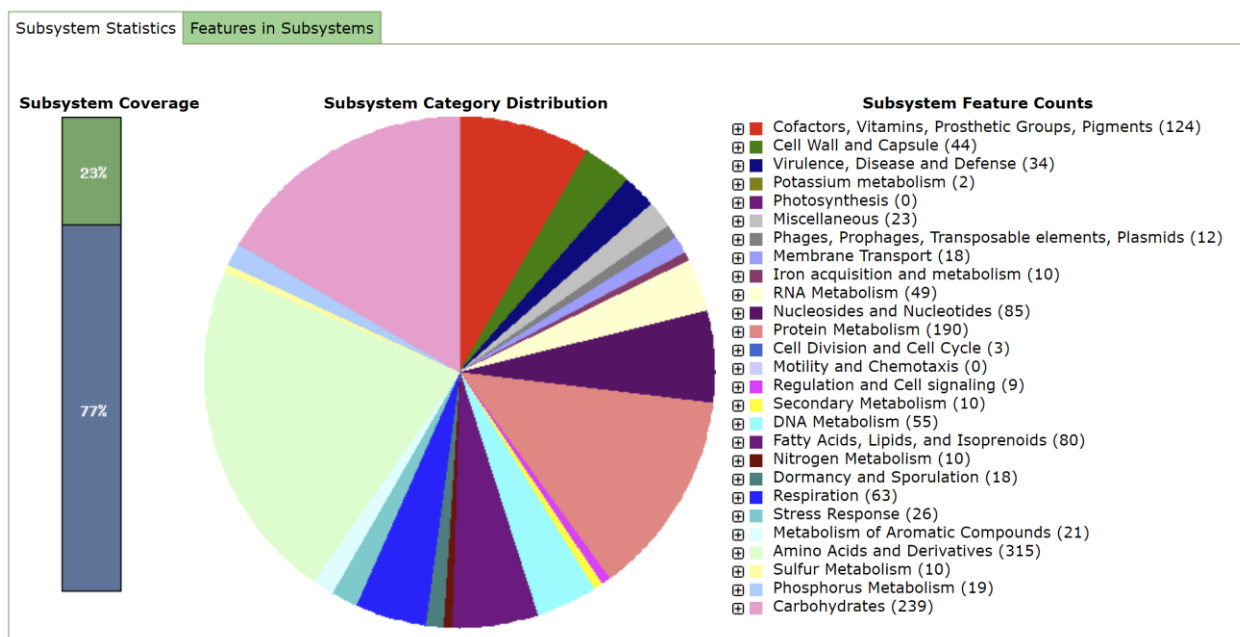
Сурет 34 - MAUVE бағдарламасы көмегімен жасалған *P. zharkentensis* ZKZ2^T (төменгі) және *P. abyssicola* JIR-001^T геномдары арасындағы нуклеотид тізбектерің теңестіру

Теңестіру прогрессивті теңестіру алгоритмін пайдаланып, MAUVE [183] бағдарламасымен іске асырылды және геном қайта реттеліп жиналды. Түрлі түстермен көрсетілген LCB екі геномның гомологиялық аймақтары болып табылады. *P. zharkentensis* ZKZ2^T және *P. abyssicola* JIR-001^T геномдарын теңестіру нәтижесінде құрылымындағы өзгерістерді көрсетті. 34-ші суретте көрсетілген көптеген қайта құрулармен (түрлі-түсті сызықтармен көрсетілген) геномдар арасында түссіз бос орындар осыған дәлел, олар екі геном арасында ұқсастығы жоқ аймақтарын көрсетеді.

RAST бағдарламасының автоматты сипаттауына сәйкес, метаболизмді және басқа функцияларды қоса алғанда, ішкі жүйенің әртүрлі санаттары мен мүмкіндіктерін көруге болады және *P. zharkentensis* ZKZ2^T бактериясының ішкі жүйесін қамтитын ақпарат диаграмма құрастырылды (кесте 28, сурет 35).

Кесте 28 - RAST бағдарламасында *P. zharkentensis* ZKZ2^T және *P. subterraneus* KSR 13^T геномдарының анализ нәтижелері

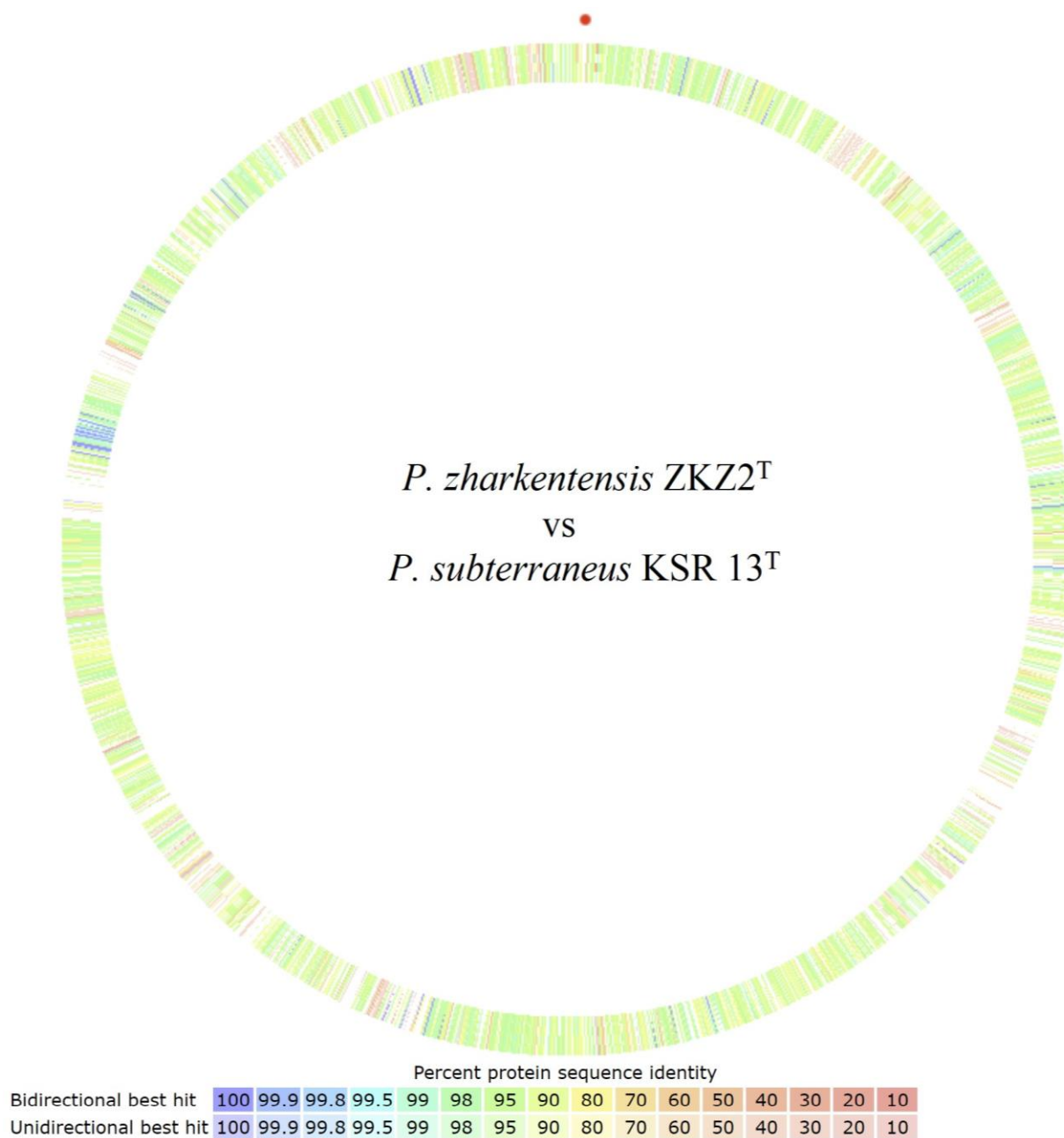
Геном	<i>P. zharkentensis</i> ZKZ2 ^T	<i>P. subterraneus</i> KSR 13 ^T
Өлшемі (нуклеотид жұп)	3, 317, 478	3, 361, 078
ГЦ көлемі (%)	52.5	51.8
N50	224285	114597
L50	5	11
Контингтер саны	22	56
Ішкі жүйелер саны (subsystems)	293	281
CDS саны	4248	3832
РНҚ саны	57	58



Ескерту - Сурет RAST бағдарламасының тілінде жасалған

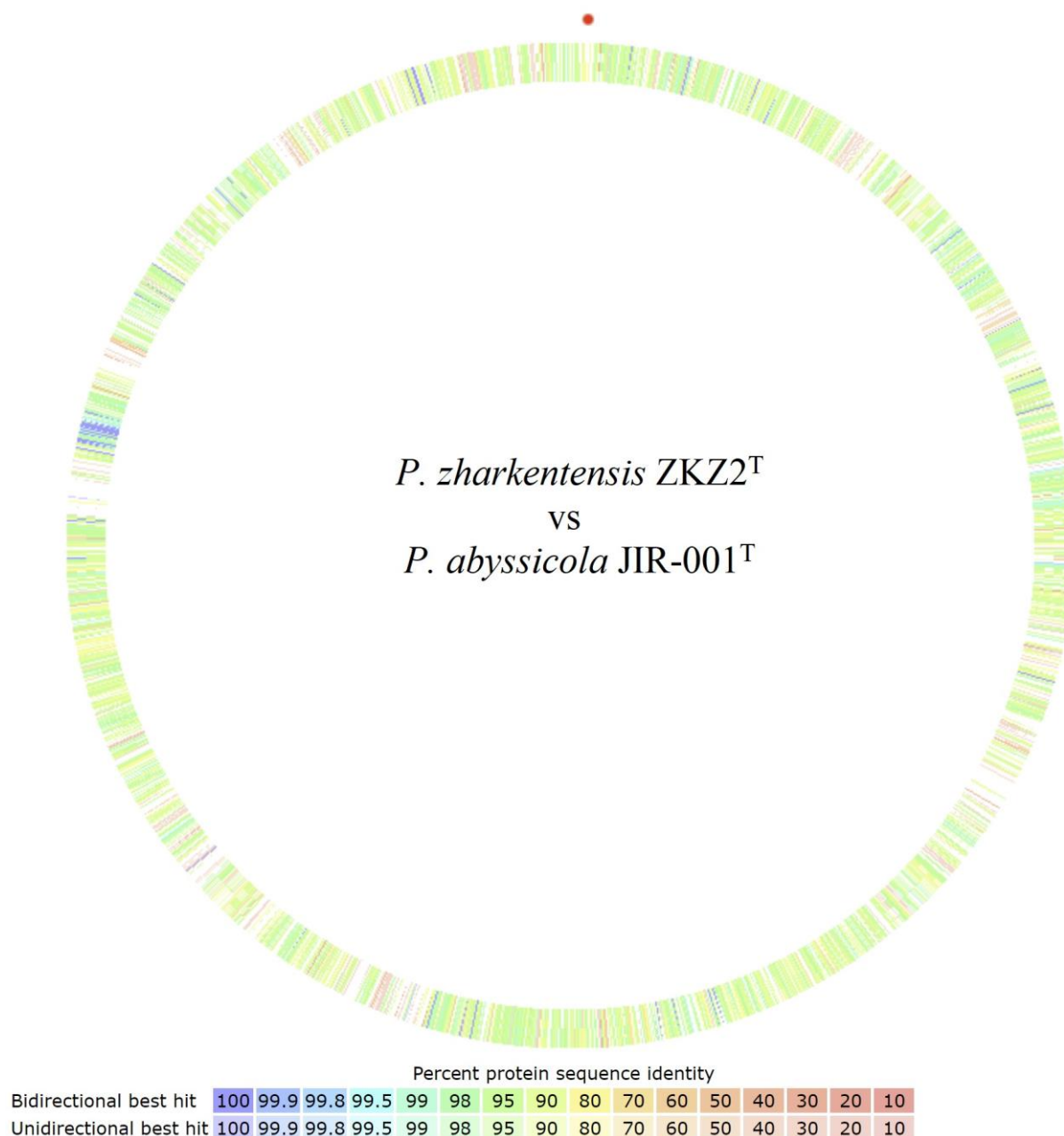
Сурет 35 - RAST бағдарламасында *P. zharkentensis* ZKZ2^T бактериясының ішкі жүйелерінің сипаттамасы

35 суретте *P. zharkentensis* ZKZ2^T бактериясының көміртегінің әртүрлі көздерін пайдалануға қабілеті көрсетілген және оған дәлелді RAST бағдарламасының нәтижесінен де көруге болады, мысалға: көмірсулар алмасуына 239-ға дейін белгілер қатысса, тыныс алуда 63-ке дейінгі белгілер қатысады. Сонымен қатар, вируленттілікке, ауруға, қорғанысқа байланысты және тыныштық пен спора түзуге байланысты ерекшеліктері де бар. RAST бағдарламасында сонымен қатар ZKZ2^T штамның геномын филогенетикалық ең жақын *P. abyssicola* JIR-001^T және *P. subterraneus* KSR 13^T типтік штамдармен тізбектерін салыстыруды орындау үшін пайдаланылды (сурет 36, 37).



Ескерту - Сурет RAST бағдарламасының тілінде жасалған

Сурет 36 - RAST бағдарламасында сипатталған *P. zharkentensis* ZKZ2^T штамымен *P. subterraneus* KSR 13^T типтік штамы геномы арасындағы протеин тізбегінің пайыздық сәйкестігі

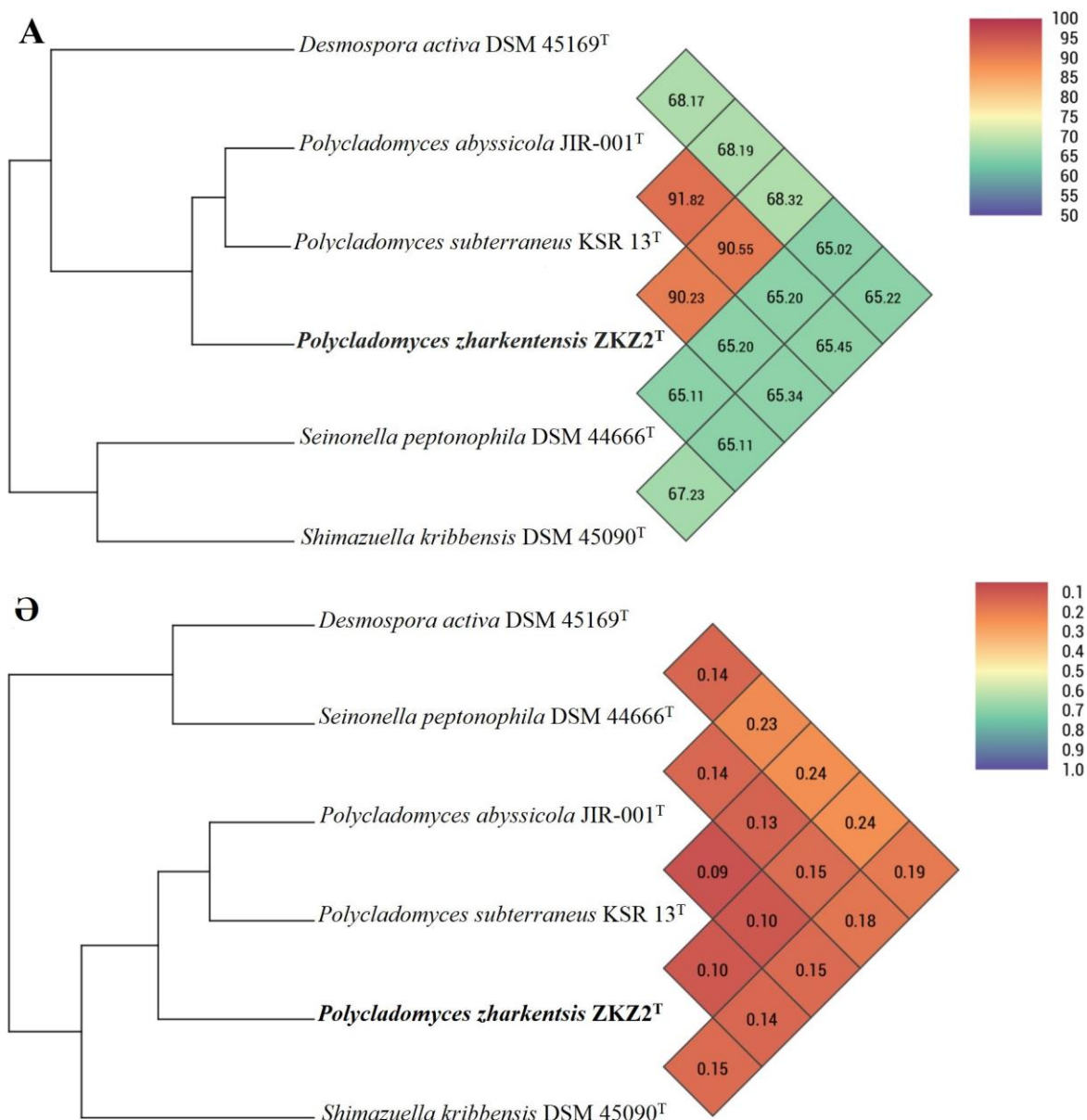


Ескерту - Сурет RAST бағдарламасының тілінде жасалған

Сурет 37 - RAST бағдарламасында сипатталған *P. zharkentensis* ZKZ2^T штамымен *P. abyssicola* JIR-001^T типтік штамы геномы арасындағы ақуыз тізбектерінің пайыздық сәйкестігі

Нәтижесінде ZKZ2^T штамын KSR 13^T типтік штамымен салыстырғанда ақуыздардың 11,2% кемінде 95% тізбек сәйкестігін көрсетті. Ұқсас көрсеткіштерді JIR-001^T типтік штамымен салыстырғанда да алынды (ақуыздардың 12,1% кемінде 95% тізбек сәйкестігін көрсетті). Бұл нәтижелер Жаркенттің геотермалды су көзінен бөлініп алынған *P. zharkentensis* ZKZ2^T бактериясының *Polycladomyces* типтік штамдарының қазіргі уақытта белгілі өкілдеріне ұқсамайтындығын дәлелдейді.

P. zharkentensis ZKZ2^T штамы сонымен бірге *Polycladomyces* тұқымдасының типтік штамдарымен және *Thermoactinomycetaceae* отбасысының жақын түр өкілдерінің геномдары арасында арақашықтық OrthoANI және GGDC бағдарламалары көмегімен есептелді (сурет 38).

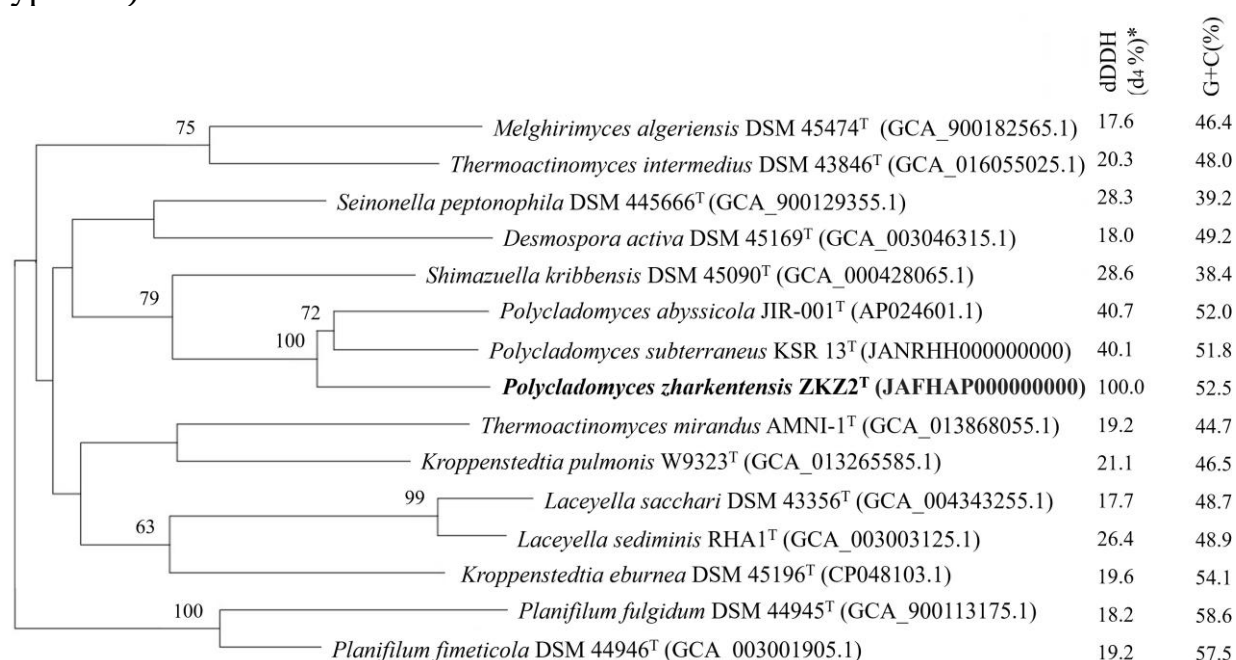


А, OrthoANI және Ә, dDDH мәндері

Сурет 38 - OAT [216] бағдарламасымен құрастырылған ZKZ2^T штамы және *Thermoactinomycetaceae* отбасысының жақын түр өкілдері арасындағы геномдарының арақашық мәндері көрсетілген жылу картасы мен филогентикалық ағашы

P. zharkentensis ZKZ2^T және *P. abyssicola* JIR-001^T арасында OrthoANI мәні 90.55% болса, *P. subterraneus* KSR 13^T арасында 90.23% болды, бұл бір түрге жататын штамдар үшін ұсынылған түрлену шегінен (95–96%) [190] төмен және *P. zharkentensis* ZKZ2^T штамын салыстырылып отырға

Polycladomyces тұқымдасының типтік штамдарының ешқайсысына ұқсамайтынын және оны жаңа түр өкілі екендігін көрсетті (сурет 38, А). Ал, егер *P. abyssicola* JIR-001^T және *P. subterraneus* KSR 13^T арасындағы OrthoANI мәніне қарайтын болсақ, ұқсастық 91.82 құрады, бұл оларды ZKZ2^T штамына қарағанда өзара әлдеқайда филогенетикалық жағынан жақынырақ екендігін дәлелдейді. Осыған ұқсас нәтижені GGDC бағдарламасы көмегімен есептелген dDDH мәні де көрсетті. *P. zharkentensis* ZKZ2^T және *P. abyssicola* JIR-001^T арасында *in silico* GGDC мәні 40.7% (арақашықтығы 0.10) болса, *P. subterraneus* KSR 13^T арасында 40.1% (арақашықтығы 0.10) болды. Бұл да жаңа түрлерді анықтау үшін ұсынылған шекті мәннен (70%) [186] аз нәтиже (сурет 38, Ә). Бұл тұжырымдар қосымша *Thermoactinomycetaceae* отбасысының жақын түр өкілдері кіретін TYGS [186] сервері көмегімен құрастырылған геномға негізделген филогенетикалық ағашта дәлелдей түсті (сурет 39).

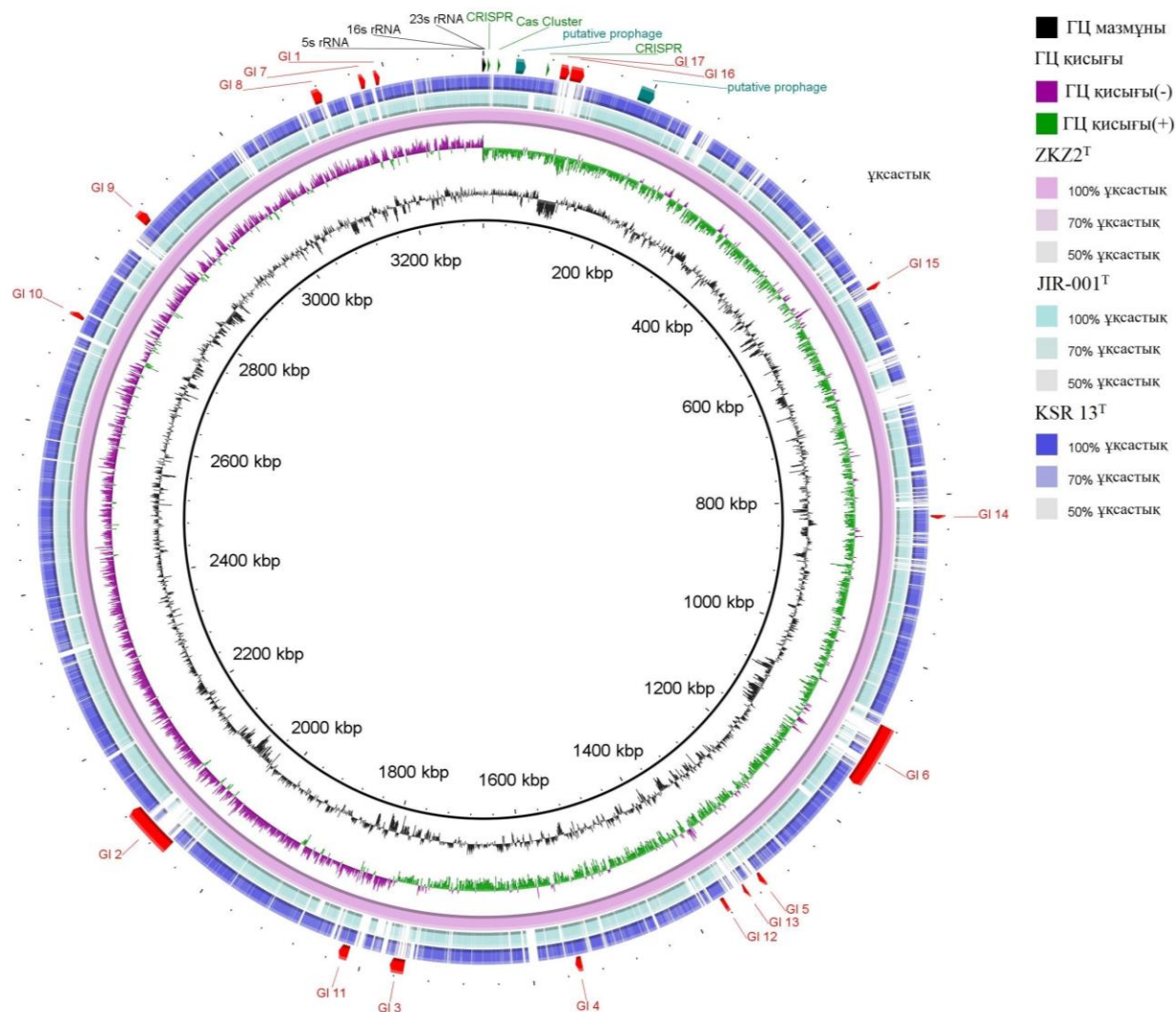


dDDH мәндері (формула 2) және G+C мазмұны суреттің оң жағында көрсетілген

Сурет 39 - *P. zharkentensis* ZKZ2^T штамы және *Thermoactinomycetaceae* отбасының кейбір өкілдерімен құралған филогенетикалық ағаш

39 суретте *Polycladomyces* тұқымдасы бөлек клада құрып *P. zharkentensis* ZKZ2^T штамы *P. abyssicola* JIR-001^T және *P. subterraneus* KSR 13^T штамдарынан ерекшелетіні көрсетілген.

Polycladomyces тұқымдасының типтік штамдарының геномдары көрнекі түрде BRIG [217] бағдарламасын пайдалану арқылы салыстырылды (сурет 40).



Сақиналар іштен сыртқа қарай: ГЦ мазмұны (қара); ГЦ қисығы (-, күлгін; +, жасыл); *P. zharkentensis* штамы ZKZ2^T (қызыл); *P. abyssicola* штамы JIR-001^T (ақшыл көк); *P. subterraneus* штамы KSR 13^T (көк). Сондай-ақ геномдық аралдар (қызыл доғалар), рРНҚ оперондары (қара доғалар), болжамды профагтар (көкшіл) және CRISPR/Cas9 кластерлерінің (жасыл) позициялары көрсетілген. Әрбір сақинадағы түс неғұрлым қарқынды болса, эксперименталды геномға ұқсастық соғұрлым жоғары екендігін көрсетеді

Сурет 40 - *Polycladomyces subterraneus* KSR 13^T, *P. abyssicola* JIR-001^T және *P. zharkentensis* ZKZ2^T бактерия геномдарының сақина түрінде салыстырмалы көрінісі

ZKZ2^T штамының геномын BRIG бағдарламасы үшін эталонды геном ретінде пайдаланудың алдында, контигтер Mauve [183] бағдарламасында *P. abyssicola* JIR-001^T референс геномымен теңестіріліп қайта реттелді. Сонымен бірге, IslandViewer (www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/) веб-серверінің көмегімен 17 болжамды геномдық аралдар (GIs) SIGI-HMM (кодонды пайдалану) және IslandPath (ДНҚ құрамын салыстыру) әдістерімен болжанды [218]. 17 болжамды GI өлшемдері 4,217 ж.н (GI 13) пен 75,931 ж.н (GI 6) дейін аралығында ауытқыды. Ең үлкен GI, атап айтқанда GI 6, 42 генді (олардың 66,7%-ы гипотетикалық ақуыз гендері), ал ең кіші GI, атап айтқанда, GI 13, тек төрт генді қамтыды. Барлық 17 GI ГЦ құрамы 39,8%-52,2% аралығында болды. PHASTER [219], CRISPRCasFinder [220]

бағдарламалары көмегімен екі профаг элементін және үш CRISPR/Cas элементі анықталды.

ZKZ2^T штамының биомассаны ыдырату потенциалын бағалау мақсатында CAZyme-ге [196] кіретін топтары талданды (сурет 41).



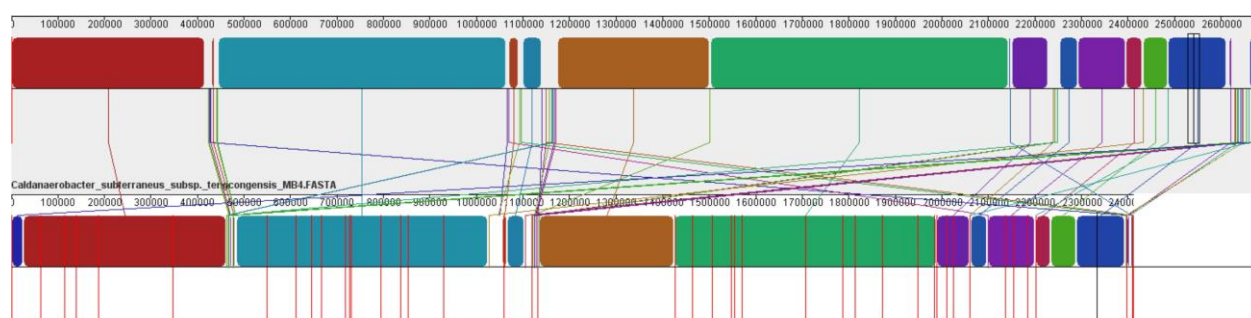
Мұндағы ақшыл (аз) көк түстен қара түске боялу (көп), штамдарда табылған гендердің санын көрсетеді; AA, көмекші көмірсу-активті оксидоредуктаза; GH, гликозидті гидролаза; CE, көмірсутекті эстераза

Сурет 41 - Мақсатты домендер топтарының гендік идентификациясының жылу картасы

Нақты қарастыратын болсақ, dbCAN2 v. 1.8.0 [195] бағдарламасы ZKZ2^T штамының геномында лакказа (EC 1.10.3.2; CAZy AA1), β -глюкозидаза (EC 3.2.1.21; CAZy GH2, GH3, GH16, GH64) және ацетилксилан эстераза (EC 3.1.1.72; CAZy CE1, CE4) ферменттерің кодтайтын гендермен сәйкестік тапты. Лигниннің ыдыратуында лакказа ферментінің рөлі көптеген жұмыстарда көрсетілген және бұл фермент саңырауқұлақ өкілдерінде, сонымен қатар бактерияларда да табылған, атап айтсақ *Bacillus*, *Streptomyces*, *Klebsiella* sp, *Pseudomonas* sp, *Proteobacterium* sp және *Thermus* sp. [86, 87]. β -глюкозидаза ферменті целлюлозаны ыдырататын ферменттердің бірі және ол *Anoxybacillus* sp, *Geobacillus* sp, *Thermotoga* sp [210], сондай-ақ анаэробты термофильді бактерия *Caldicellulosiruptor* [15] өкілдерінде жақсы сипатталған, ал ацетилксилан эстераза гемицеллюлозаның ыдырауына қатысады және *Bacillus subtilis*, *Clostridium thermocellum*, *Cellvibrio japonicus* бактерия өкілдерінде сипатталған [133, 221]. ZKZ2^T штамының геномында dbCAN2 v. 1.8.0 бағдарламасы көмегімен табылған β -глюкозидаза, лакказа және ацетилксилан эстераза ферменттерімен табылған сәйкестік, ZKZ2^T штамының лигноцеллюлозалы биомассасын ыдырату потенциалын және *P.*

zharkentensis ZKZ2^T бактериясын биоотын немесе қағаз өндірістерінде қолдануға болатынын көрсетеді.

Caldanaerobacter sp. KAK. Келесі толық геномы секвенирленген потенциалды жаңа түр іші *Caldanaerobacter* sp. KAK штамы. Жинақталған KAK штамының геномы филогенетикалық ең жақын *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *Tengcongensis* MB4^T типтік штамымен MAUVE [183] бағдарламасында прогрессивті алайман алгоритмін пайдаланып [183] геном қайта реттеліп жиналды (сурет 42).



Түрлі-түсті сызықтар екі геном арасындағы қайта құруларды көрсетеді. Тік қызыл сызықтар контиг шекараларды білдіреді

Сурет 42 - MAUVE бағдарламасы көмегімен жасалған *C. subterraneus* subsp. *Tengcongensis* MB4^T (жоғарғы) және *Caldanaerobacter* sp. KAK геномдары (төменгі) арасындағы нуклеотид тізбектерің теңестіру

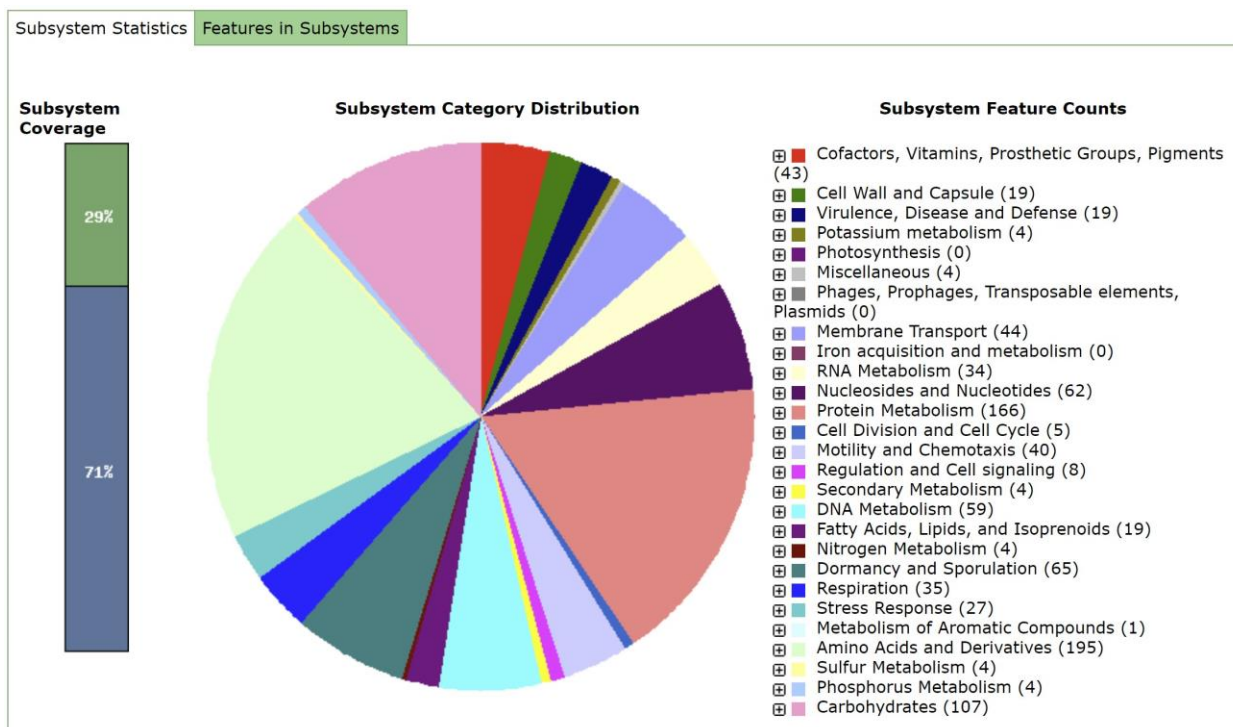
Сонымен, *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *Tengcongensis* MB4^T типтік штамының геномы *Caldanaerobacter* sp. KAK штамының геномынан 264 021 ж.н үлкен екендігі белгілі болды. Нуклеотид тізбектерін теңестіру нәтижесінде геномдар өздерінің құрылымында ұқсастығын көрсетті, бұған 42 суретте түрлі-түсті сызықтармен көрсетілген қайта құрулар дәлел. Дегенмен геномдар арасында түссіз бос орындар *Caldanaerobacter* sp. KAK штамының ерекшеліктін гендерін көрсетеді.

Mauve бағдарламасы көмегімен қайта реттелген *Caldanaerobacter* sp. KAK штамының геномының тізбектерін GenBank қорына жүктеліп JAULJF000000000 тіркеу нөмірі алынды. Геном өлшемі *Caldanaerobacter* sp. KAK үшін 45 контигке бөлінген 2, 464, 036 жұп негізін құрады (кесте 29).

Кесте 29 - RAST бағдарламасында *Caldanaerobacter* sp. KAK геномдық анализ нәтижелері

Геном	<i>Caldanaerobacter</i> sp. KAK
Өлшемі (нуклеотид жұп)	2, 464, 036
ГЦ көлемі (%)	37, 7
N50	77569
L50	9
Контигтер саны	45
Ішкі жүйелер саны (subsystems)	242
CDS саны	2573
pRNК саны	66

RAST бағдарламасының автоматты сипаттауына сәйкес, метаболизмді және басқа функцияларды қоса алғанда, ішкі жүйенің әртүрлі санаттары мен мүмкіндіктерін көруге болатын *Caldanaerobacter sp.* KAK бактериясының ішкі жүйесін қамтитын ақпарат диаграммасы құрастырылды (сурет 43).

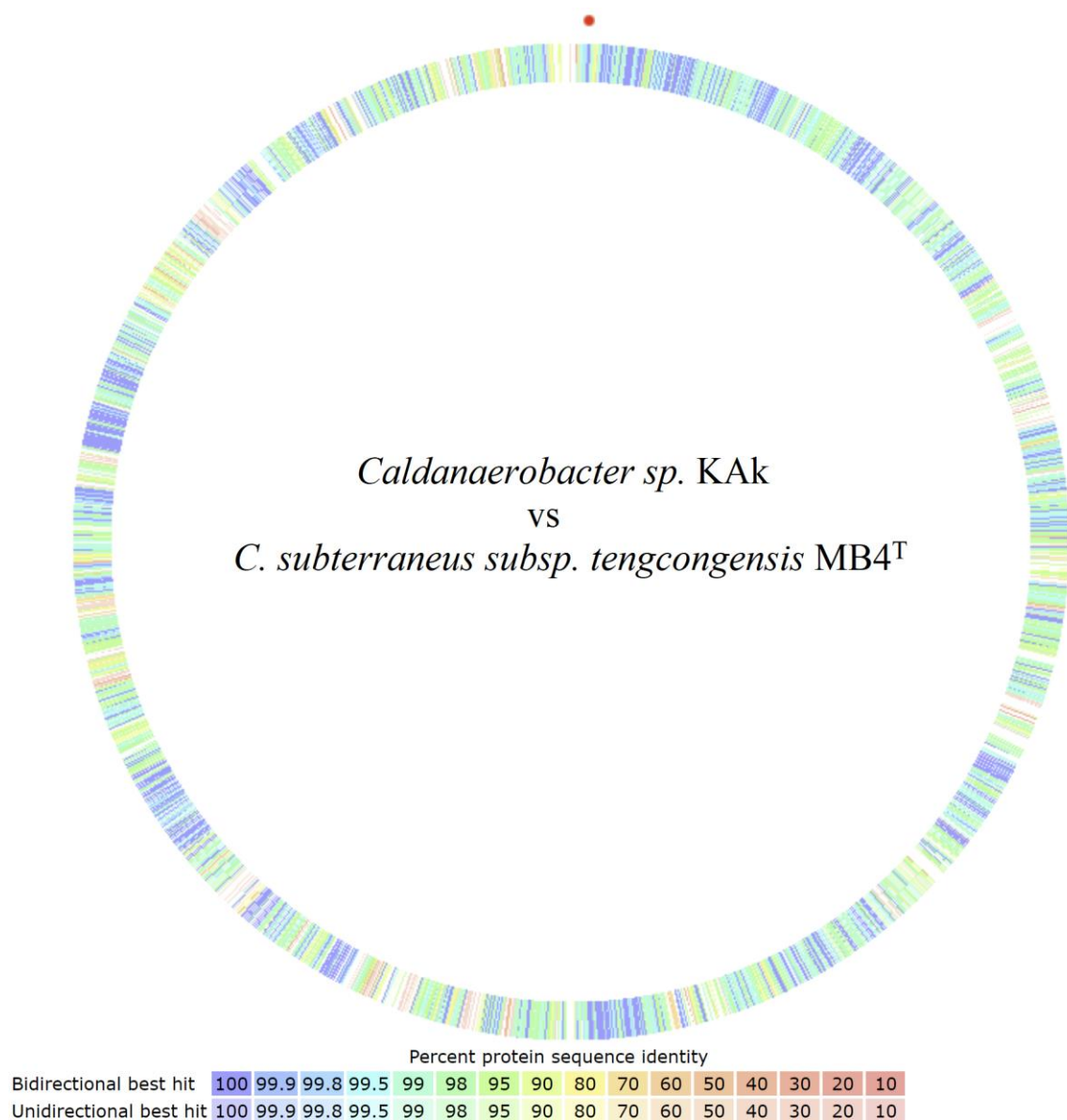


Ескерту - Сурет RAST бағдарламасының тілінде жасалған

Сурет 43 - RAST бағдарламасында *Caldanaerobacter sp.* KAK бактериясының ішкі жүйелер сипаттамасы

Caldanaerobacter бактерияларының өкілдері көміртегінің әртүрлі көздерін пайдалануға қабілеттілігі көптеген жұмыстарда көрсетілген [204, 206] және оған дәлелді RAST бағдарламасымен табылға ішкі жүйелер: мысалы, көмірсулар алмасуына 107-ге дейін функциялар қатысса, тыныс алуда 53, ақуыз ыдыратуға 23 функция қатысады. Сонымен қатар, вируленттілікке, ауруға, қорғанысқа байланысты және тыныштық пен спора түзуге байланысты да ерекшеліктерді байқауға болды.

RAST бағдарламасы KAK штамының геномын филогенетикалық ең жақын *Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis* MB4^T типтік штамымен салыстыруды орындау үшін пайдаланылды (сурет 44).

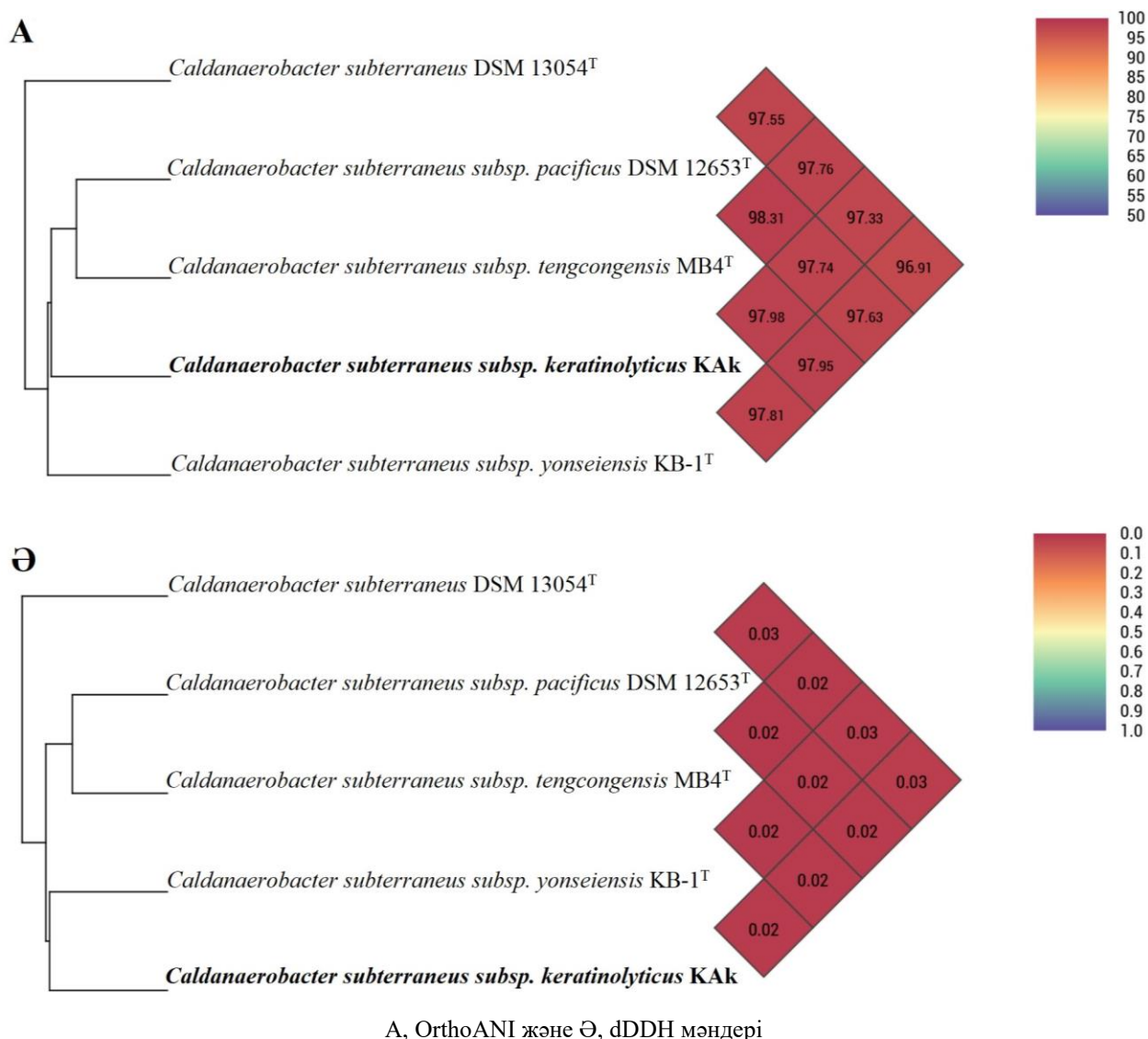


Ескерту - Сурет RAST бағдарламасының тілінде жасалған

Сурет 44 - RAST бағдарламасында сипатталған *Caldanaerobacter sp. KAk* штамымен *C. subterraneus subsp. tengcongensis MB4^T* типтік штамы геномы арасындағы ақуыз тізбектерінің пайыздық сәйкестігі

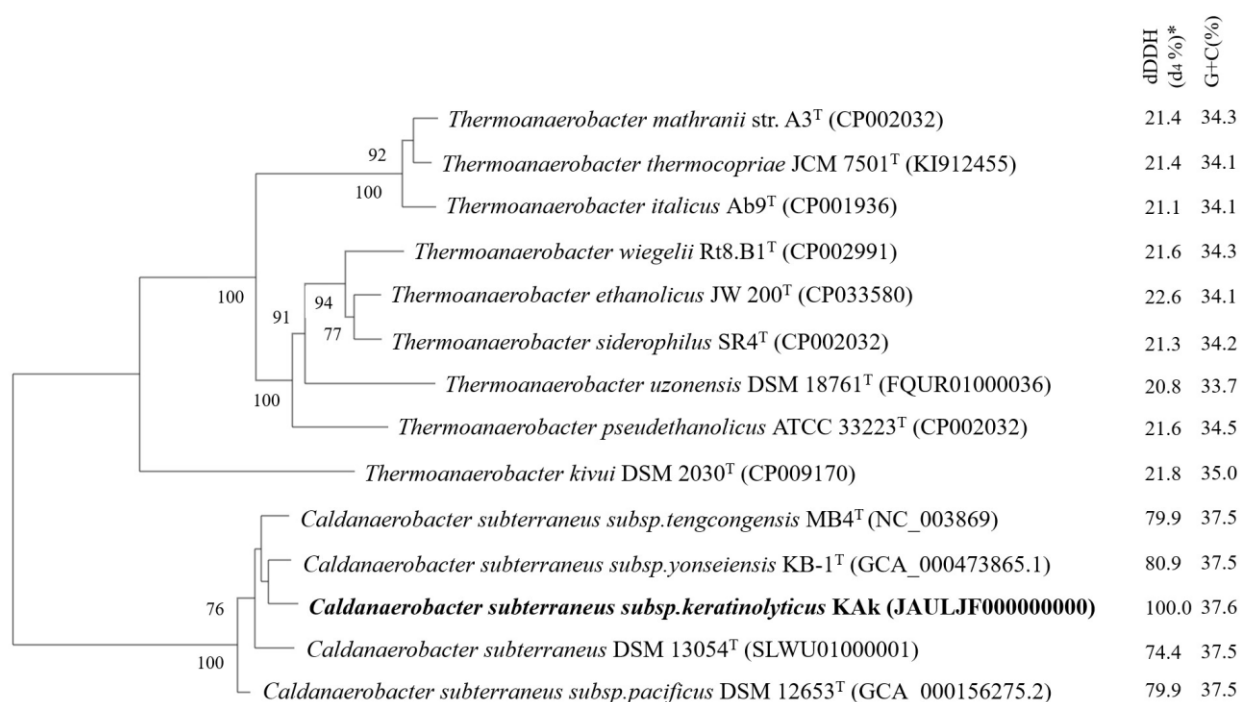
Тізбектерді салыстыру нәтижесінде KAk штамын MB4^T типтік штамымен салыстырғанда орта есеппен 73,2 % ақуыздың кемінде 90-95% аралығында тізбек сәйкестігін көрсетті. Бұл нәтиже *Caldanaerobacter sp. KAk* бактериясының MB4^T типтік штамымен ұқсастығын көрсетеді, бірақ метаболизмдік айырмашылықтары бар екендігін де дәлелдейді.

Caldanaerobacter sp. KAk штамы мен *Caldanaerobacter* тұқымдасының типтік штамдарымен геном негізінде OrthoANI және dDDH арақашықтығы есептелді (сурет 45).



Сурет 45 - ОАТ [216] бағдарламасымен құрастырылған KAK штаммы және *Caldanaerobacter* тұқымдасының типтік штамдарының өкілдері арасындағы геномдарының арақашық мәндері көрсетілген жылу картасы мен филогентикалық ағашы

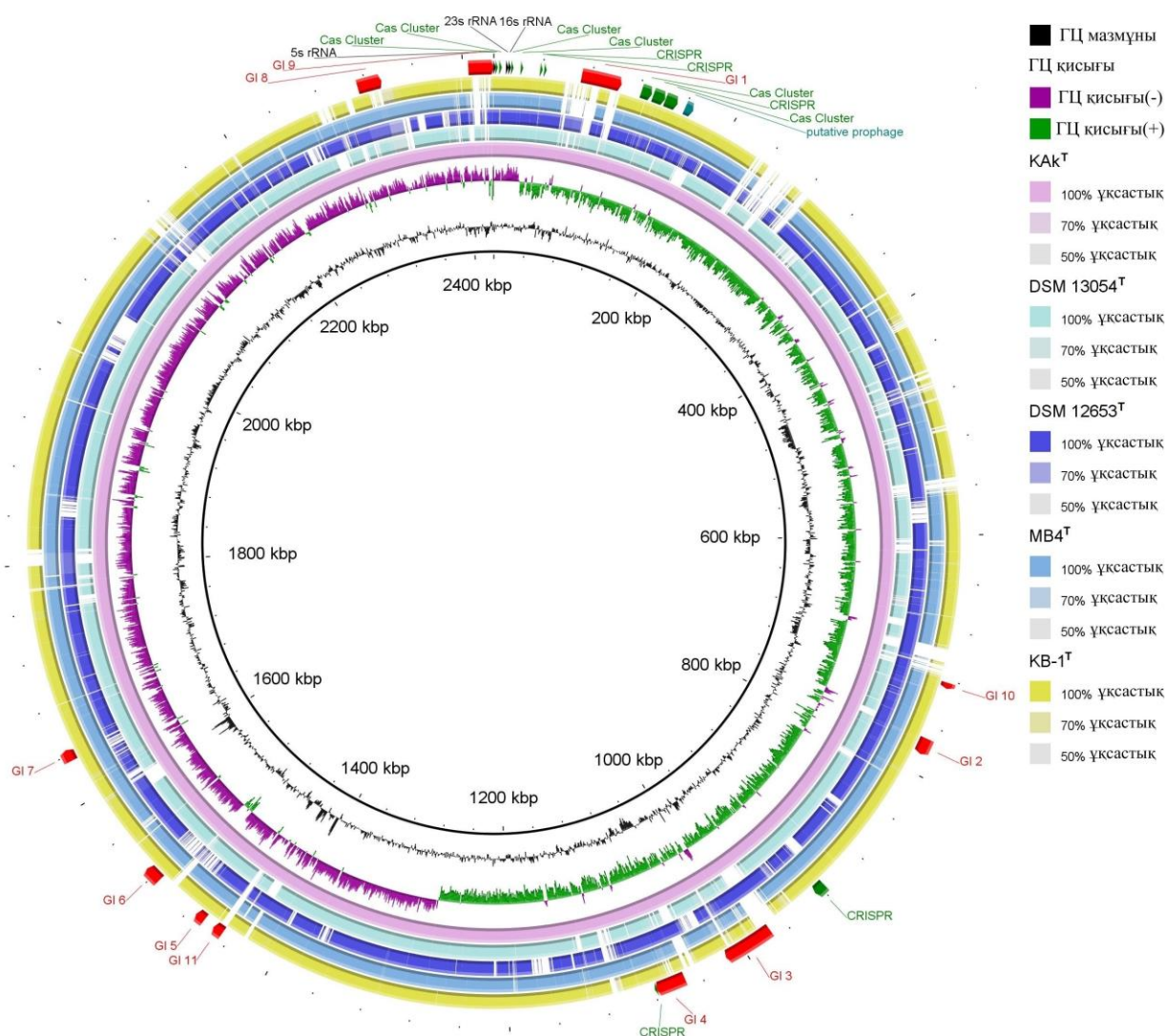
Caldanaerobacter sp. KAK және *C. subterraneus* subsp. *tengcongensis* MB4^T арасында OrthoANI мәні 97.9% болса, басқа өкілдерінің арасында OrthoANI мәні 97.3-97.8 % аралығында болды. Бұл бір түрге жататын штамдар үшін ұсынылған түрлену шегінен (95–96%) [190] жоғары, және *Caldanaerobacter* sp. KAK штамын *Caldanaerobacter* тұқымдасының типтік штамдарына ұқсайтындығын көрсетеді (сурет 45, A). *Caldanaerobacter* sp. KAK және *C. subterraneus* subsp. *tengcongensis* MB4^T арасында dDDH мәні 80.1% (арақашықтығы 0.02) болса, *C. subterraneus* subsp. *yonseiensis* KB-1^T арасында 81.0 (арақашықтығы 0.02) болды (сурет 45, Ө). Бұл тұжырымдар қосымша *Caldanaerobacter* тұқымдасының типтік штамдарының өкілдері кіретін TYGS [186] (<https://tygs.dsmz.de/>) сервері көмегімен құрастырылған геномға негізделген филогенетикалық ағаш айқын көрсетеді (Сурет 46).



Суреттің оң жағында KAK штамына қатысты dDDH бағдарламасының d₄ формуласының мәндері және G+C мазмұны көрсетілген

Сурет 46 - *Caldanaerobacter* KAK штамы және *Thermoanaerobacteraceae* отбасысының кейбір типтік штамдарының өкілдері кіретін толық геномға негізделген филогенетикалық ағаш

Caldanaerobacter тұқымдасының типтік штамдарының геномдарымен KAK штамының геномы өзара BRIG [217] бағдарламасында салыстырылды (сурет 47).



Сақиналар іштен сыртқа қарай: ГЦ мазмұны (қара); ГЦ қисығы (-, күлгін; +, жасыл); *C. subterraneus* subsp.*keratinolyticus* KAK (қызғылт); *C. subterraneus* subsp.*subterraneus* DSM 13054^T (ақшыл көк); *C. subterraneus* subsp.*pacificus* DSM 12653^T (көк); *C. subterraneus* subsp.*tengcongensis* MB4^T (күнгірт көк); *C. subterraneus* subsp.*yongseiensis* KB-1^T (күнгірт сары). Сондай-ақ геномдық аралдар (қызыл доғалар), рРНҚ оперондары (қара доғалар), болжанды профагтар (көкшіл) және CRISPR/Cas9 кластерлерінің (жасыл) позициялары көрсетілген. Өрбір сақинадағы түс неғұрлым қарқынды болса, эксперименталды геномға ұқсастық соғұрлым жоғары екендігін көрсетеді

Сурет 47 - KAK штамы және *Caldanaerobacter* тұқымдасының бактерия геномдарының сақина түрінде салыстырмалы көрінісі

IslandViewer (www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/) веб-серверінде 11 болжамды геномдық аралдар SIGI-HMM (кодонды пайдалану) және IslandPath (ДНҚ құрамын салыстыру) әдістерімен болжанды [218]. 11 болжамды GI өлшемдері 4,935 ж.н (GI 10) пен 33,022 ж.н (GI 1) дейін аралығында ауытқыды. Ең үлкен GI, атап айтқанда GI 1, 30 генді (олардың 85,8%-ы гипотетикалық ақуыз), ал ең кіші GI 10, тек төрт генді қамтыды. Барлық 11 GI ГЦ мазмұны 32,2%-44,2% аралығында ауытқыды бұл KAK штамының геномының орташа ГЦ мазмұнымен салыстырғанда тең жартысы

жоғары болды. PHASTER [219], CRISPRCasFinder [220] бағдарламалары 1 профаг элементін және 11 CRISPR/Cas элементін анықтады (сурет 47).

КАк штамының және *Caldanaerobacter* түр өкілдерінің биомассаны ыдырату потенциалын бағалау мақсатында CAZyme-ге [196] кіретін топтары талданды (сурет 48).



Мұндағы ақшыл (аз) көк түстен қара түске боялу (көп), штамдарда табылған гендердің санын көрсетеді; GH, гликозидті гидролаза; CE, көмірсутекті эстераза

Сурет 48 - Мақсатты домендер топтарының гендік идентификациясының жылу картасы

Нақты қарастыратын болсақ, dbCAN2 v. 1.8.0 [195] бағдарламасы КАк штамының және *Caldanaerobacter* түр өкілдерінің геномдарында ацетилксилаэстераза (EC 3.1.1.72; CAZy CE4), α -галактозидаза (EC 3.2.1.22; CAZy GH36, GH4), экзо-1,4- β -ксилозидаза (EC 3.2.1.37; CAZy GH3), және β -глюкозидаза (EC 3.2.1.21; CAZy GH1, GH2, GH3, GH5, GH30) ферменттерін кодтайтын гендермен сәйкестік тапты. Бұлар целлюлозаның және гемицеллюлозаның ыдырауына қатысатын гендер болып табылады. Бұл гендердің КАк штамының және *Caldanaerobacter* түр өкілдерінің геномдарында кездесуі осы термофильді бактериялардың лигноцеллюлозасы бар шикізат ыдырату үшін қолдануға болатындығын көрсетеді. Бұл нәтижелер Y. Хуе [222] және басқалармен жасалған жұмыста *C. subterraneus subsp. tengcongensis* MB4^T сахаролитикалық белсенділігі көрсетілсе, В.С. Kim т.б. сипатталған [207] зерттеуде *C. subterraneus subsp. yonseiensis* KB-1 штамының ксилозаны ыдырату қасиеті көрсетілген.

ҚОРЫТЫНДЫ

Диссертациялық жұмыстың нәтижелері негізінде төмендегідей тұжырымдар жасалынды:

1. Жаркент геотермалды су көздеріндегі микробтық қауымдастықтарының таксономиялық әралуандылығы алғаш рет жаңа буынды секвенирлеу әдісі көмегімен зерттеліп, нәтижесінде *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus* және *Proteobacteria* бактерия типінің өкілдері осы қауымдастықтың негізін құрайтыны анықталды. Сонымен қатар N2 үлгісін полисахаридтермен инкубациялау кезінде алынған жинақтаушы дақылдарында *Paenibacillus*, *Thermus* және *Geobacillus* бактерия өкілдері басым болды, бұл олардың күрделі полисахаридтерді ыдырату бейімділіктерінің жоғары екеніндігін көрсетеді.

2. Жаркент геотермалды су үлгілерінен бактериялардың таза дақылдары алынды және олар филогенетикалық тұрғыдан *Caldanaerobacter*, *Geobacillus*, *Polycladomyces*, *Anoxybacillus*, *Caldicellulosiruptor* тұқымдастарына жатқызылды. Алғаш рет *Polycladomyces* sp. ZKZ2^T штамы Қазақстанның геотермалдық су көздерінен бөлініп алынды және жаңа термофильді бактерия түрі ретінде сипатталып *Polycladomyces zharkentensis* ZKZ2^T (=CECT 30708^T, =KCTC 43421^T) деген атау берілді. Сонымен қатар, кератиназалық белсенділігі бар жаңа *Caldanaerobacter subterraneus* KAK штамы анықталып, оған *C. subterraneus* subsp. *keratinolyticus* KAK деген атау берілді. Бұл штамм *Caldanaerobacter* түр өкілдерінің ішінде кератиназалық белсенділігі бар алғашқы штамм екені дәлелденді және оның кератин құрамды шикізатты өңдеудегі потенциалы көрсетілді.

3. Зерттеуге алынған термофильді штамдардың ішінен 16 штамның ыстыққа төзімді ферменттер: липазаның (87.5%), протеазаның (68.7%), амилазаның (81.2%), целлюлазаның (87.5%), кератиназаның (6.2%) белсенді продуценттері екендігі анықталды. Солардың ішінде *Geobacillus* 3WAK1, *Geobacillus* 3SAK1, *Geobacillus* 3SAK2, *Geobacillus* 3SAK4, *Geobacillus* 3SAK5, *Geobacillus* 3SAK6 және *Polycladomyces* ZKZ2^T штамдары гидролазаның төрт түрлі ассортиментін түзуге қабілеттілік көрсетті. Термофильді протеаза, целлюлаза, кератиназа, амилаза және липаза белсенділігіне қатысты оң нәтижелер, осы изоляттарды биотехнологияда пайдаланудың мүмкіндігін болжайды.

4. *C. subterraneus* subsp. *keratinolyticus* KAK штамын дақылдауға арналған қоректік орта құрамы оңтайландырылып, ашытқы экстрактысының 0,1% және NaCl 0,4% концентрациялары тиімді екені анықталды. Бұл өз кезегінде кератиназалық белсенділікті жоғарылатып, нәтижесінде KAK штамы ±96 сағат ішінде β-кератинның 98% дейін көлемін ыдыратуға қабілетті болды.

5. *P. zharkentensis* ZKZ2^T және *C. subterraneus* subsp. *keratinolyticus* KAK штамдарының геномдары секвенирленіп, *de nova* жинақталды. Геномдарды сипаттау нәтижесінде кератинның, лигниннің, лигноцеллюлозаның және

гемицеллюлозаның гидролизіне қатысатын лакказа (ЕС 1.10.3.2), β -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21), ацетил-ксилан-эстераза (ЕС 3.1.1.72), экзо-1,4- β -ксилосидаза (ЕС 3.2.1.37), экзо- β -1,4-маннозидаза (ЕС 3.2.1.25) және сериндік протеаза (ЕС 3.4.21.14) ферменттерінің гендері анықталды.

Диссертацияда алға қойылған міндеттердің барлығы толық орындалды.

ПАЙДАЛАНЫЛҖАН ӘДБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 López-López O., Cerdán M.E., González-Siso M.I. Hot spring metagenomics //Life. - 2013. - Vol. 3, No 2. - P. 308-320.
- 2 Kumar L., Awasthi G., Singh B.J.B. Extremophiles: a novel source of industrially important enzymes //Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. - Vol. 10, No 2. - P. 121-35.
- 3 Raddadi N., Cherif A., Daffonchio D., Neifar M., Fava F. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes //Appl. Microbiol. Biotechnol. - Vol. 2015;99, No 19. - P. 7907-7913.
- 4 Elleuche S., Schröder C., Sahm K., Antranikian G. Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms //Curr. Opin. Biotechnol. - 2014. - Vol. 29. P. 116-23.
- 5 Haki G. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review //Bioresour. Technol. - 2003. - Vol. 89, No 1. - P. 17-34.
- 6 Krishnan T., Chandra A.K. Purification and Characterization of α -Amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305 //Appl. Environ. Microbiol. - 1983. - Vol. 46, No 2. - P. 430-437.
- 7 Al-Qodah Z. Production and characterization of thermostable α -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* //Biotechnol. J. - 2006. - Vol. 1, No 7-8. - P. 850-857.
- 8 Selim S.A. Novel thermostable and alkalitolerant amylase production by *Geobacillus stearothermophilus* HP 3 //Nat. Prod. Res. - 2012. - Vol. 26, No 17. - P. 1626-1630.
- 9 Burhanoglu T., Sürmeli Y., Şanlı-Mohamed G. Identification and characterization of novel thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. GS33 //Int. J. Biol. Macromol. - 2020. - Vol. 164. - P. 578-85.
- 10 Antranikian G., Egorova K. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology. In: Physiology and biochemistry of extremophiles //American Society of Microbiology. - 2007. - P. 359-406.
- 11 Chung Y.C., Kobayashi T., Kanai H., Akiba T., Kudo T. Purification and Properties of Extracellular Amylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus profundus* DT5432 //Appl. Environ. Microbiol. - 1995. - Vol. 61, No. 4. - P. 1502-1506.
- 12 Bronnenmeier K., Kern A., Liebl W., Staudenbauer W.L. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials //Appl. Environ. Microbiol. - 1995. - Vol. 61, No 4. - P. 1399-1407.
- 13 Podosokorskaya O.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Novikov A.A., Kolganova T.V., Kublanov I.V. *Ornatilinea apprima* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class Anaerolineae //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2013. - Vol. 63(Pt_1). - P. 86-92.
- 14 Dipasquale L., Romano I., Picariello G., Calandrelli V., Lama L. Characterization of a native cellulase activity from an anaerobic thermophilic

hydrogen-producing bacterium *Thermosipho* sp. strain 3 //Ann. Microbiol. - 2014. - Vol. 64, No 4. - P. 1493-1503.

15 Mladenovska Z., Mathrani I.M., Ahring B.K. Isolation and characterization of *Caldicellulosiruptor lactoaceticus* sp. nov., an extremely thermophilic, cellulolytic, anaerobic bacterium //Arch. Microbiol. - 1995. - Vol. 163, No 3. - P. 223-230.

16 Rainey F.A., Donnison A.M., Janssen P.H., Saul D., Rodrigo A., Bergquist P.L., et al. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov.: An obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium //FEMS Microbiol. Lett. - 1994. - Vol. 120, No 3. - P. 263-266.

17 Nam G.W., Lee D.W., Lee H.S., Lee N.J., Kim B.C., Choe E.A., et al. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe //Arch. Microbiol. - 2002. - Vol. 178, No 6. - P. 538-547.

18 Friedrich A.B., Antranikian G. Keratin Degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a Novel Thermophilic Anaerobic Species of the Order *Thermotogales* //Appl. Environ. Microbiol. - 1996. - Vol. 62, No 8. - P. 2875-2882.

19 Ionata E., Canganella F., Bianconi G., Benno Y., Sakamoto M., Capasso A., et al. A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. *pennavorans* bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds //Microbiol. Res. - 2008. - Vol. 163, No 1. - P. 105-112.

20 Yamaoka A., Kataoka M., Kawasaki K., Kobayashi E., Shigeri Y., Watanabe K. *Meiothermus ruber* H328 enhances the production of membrane vesicles for feather degradation //Biosci., Biotechnol., Biochem. - 2014. - Vol 78, No 9. - P. 1623-1625.

21 Riessen S., Antranikian G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity //Extremophiles. - 2001;5, No 6. - P. 399-408.

22 Khalil A. Isolation and characterization of three thermophilic bacterial strains (lipase, cellulose and amylase producers) from hot springs in Saudi Arabia //Afr. J. Biotechnol. - 2011. - Vol. 10, No 44. - P. 8834-8839.

23 Reysenbach A.L., Wickham G.S., Pace N.R. Phylogenetic Analysis Of The Hyperthermophilic Pink Filament Community In Octopus Spring, Yellowstone-National-Park //Appl. Environ. Microbiol. - 1994. - Vol. 60, No 6. - P. 2113-2119.

24 Slobodkin A., Reysenbach A.L., Mayer F., Wiegel J. Isolation and characterization of the homoacetogenic thermophilic bacterium *Moorella glycerini* sp. nov //Int. J. Syst. Bacteriol. - 1997. - Vol. 47, No 4. - P. 969-974.

25 Huber R., Eder W., Heldwein S., Wanner G., Huber H., Rachel R., et al. *Thermocrinis ruber* gen. nov., sp. nov., a pink-filament-forming hyperthermophilic bacterium isolated from Yellowstone National Park //Appl. Environ. Microbiol. - 1998. - Vol. 64, No 10. - P. 3576-3583.

- 26 Maugeri T.L., Gugliandolo C., Caccamo D., Stackebrandt E. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents //Syst. Appl. Microbiol. - 2001. - Vol. 24, No 4. - P. 572-587.
- 27 Adiguzel A., Ozkan H., Baris O., Inan K., Gulluce M., Sahin F. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey //J. Microbiol. Methods. - 2009. - Vol. 79, No 3. - P. 321-328.
- 28 Derekova A., Mandeva R., Kambourova M. Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs //World J. Microbiol. Biotechnol. - 2008. - Vol. 24, No 9. P. 1697-702.
- 29 Sievert S.M., Ziebis W., Kuever J., Sahm K. Relative abundance of Archaea and Bacteria along a thermal gradient of a shallow-water hydrothermal vent quantified by rRNA slot-blot hybridization //Microbiology. - 2000. - Vol. 146. - P. 1287-93.
- 30 Niederberger T.D., Ronimus R.S., Morgan H.W. The microbial ecology of a high-temperature near-neutral spring situated in Rotorua, New Zealand //Microbiol. Res. - 2008. - Vol. 163, No 5. - P. 594-603.
- 31 Verma A., Gupta M., Shirkot P. Isolation and characterization of thermophilic bacteria in natural hot water springs of Himachal Pradesh (India) //Bioscan. - 2014. - Vol. 9, No 3. - P. 947-52.
- 32 Mashzhan A., Javier-López R., Kistaubayeva A., Savitskaya I., Birkeland N.K. Analysis and Characteristics of Thermal Springs in Kazakhstan. In: Egamberdieva D, Birkeland N-K, Li W-J, Panosyan H, editors. Microbial Communities and their Interactions in the Extreme Environment //Springer Singapore. - 2021. - P. 97-114.
- 33 Lorenz P., Eck J. Metagenomics and industrial applications //Nat. Rev. Microbiol. - 2005. - Vol. 3, No 6. - P. 510-516.
- 34 Giampaoli S., Berti A., Di Maggio R.M., Pilli E., Valentini A., Valeriani F., et al. The environmental biological signature: NGS profiling for forensic comparison of soils //Forensic Sci. Int. - 2014. - Vol. 240. - P. 41-47.
- 35 White R.A., Chan A.M., Gavelis G.S., Leander B.S., Brady A.L., Slater G.F., Lim D.S., Suttle C.A. Metagenomic Analysis Suggests Modern Freshwater Microbialites Harbor a Distinct Core Microbial Community //Front. Microbiol. - 2016. - Vol. 6. - P. 1531.
- 36 Ahmed N., Gilbert J.A., Field D., Huang Y., Edwards R., Li W., Gilna P., Joint I. Detection of Large Numbers of Novel Sequences in the Metatranscriptomes of Complex Marine Microbial Communities //PLoS ONE. - 2008. - Vol. 3, No 8. - P. e3042.
- 37 Lorenz P., Liebeton K., Niehaus F., Eck J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space //Curr. Opin. Biotechnol. - 2002. - Vol. 13, No 6. - P. 572-577.
- 38 Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation //Microbiol Rev. - 1995. - Vol. 59, No 1. - P. 143-169.

39 Chistoserdova L. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology //Biotechnology Letters. - 2010. - Vol. 32, No 10. - P. 1351-1359.

40 Schmidt T.M., DeLong E.F., Pace N.R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing //J. Bacteriol. - 1991. - Vol. 173, No 14. - P. 4371-4378.

41 Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products //Chem. Biol. - 1998. - Vol. 5, No 10. - P. R245-R249.

42 Tyson G.W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E.E., Ram R.J., Richardson P.M., Solovyev V.V., Rubin E.M., Rokhsar D.S., Banfield J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment //Nature. - 2004. - Vol. 428, No 6978. - P. 37-43.

43 Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., Fouts D.E., Levy S., Knap A.H., Lomas M.W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y.H., Smith H.O. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea //Science. - 2004. - Vol. 304, No 5667. - P. 66-74.

44 Handelsman J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms //Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 2004. - Vol. 68, No 4. - P. 669-685.

45 Riesenfeld C.S., Goodman R.M., Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes //Environ. Microbiol. - 2004. - Vol. 6, No 9. - P. 981-989.

46 Steele H.L., Jaeger K-E., Daniel R., Streit W.R. Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes //J. Mol. Microbiol. Biotechnol. - 2009. - Vol. 16, No 1-2. - P. 25-37.

47 Simon C., Daniel R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends //Appl. Environ. Microbiol. - 2011. - Vol. 77, No 4. - P. 1153-1161.

48 Béjà O., Aravind L., Koonin E.V., Suzuki M.T., Hadd A., Nguyen L.P., Jovanovich S.B., Gates C.M., Feldman R.A., Spudich J.L., Spudich E.N., DeLong E.F. Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea //Science. - 2000. - Vol. 289, No 5486. - P. 1902-1906.

49 Nicol G.W., Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? //Trends Microbiol. - 2006. - Vol. 14, No 5. - P. 207-212.

50 Scholz M.B., Lo C-C., Chain P.S.G. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis //Curr. Opin. Biotechnol. - 2012. - Vol. 23, No 1. - P. 9-15.

51 Droge J., McHardy A.C. Taxonomic binning of metagenome samples generated by next-generation sequencing technologies //Briefings Bioinf. - 2012. - Vol. 13, No 6. - P. 646-655.

52 Mande S.S., Mohammed M.H., Ghosh T.S. Classification of metagenomic sequences: methods and challenges //Briefings Bioinf. - 2012. - Vol. 13, No 6. - P. 669-681.

53 Chivian D., Jungbluth S.P., Dehal P.S., Wood-Charlson E.M., Canon R.S., Allen B.H., Clark M.M., Gu T., Land M.L., Price G.A., Riehl W.J., Sneddon M.W., Sutormin R., Zhang Q., Cottingham R.W., Henry C.S., Arkin A.P. Metagenome-assembled genome extraction and analysis from microbiomes using KBase //Nat. Protoc. - 2022. - Vol. 18, No 1. - P. 208-238.

54 Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards R.A. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes //BMC Bioinf. - 2008. - Vol. 9, No 9. - P. 386.

55 Markowitz V.M., Ivanova N.N., Szeto E., Palaniappan K., Chu K., Dalevi D., Chen I.M., Grechkin Y., Dubchak I., Anderson I., Lykidis A., Mavromatis K., Hugenholtz P., Kyrpides N.C. IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes //Nucleic Acids Res. - 2007. - Vol. 36. - P. D534-D538.

56 Sun S., Chen J., Li W., Altintas I., Lin A., Peltier S., Stocks K., Allen E.E., Ellisman M., Grethe J., Wooley J. Community cyberinfrastructure for Advanced Microbial Ecology Research and Analysis: the CAMERA resource //Nucleic Acids Res. - 2010. - Vol. 39. - P. D546-D51.

57 Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus* //J. Bacteriol. - 1976. - Vol. 127, No 3. - P. 1550-1557.

58 Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase //Science. - 1988. - Vol. 239, No 4839. - P. 487-491.

59 Inskeep W., Jay Z.J., Tringe S.G., Herrgård M.J., Rusch D.B. The YNP metagenome project: environmental parameters responsible for microbial distribution in the Yellowstone geothermal ecosystem //Front. Microbiol. - 2013. - Vol. 4. - P. 67.

60 Miller S.R., Strong A.L., Jones K.L., Ungerer M.C. Bar-Coded Pyrosequencing Reveals Shared Bacterial Community Properties along the Temperature Gradients of Two Alkaline Hot Springs in Yellowstone National Park //Appl. Environ. Microbiol. - 2009. - Vol. 75, No 13. - P. 4565-4572.

61 Hobel C.F.V., Marteinson V.T., Hreggvidsson G.O., Kristjánsson J.K. Investigation of the Microbial Ecology of Intertidal Hot Springs by Using Diversity Analysis of 16S rRNA and Chitinase Genes //Appl. Environ. Microbiol. - 2005. - Vol. 71, No 5. - P. 2771-2776.

62 Meyer-Dombard D.R., Shock E.L., Amend J.P. Archaeal and bacterial communities in geochemically diverse hot springs of Yellowstone National Park, USA //Geobiology. - 2005. - Vol. 3, No 3. - P. 211-227.

63 Rozanov A.S., Bryanskaya A.V., Malup T.K., Meshcheryakova I.A., Lazareva E.V., Taran O.P., Ivanisenko T.V., Ivanisenko V.A., Zhmodik S.M., Kolchanov N.A., Peltek S.E. Molecular analysis of the benthos microbial community in Zavarzin thermal spring (Uzon Caldera, Kamchatka, Russia) //BMC Genomics. - 2014. - Vol. 15, No S12. - P. S12.

64 Mashzhan A., Javier-López R., Kistaubayeva A., Savitskaya I., Birkeland N.K. Metagenomics and Culture-Based Diversity Analysis of the Bacterial Community in the Zharkent Geothermal Spring in Kazakhstan //Curr. Microbiol. - 2021. - Vol. 78, No 8. - P. 2926-2934.

65 Valverde A., Tuffin M., Cowan D.A. Biogeography of bacterial communities in hot springs: a focus on the actinobacteria //Extremophiles. - 2012. - Vol. 16, No 4. - P. 669-679.

66 Mardanov A.V., Gumerov V.M., Beletsky A.V., Perevalova A.A., Karpov G.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V. Uncultured archaea dominate in the thermal groundwater of Uzon Caldera, Kamchatka //Extremophiles. - 2011. - Vol. 15, No 3. - P. 365-372.

67 Badger J.H., Jiménez D.J., Andreote F.D., Chaves D., Montaña J.S., Osorio-Forero C., Junca H., Zambrano M.M., Baena S. Structural and Functional Insights from the Metagenome of an Acidic Hot Spring Microbial Planktonic Community in the Colombian Andes //PLoS ONE. - 2012. - Vol. 7, No 12. - P. e52069.

68 Leis B., Angelov A., Liebl W. Screening and Expression of Genes from Metagenomes //Adv. Appl. Microbiol. - 2013. - Vol. 83. - P. 1-68.

69 Urbietta M.S., Donati E.R., Chan K-G., Shahar S., Sin L.L., Goh K.M. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications //Biotechnol. Adv. - 2015. - Vol. 33, No 6. - P. 633-647.

70 van Wolferen M., Ajon M., Driessen A.J.M., Albers S-V. How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions //Extremophiles. - 2013. - Vol. 17, No 4. - P. 545-563.

71 Rothschild L.J., Mancinelli R.L. Life in extreme environments //Nature. - 2001. Vol. 409, No 6823. - P. 1092-1101.

72 Stetter K.O. Extremophiles and their adaptation to hot environments //FEBS Lett. - 1999. - Vol. 452, No 1-2. - P. 22-25.

73 Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H.W., Stetter K.O. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C //Extremophiles. - 1997. - Vol. 1, No 1. - P. 14-21.

74 DiPippo J.L., Nesbo C.L., Dahle H., Doolittle W.F., Birkland N.K., Noll K.M. *Kosmotoga olearia* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic heterotroph isolated from an oil production fluid //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2009. - Vol. 59, No 12. - P. 2991-3000.

75 Kublanov I.V., Prokofeva M.I., Kostrikina N.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Wiegel J., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermoanaerobacterium aciditolerans* sp. nov., a moderate thermoacidophile from a Kamchatka hot spring //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2007. - Vol. 57, No 2. - P. 260-264.

76 Liu S.Y., Rainey F.A., Morgan H.W., Mayer F., Wiegel J. *Thermoanaerobacterium aotearoense* sp. nov., a Slightly Acidophilic, Anaerobic Thermophile Isolated from Various Hot Springs in New Zealand, and Emendation

of the Genus *Thermoanaerobacterium* //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 1996. - Vol. 46, No 2. - P. 388-396.

77 Plumb J.J., Haddad C.M., Gibson J.A.E., Franzmann P.D. *Acidianus sulfidivorans* sp. nov., an extremely acidophilic, thermophilic archaeon isolated from a solfatara on Lihir Island, Papua New Guinea, and emendation of the genus description //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2007. - Vol. 57, No 7. - P. 1418-1423.

78 Schleifer K-H. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology //Springer. - 2009. - P. 19-1317.

79 Kotelnikova S.V., Obraztsova A.Y., Gongadze G.M., Laurinavichius K.S. *Methanobacterium thermoflexum* sp. nov. and *Methanobacterium defluvii* sp. nov., Thermophilic Rod-Shaped Methanogens Isolated from Anaerobic Digester Sludge //Syst. Appl. Microbiol. - 1993. - Vol. 16, No 3. - P. 427-435.

80 Li Y., Mandelco L., Wiegel J. Isolation and Characterization of a Moderately Thermophilic Anaerobic Alkaliphile, *Clostridium paradoxum* sp. nov //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 1993. - Vol. 43, No 3. - P. 450-60.

81 Li Y., Engle M., Weiss N., Mandelco L., Wiegel J. *Clostridium thermoalcaliphilum* sp. nov., an Anaerobic and Thermotolerant Facultative Alkaliphile //Int. J. Syst. Bacteriol. - 1994. - Vol. 44, No 1. - P. 111-118.

82 Mesbah N.M., Hedrick D.B., Peacock A.D., Rohde M., Wiegel J. *Natranaerobius thermophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae* fam. nov. and *Natranaerobiales* ord. nov //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2007. - Vol. 57, No 11. - P. 2507-2512.

83 Canganella F., Wiegel J. Anaerobic Thermophiles //Life. - 2014. - Vol. 4, No 1. - P. 77-104.

84 Wagner I.D., Wiegel J. Diversity of Thermophilic Anaerobes //Annals of the New York Academy of Sciences. - 2008. - Vol. 1125, No 1. - P. 1-43.

85 Amend J.P., Shock E.L. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria //FEMS Microbiol. Rev. - 2001. - Vol. 25, No 2. - P. 175-243.

86 Adrio J.L., Demain A.L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes //Biomolecules. - 2014. - Vol. 4, No 1. - P. 117-139.

87 Cowan D.A. Industrial enzymes //Biotechnology, the Science and the Business. - 1991. - P. 311-340.

88 Suh H.J., Lee H.K. Characterization of a Keratinolytic Serine Protease from *Bacillus subtilis* KS-1 //J. Protein Chem. - 2001. - Vol, 20, No 2. - P. 165-169.

89 Manczinger L., Rozs M., Vágvölgyi C., Kevei F. Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain //World J. Microbiol. Biotechnol. - 2003. - Vol. 19, No 1. - P. 35-39.

90 Balaji S., Senthil Kumar M., Karthikeyan R., Kumar R., Kirubanandan S., Sridhar R., Sehgal P.K. Purification and characterization of an extracellular

keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102) //World J. Microbiol. Biotechnol. - 2008. - Vol. 24, No 11. - P. 2741-2745.

91 Cai C-g., Chen J-s., Qi J-j., Yin Y., Zheng X-d. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain //J. Zhejiang Univ., Sci., B. - 2008. - Vol. 9, No 9. - P. 713-720.

92 Werlang P.O., Brandelli A. Characterization of a Novel Feather-Degrading *Bacillus* sp. strain //Appl. Biochem. Biotechnol. - 2005. - Vol. 120, No 1. - P. 71-80.

93 Lin X., Lee C-G., Casale E.S., Shih J.C.H. Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* Strain //Appl. Environ. Microbiol. - 1992. Vol. 58, No 10. - P. 3271-3275.

94 Takami H., Nogi Y., Horikoshi K. Reidentification of the keratinase-producing facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans* //Extremophiles. - 1999. - Vol. 3, No 4. - P. 293-296.

95 Gessesse A., Hatti-Kaul R., Gashe B.A., Mattiasson B. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather //Enzyme Microb. Technol. - 2003. - Vol. 32, No 5. - P. 519-524.

96 Kojima M., Kanai M., Tominaga M., Kitazume S., Inoue A., Horikoshi K. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01 //Extremophiles. - 2006. - Vol. 10, No 3. - P. 229-235.

97 Gousterova A., Braikova D., Goshev I., Christov P., Tishinov K., Vasileva-Tonkova E., Haertlé P.N. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis //Lett. Appl. Microbiol. - 2005. - Vol. 40, No 5. - P. 335-340.

98 Syed D.G., Lee J.C., Li W-J., Kim C-J., Agasar D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis* //Bioresour. Technol. - 2009. - Vol. 100, No 5. - P. 1868-1871.

99 Chitte R.R., Nalawade V.K., Dey S. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8 //Lett. Appl. Microbiol. - 2002. - Vol. 28, No 2. - P. 131-136.

100 Mohamedin A.H. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease-producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate //Int. Biodeterior. Biodegrad. - 1999. - Vol. 43, No 1-2. - P. 13-21.

101 Tsirolnikov K., Rezai H., Bonch-Osmolovskaya E., Nedkov P., Gousterova A., Cueff V., Godfroy A., Barbier G., Métro F., Chobert J.M., Clayette P., Dormont D., Grosclaude J., Haertlé T. Hydrolysis of the Amyloid Prion Protein and Nonpathogenic Meat and Bone Meal by Anaerobic Thermophilic Prokaryotes and *Streptomyces* Subspecies //J. Agric. Food Chem. - 2004. - Vol. 52, No 20. - P. 6353-6360.

102 Arpigny J.L., Jaeger K-E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties //Biochem. J. - 1999. - Vol. 343, No 1. - P. 177-183.

103. Egorova K., Antranikian G. Industrial relevance of thermophilic Archaea. //Curr. Opin. Microbiol. - 2005. - Vol. 8, No 6. - P. 649-655.

- 104 Ikeda M., Clark D.S. Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* //Biotechnol. Bioeng. - 1998. - Vol. 57, No 5. - P. 624-629.
- 105 Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R., Wolfe R.S. Methanogens: reevaluation of a unique biological group //Microbiol. Rev. - 1979. - Vol. 43, No 2. - P. 260-296.
- 106 Gooday G.W. The Ecology of Chitin Degradation. In: Marshall, K.C. (eds) /Advances in Microbial Ecology. Springer, Boston, MA. - 1990. - Vol. 11. - P. 387-430.
- 107 Kaiser K., Benner R. Major bacterial contribution to the ocean reservoir of detrital organic carbon and nitrogen //Limnol. Oceanogr. - 2008. - Vol. 53, No 1. - P. 99-112.
- 108 Huber R., Stetter K.O. Discovery of hyperthermophilic microorganisms //Methods Enzymol. - 2001. - Vol. 330. - P. 11-24.
- 109 Štrojsová M., Vrba J. Direct detection of digestive enzymes in planktonic rotifers using enzyme-labelled fluorescence (ELF) //Mar. Freshwater Res. - 2005. - Vol. 56, No 2.
- 110 Štrojsová A., Dyhrman S.T. Cell-specific β -N-acetylglucosaminidase activity in cultures and field populations of eukaryotic marine phytoplankton //FEMS Microbiol. Ecol. - 2008. - Vol. 64, No 3. - P. 351-361.
- 111 Andronopoulou E., Vorgias C.E. Isolation, cloning, and overexpression of a chitinase gene fragment from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*: semi-denaturing purification of the recombinant peptide and investigation of its relation with other chitinases //Protein Expression Purif. - 2004. - Vol. 35, No 2. - P. 264-271.
- 112 Foophow T., Tanaka S., Koga Y., Takano K., Kanaya S. Subtilisin-like serine protease from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* with N- and C-terminal propeptides //Protein Eng., Des. Sel. - 2010. - Vol. 23, No 5. - P. 347-355.
- 113 Gao J., Bauer M.W., Shockley K.R., Pysz M.A., Kelly R.M. Growth of Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* on Chitin Involves Two Family 18 Chitinases //Appl. Environ. Microbiol. - 2003. - Vol. 69, No 6. - P. 3119-3128.
- 114 Glass M., Barkwill S., Unda F., Mansfield S.D. Endo- β -1,4-glucanases impact plant cell wall development by influencing cellulose crystallization //J. Integr. Plant Biol. - 2015. - Vol. 57, No 4. - P. 396-410.
- 115 Shokatayeva D., Ignatova L., Savitskaya I., Kistaubaeva A., Talipova A., Asylbekova A., Mashzhan A. Bacterial Cellulose and Pullulan from Simple and Low Cost Production Media //Eurasian Chem.-Technol. J. - 2019. - Vol. 21, No 3. - P. 247-258.
- 116 Powell M.J. Chytridiomycota. In: Archibald J., Simpson A., Slamovits C. (eds) Handbook of the Protists //Springer, Cham. - 2017. - P. 1523-1558.
- 117 Bennett J.W., Feibelman T. Fungal Bacterial Interactions. In: Hock B. (eds) Fungal Associations. The Mycota //Springer, Berlin. - 2001. - Vol. 9. - P. 229-42.

- 118 Hreggvidsson G.O., Kaiste E., Holst O., Eggertsson G., Palsdottir A., Kristjansson J.K. An Extremely Thermostable Cellulase from the Thermophilic Eubacterium *Rhodothermus marinus* //Appl. Environ. Microbiol. - 1996. - Vol. 62, No 8. - P. 3047-3049.
- 119 Connors S.B., Mongodin E.F., Johnson M.R., Montero C.I., Nelson K.E., Kelly R.M. Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic Thermotogaspecies //FEMS Microbiol. Rev. - 2006. - Vol. 30, No 6. - P. 872-905.
- 120 Blumer-Schuette S.E., Giannone R.J., Zurawski J.V., Ozdemir I., Ma Q., Yin Y., Xu Y., Kataeva I., Poole F.L. 2nd, Adams M.W., Hamilton-Brehm S.D., Elkins J.G., Larimer F.W., Land M.L., Hauser L.J., Cottingham R.W., Hettich R.L., Kelly R.M. *Caldicellulosiruptor* Core and Pangenomes Reveal Determinants for Noncellulosomal Thermophilic Deconstruction of Plant Biomass //J. Bacteriol. - 2012. - Vol. 194, No 15. - P. 4015-4028.
- 121 Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class Ignavibacteria, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae* //Environ. Microbiol. - 2013. - Vol. 15, No 6. - P. 1759-1771.
- 122 Antoine E., Cilia V., Meunier J.R., Guezennec J., Lesongeur F., Barbier G. *Thermosipho melanesiensis* sp. nov., a New Thermophilic Anaerobic Bacterium Belonging to the Order *Thermotogales*, Isolated from Deep-Sea Hydrothermal Vents in the Southwestern Pacific Ocean //Int. J. Syst. Bacteriol. - 1997. - Vol. 47, No 4. - P. 1118-1123.
- 123 Ando S., Ishida H., Kosugi Y., Ishikawa K. Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii* //Appl. Environ. Microbiol. - 2002. - Vol. 68, No 1. - P. 430-433.
- 124 Högbom M., Stenmark P.I., Voevodskaya N., McClarty G., Gräslund A., Nordlund P. The Radical Site in Chlamydial Ribonucleotide Reductase Defines a New R2 Subclass //Science. - 2004. - Vol. 305, No 5681. - P. 245-248.
- 125 Perevalova A.A., Svetlichny V.A., Kublanov I.V., Chernyh N.A., Kostrikina N.A., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Desulfurococcus fermentans* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon from a Kamchatka hot spring, and emended description of the genus *Desulfurococcus* //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2005. - Vol. 55, No 3. - P. 995-999.
- 126 Satyanarayana T., Littlechild J., Kawarabayasi Y. Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: biotechnology of thermophiles. Second edition. edn. Dordrecht //Springer. - 2013. - P. 23-24.
- 127 Li S., Zhong H., Hu Y., Zhao J., He Z., Gu G. Bioleaching of a low-grade nickel-copper sulfide by mixture of four thermophiles //Bioresour. Technol. - 2014. - Vol. 153. P. 300-306.

- 128 Sar P., Kazy S.K., Paul D., Sarkar A. Metal Bioremediation by Thermophilic Microorganisms. In: Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology //Springer, Dordrecht. - 2013. - P. 171-201.
- 129 Chatterjee S.K, Bhattacharjee I., Chandra G. Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans* //J. Hazard. Mater. - 2010. - Vol. 175, No 1-3. - P. 117-125.
- 130 Scully S., Orlygsson J. Recent Advances in Second Generation Ethanol Production by Thermophilic Bacteria //Energies. - 2014. - Vol. 8, No 1. - P. 1-30.
- 131 Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W.W., Short J.M., Sorge J.A., Mathur E.J. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus* //Gene.- 1991. - Vol. 108, No 1. - P. 1-6.
- 132 Mattila P., Korpela J., Tenkanen T., Pitkämä K. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase—an extremely heat stable enzyme with proofreading activity //Nucleic Acids Res. - 1991. - Vol. 19, No 18. - P. 4967-4973.
- 133 de Miguel Bouzas T., Barros-Velazquez J., Gonzalez Villa T. Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review //Protein Pept. Lett. - 2006. - Vol. 13, No 7. - P. 645-651.
- 134 Turner P., Mamo G., Karlsson E.N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining //Microb. Cell Fact. - 2007. - Vol. 6, No 1. - P. 1-23.
- 135 Jaeger K. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology //Trends Biotechnol. - 1998. - Vol. 16, No 9. - P. 396-403.
- 136 Butt M.S., Tahir-Nadeem M., Ahmad Z., Sultan M.T. Xylanases and their applications in baking industry //Food Technol. Biotechnol. - 2008. - Vol. 46, No 1. - P. 22-31.
- 137 Dervilly G. Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt //Carbohydr. Polym. - 2002. - Vol. 47, No 2. - P. 143-149.
- 138 Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2001. - Vol. 56, No 3-4. - P. 326-338.
- 139 Aam B.B., Heggset E.B., Norberg A.L., Sørli M., Vårum K.M., Eijsink V.G.H. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine //Mar. Drugs. - 2010. - Vol. 8, No 5. - P. 1482-1517.
- 140 Ravi Kumar M.N.V. A review of chitin and chitosan applications //React. Funct. Polym. - 2000. - Vol. 46, No 1. - P. 1-27.
- 141 Shahidi F., Arachchi J.K.V., Jeon Y-J. Food applications of chitin and chitosans //Trends Food Sci. Technol. - 1999. - Vol. 10, No 2. - P. 37-51.
- 142 Stacey G., Shibuya N. Chitin recognition in rice and legumes //Plant Soil. -1997. - Vol. 194, No 1/2. - P. 161-169.

- 143 Kato Y., Onishi H., Machida Y. Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field //Curr. Pharm. Biotechnol. - 2003. - Vol. 4, No 5. - P. 303-309.
- 144 Peniche-Covas C., Alvarez L.W., Argüelles-Monal W. The adsorption of mercuric ions by chitosan //J. Appl. Polym. Sci. - 1992. - Vol. 46, No 7. - P. 1147-1150.
- 145 Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - Vol. 51, No 6. - P. 711-729.
- 146 De Toni C.H., Richter M.F., Chagas J.R., Henriques J.A., Termignoni C. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain //Can. J. Microbiol. - 2002. - Vol. 48, No 4. - P. 342-348.
- 147 Rouse J.G., Van Dyke M.E. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications //Materials. - 2010. - Vol. 3, No 2. - P. 999-1014.
- 148 Fuciños P., Pastrana L., Sanromán A., Longo M.A., Hermoso J.A., Rúa M.L. An esterase from *Thermus thermophilus* HB27 with hyperthermoalkalophilic properties: Purification, characterisation and structural modelling //J. Mol. Catal. B: Enzym. - 2011. - Vol. 70, No 3-4. - P. 127-137.
149. Kubo M., Imanaka T. Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* //J. Gen. Microbiol. - 1988. - Vol. 134, No 7. - P. 1883-1892.
- 150 Zhu Y., Li H., Ni H., Xiao A., Li L., Cai H. Molecular cloning and characterization of a thermostable lipase from deep-sea thermophile *Geobacillus* sp. EPT9 //World J. Microbiol. Biotechnol. - 2015. - Vol. 31, No 2. - P. 295-306.
- 151 Shao H., Xu L., Yan Y. Biochemical Characterization of a Carboxylesterase from the Archaeon *Pyrobaculum* sp. 1860 and a Rational Explanation of Its Substrate Specificity and Thermostability //Int. J. of Mol. Sci. - 2014. - Vol. 15, No 9. - P. 16885-16910.
- 152 DeCastro M.E., Rodriguez-Belmonte E., Gonzalez-Siso M.I. Metagenomics of Thermophiles with a Focus on Discovery of Novel Thermozyms //Front. Microbiol. - 2016. - Vol. 7. - P. 1521.
- 153 Macy J.M., Snellen J.E., Hungate R.E. Use of syringe methods for anaerobiosis //Am. J. Clin. Nutr. - 1972. - Vol. 25, No 12. - P. 1318-1323.
- 154 Wehr H.M., Frank J.F., Association A.P.H. Standard methods for the examination of dairy products //American Public Health Association Washington, DC. - 2004. - P. 38-39.
- 155 Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine //Curr. Microbiol. - 2008. - Vol. 57, No 5. - P. 503-507.
- 156 Kim H.K., Park S.Y., Lee J.K., Oh T.K. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1 //Biosci., Biotechnol., Biochem. - 1998. - Vol. 62, No 1. - P. 66-71.

- 157 Hossain T.J., Chowdhury S.I., Mozumder H.A., Chowdhury M.N.A., Ali F., Rahman N., Dey S. Hydrolytic Exoenzymes Produced by Bacteria Isolated and Identified From the Gastrointestinal Tract of Bombay Duck //Front. Microbiol. - 2020. - Vol. 11. - P. 2097.
- 158 Mashzhan A.S., Birkeland NK., Kistaubaeva A.S., Talipova A.B., Batykova Z.K., Mussabekov Z.T. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Zharkent geothermal hot spring //EURASIAN JOURNAL of Ecology. 2019. - Vol. 58, No 1. - P. 4-23.
- 159 Arkin A.P., Cottingham R.W., Henry C.S., Harris N.L., Stevens R.L., Maslov S., et al. KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase //Nat. Biotechnol. - 2018. - Vol. 36, No 7. - P. 566-569.
- 160 Li D., Liu C-M., Luo R., Sadakane K., Lam T-W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph //Bioinformatics.- 2015. - Vol. 31, No 10. - P. 1674-1676.
- 161 Peng Y., Leung H.C.M., Yiu S.M., Chin F.Y.L. IDBA-UD: a *de novo* assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth //Bioinformatics. - 2012. - Vol. 28. No 11. - P. 1420-1428.
- 162 Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler //Genome Res. - 2017. - Vol. 27, No 5. - P. 824-834.
- 163 Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies //Bioinformatics. - 2013. - Vol. 29, No 8. - P. 1072-1075.
- 164 Wu Y-W., Simmons B.A., Singer S.W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets //Bioinformatics. - 2016. - Vol. 32, No 4. - P. 605-607.
- 165 Alneberg J., Bjarnason B.S., de Bruijn I., Schirmer M., Quick J., Ijaz U.Z., Lahti L., Loman N.J., Andersson A.F., Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition //Nat. Methods. - 2014. - Vol. 11, No 11. - P. 1144-1146.
- 166 Kang D.D., Li F., Kirton E., Thomas A., Egan R., An H., Wang Z. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies //PeerJ. - 2019. - Vol. 7. - P. e7359.
- 167 Sieber C.M.K., Probst A.J., Sharrar A., Thomas B.C., Hess M., Tringe S.G., Banfield J.F. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy //Nat. Microbiol. - 2018. - Vol. 3, No 7. - P. 836-843.
- 168 Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes //Genome Res.-2015. -Vol. 25, No 7.-P. 1043-1055.
- 169 Overbeek R., Olson R., Pusch G.D., Olsen G.J., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Parrello B., Shukla M., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F., Stevens R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using

Subsystems Technology (RAST) //Nucleic Acids Res. - 2014. - Vol. 42. - P. D206-D214.

170 Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation //Bioinformatics. - 2014. - Vol. 30, No 14. - P. 2068-2069.

171 Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H., Hancock J. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database //Bioinformatics. - 2019. - Vol. 15;36, No 6. - P. 1925-1927.

172 Haft D.H., DiCuccio M., Badretdin A., Brover V., Chetvernin V., O'Neill K., Li W., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Gonzales N.R., Gwadz M., Lu F., Marchler G.H., Song J.S., Thanki N., Yamashita R.A., Zheng C., Thibaud-Nissen F., Geer L.Y., Marchler-Bauer A., Pruitt K.D. RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation //Nucleic Acids Res. - 2018. - Vol. 46. - P. D851-D860.

173 Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank //Nucleic Acids Res.- 2017.-Vol. 45.- P. D37-D42.

174 Galperin M.Y., Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database //Nucleic Acids Res. - 2015. - Vol. 43. - P. D261-D269.

175 Shaffer M., Borton M.A., McGivern B.B., Zayed A.A., La Rosa Sabina L., Solden L.M., Liu P., Narrowe A.B., Rodríguez-Ramos J., Bolduc B., Gazitúa M.C., Daly R.A., Smith G.J., Vik D.R., Pope P.B., Sullivan M.B., Roux S., Wrighton K.C. DRAM for distilling microbial metabolism to automate the curation of microbiome function //Nucleic Acids Res. -2020.-Vol. 48, No 16.-P. 8883-8900.

176 Eddy S.R. Accelerated Profile HMM Searches //PLoS Comput. Biol. - 2011. - Vol. 7, No 10. - P. e1002195.

177 Woese C.R., Gutell R., Gupta R., Noller H.F. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids //Microbiol. Rev. - 1983. - Vol. 47, No 4. - P. 621-669.

178 Peake I. The polymerase chain reaction //J. Clin. Pathol. - 1989. - Vol. 42, No 7. P. 673-676.

179 Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms //Mol Biol Evol. - 2018. - Vol. 35, No 6. - P. 1547-1549.

180 Rice P., Longden I., Bleasby A. EMBOSS: The European molecular biology open software suite //Trends in Genetics.-2000.-Vol. 16, No 6.-P. 276-277.

181 Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput //Nucleic Acids Res. - 2004. - Vol. 32, No 5. - P. 1792-1797.

182 Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees //Mol. Biol. Evol. - 1993. - Vol. 10, No 3. - P. 512-526.

183 Darling A.C.E., Mau B., Blattner F.R., Perna N.T. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements //Genome Res. - 2004. - Vol. 14, No 7. - P. 1394-1403.

- 184 Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions //BMC Bioinf. - 2013. - Vol. 14, No 1. - P. 60.
- 185 Meier-Kolthoff J.P., Carbasse J.S., Peinado-Olarte R.L., Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes //Nucleic Acids Res. - 2022.-Vol. 50. -P. D801-D807.
- 186 Meier-Kolthoff J.P., Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy //Nat. Commun. - 2019. - Vol. 10, No 1. - P. 2182.
- 187 Rodriguez-R.L.M., Konstantinidis T. Bypassing Cultivation To Identify Bacterial Species: Culture-independent genomic approaches identify credibly distinct clusters, avoid cultivation bias, and provide true insights into microbial species //Microbe Magazine. - 2014. - Vol. 9. P. 111-118.
- 188 Stothard P., Wishart D.S. Circular genome visualization and exploration using CGView //Bioinformatics. - 2004. - Vol. 21, No 4. - P. 537-539.
- 189 Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool //J. Mol. Biol. - 1990. - Vol. 215, No 3. - P. 403-410.
- 190 Yoon S-H., Ha S-m., Lim J., Kwon S., Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity //Antonie van Leeuwenhoek. - 2017. - Vol. 110, No 10. - P. 1281-1286.
- 191 Poon A.F.Y., Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2 - Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments //PLoS ONE. - 2010. - Vol. 5, No 3. - P. e9490.
- 192 Efremov R.G., Baradaran R., Sazanov L.A. The architecture of respiratory complex I //Nature. - 2010. - Vol. 465, No 7297. - P. 441-445.
- 193 Oyedotun K.S., Lemire B.D. The Quaternary Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Succinate Dehydrogenase //J. Biol. Chem. - 2004. - Vol. 279, No 10. - P. 9424-9431.
- 194 Dibrova D.V., Galperin M.Y., Mulkidjanian A.Y. Characterization of the N-ATPase, a distinct, laterally transferred Na⁺-translocating form of the bacterial F-type membrane ATPase //Bioinformatics. - 2010. - Vol. 26, No 12. - P. 1473-1476.
- 195 Zhang H., Yohe T., Huang L., Entwistle S., Wu P., Yang Z., Busk P.K., Xu Y., Yin Y. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation //Nucleic Acids Res. - 2018. - Vol. 46, No W1. - P. W95-W101.
- 196 Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 //Nucleic Acids Res. - 2014. - Vol. 42, No D1. - P. D490-D495.
- 197 Kaushal G., Kumar J., Sangwan R.S., Singh S.P. Metagenomic analysis of geothermal water reservoir sites exploring carbohydrate-related thermozymes //Int. J. Biol. Macromol. - 2018. - Vol. 119. - P. 882-895.
- 198 Sharma N., Kumar J., Abedin M.M., Sahoo D., Pandey A., Rai A.K., Singh SP. Metagenomics revealing molecular profiling of community structure and

metabolic pathways in natural hot springs of the Sikkim Himalaya //BMC Microbiol. - 2020. - Vol. 20, No 1. - P. 246.

199 Panda M.K., Sahu M.K., Tayung K. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India //Iran. J. Microbiol. - 2013. - Vol. 5, No 2. - P. 159-165.

200 Huang Q., Dong C.Z., Dong R.M., Jiang H., Wang S., Wang G., Fang B., Ding X., Niu L., Li X., Zhang C., Dong H. Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China //Extremophiles. - 2011. - Vol. 15, No 5. - P. 549-563.

201 Goh K.M., Kahar U.M., Chai Y.Y., Chong C.S., Chai K.P., Ranjani V., Illias R., Chan K.G. Recent discoveries and applications of Anoxybacillus //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2013. - Vol. 97, No 4. - P. 1475-1488.

202 Tsubouchi T., Shimane Y., Mori K., Usui K., Hiraki T., Tame A., Uematsu K., Maruyama T., Hatada Y. *Polycladomyces abyssicola* gen. nov., sp. nov., a thermophilic filamentous bacterium isolated from hemipelagic sediment //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2013. - Vol. 63. - P. 1972-1981.

203 Maneewong N., Sakdapetsiri C., Suriyachadkun C., Shibata C., Tamura T., Tokuyama S., Kitpreechavanich V. *Polycladomyces subterraneus* sp. nov., isolated from soil in Thailand //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2017. - Vol. 67, No 9. - P. 3323-3328.

204 Kozina I.V., Kublanov I.V., Kolganova T.V., Chernyh N.A., 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, No 6. - P. 1372-1375.

205 Fardeau M.L., Magot M., Patel B.K., Thomas P., Garcia J.L., Ollivier B. *Thermoanaerobacter subterraneus* sp. nov., a novel thermophile isolated from oilfield water //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2000. - Vol. 50. - P. 2141-2149.

206 Fardeau M.L., Salinas M.B., L'Haridon S., Jeanthon C., Verhé F., Cayol J.L., Patel B.K.C., Garcia J.L., Ollivier B. Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydibrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2004. - Vol. 54, No 2. - P. 467-474.

207 Kim B.C., Grote R., Lee D.W., Antranikian G., Pyun Y.R. *Thermoanaerobacter yonseiensis* sp. nov., a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 degrees C //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2001. - Vol. 51, No 4. - P. 1539-1548.

208 Sokolova T.G., González J.M., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Tourova T.P., Kato C., Bonch-Osmolovskaya E.A., Robb F.T. *Carboxydobrachium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, CO-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2001. - Vol. 51, No 1. - P. 141-149.

209 Onyenwoke R.U., Lee Y.J., Dabrowski S., Ahring B.K., Wiegel J. Reclassification of *Thermoanaerobium acetigenum* as *Caldicellulosiruptor acetigenus* comb. nov. and emendation of the genus description //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2006. - Vol. 56, No 6. - P. 1391-1395.

210 Yang S.J., Kataeva I., Wiegel J., Yin Y., Dam P., Xu Y., Westpheling J., Adams M.W.W. Classification of *Anaerocellum thermophilum* strain DSM 6725 as *Caldicellulosiruptor bescii* sp. nov //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2010. - Vol. 60, No 9. - P. 2011-2015.

211 Машжан А.С., Измукан А.Ж., Токтырова Д., Кистаубаева А.С., Биркеланд Н. Скрининг и выделение спорообразующих термофильных бактерий из Жаркентского термального источника //Вестник серия экологическая. - 2020. - Т. 64, № 3. - С. 23-34.

212 Liya S.M., Umesh M., Nag A., Chinnathambi A., Alharbi S.A., Jhanani G.K., Shanmugam S., Brindhadevi K. Optimized production of keratinolytic proteases from *Bacillus tropicus* LS27 and its application as a sustainable alternative for dehairing, destaining and metal recovery //Environ. Res. - 2023. - Vol. 221, No 221. - P. 115283.

213 Novik G., Savich V., Meerovskaya O. *Geobacillus* Bacteria: Potential Commercial Applications in Industry, Bioremediation, and Bioenergy Production. In: Growing and Handling of Bacterial Cultures //IntechOpen. - 2019. - P. 58-96.

214 Assareh R., Shahbani Z.H, Akbari N.K, Aminzadeh S., Bakhshi K.G. Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws //Bioresour Technol. - 2012. - Vol. 120. P. 99-105.

215 Suzuki H. Peculiarities and biotechnological potential of environmental adaptation by *Geobacillus* species //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2018. - Vol. 102, No 24. - P. 10425-10437.

216 Lee I., Ouk K.Y., Park S.C., Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2016. - Vol. 66, No 2. - P. 1100-1103.

217 Alikhan N.F., Petty N.K., Ben Zakour N.L., Beatson S.A. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons //BMC Genomics. - 2011. - Vol. 8, No 12. P. 402.

218 Bertelli C., Laird M.R., Williams K.P., Simon Fraser University Research Computing G., Lau B.Y, Hoad G, et al. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets //Nucleic Acids Res. - 2017. - Vol. 45, No W1. - P. W30-W5.

219 Arndt D., Grant J.R., Marcu A., Sajed T., Pon A., Liang Y., Wishart D.S. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool //Nucleic Acids Res. - 2016. - Vol. 44, No W1. - P. W16-W21.

220 Couvin D., Bernheim A., Toffano-Nioche C., Touchon M., Michalik J., Neron B., Rocha E.P.C., Vergnaud G., Gautheret D., Pourcel C. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version,

enhanced performance and integrates search for Cas proteins //Nucleic Acids Res. - 2018. - Vol. 46, No W1. - P. W246-W251.

221 Coolbear T., Daniel R., Morgan H. The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. In: Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells //Springer. - 1992. P. 57-98.

222 Xue Y., Xu Y., Liu Y., Ma Y., Zhou P. *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov., a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2001. - Vol. 51, No 4. - P. 1335-1341.

ҚОСЫМША А



Korean Collection for Type Cultures (KCTC)

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB)

181 Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeonbuk 56212, South Korea

Tel: +82-63-570-5602, FAX: +82-63-570-5609, E-mail: deposit@kribb.re.kr

Certificate of Deposit

Ref.: 20220250

Date of issue: APR 6 2022

Taxonomic designation : *Polycladomyces* sp.

Accession number : **KCTC 43421**

Depositor(s) : Mashzhan Akzhigit, Aida Kistaubayeva,
Nils Kaare Birkeland

Strain code by the depositor(s) : **ZKZ2**

The above microorganism has been successfully deposited into the general collection of microorganism of the Korean Collection for Type Cultures (KCTC) and confirmed the identity of the microorganism under this KCTC number.

This microorganism will be available without restrictions for research and academic purposes in the publicly accessible section of the KCTC. It will be included in published and online catalogues after publication of this number by the authors.

Curator of Bacteria

Na-Ri Shin, Ph.D.

Telephone: +82-63-570-5616

Fax: +82-63-570-5609

E-mail: nrshin@kribb.re.kr

ҚОСЫМША Ә



SPANISH TYPE CULTURE COLLECTION

Parc Científic Universitat de València
Catedrático Agustín Escardino, 9
46980 Paterna (Valencia). España
CIF/EORI: ESQ4618001D
<http://www.uv.es/cect>



CERTIFICATE OF DEPOSIT

11-10-2022

Strain ZKZ2 was deposited in the CECT as

Polycladomyces sp.

by

Nils-Kare Birkeland, and Akzhigit Mashzhan

University of Bergen. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Department of
Biological Sciences

Norway

on 20-09-2022

and was accessioned CECT 30708

This strain has been checked for viability, purity and authenticity in the CECT facilities and it has been preserved using standard methods. It is publicly available without restrictions for taxonomic purposes.

ҚОСЫМША Б

Секвенирлеу түрі	Штамм/үлгі нөмірлері	GenBank нөмірі
16s рРНҚ	<i>Anoxybacillus</i> 3SAk6	OR755649
	<i>Anoxybacillus</i> 3SAk7	OR755650
	<i>Anoxybacillus</i> 3SAk8	OR755651
	<i>Anoxybacillus</i> 3SAk9	OR755652
	<i>Anoxybacillus</i> 3SAk10	OR755653
	<i>Polycladomyces zharkentensis</i> ZKZ2 ^T	OR351227
	<i>Caldanaerobacter subterraneus subsp.keratinolyticus</i> KAK	OQ843466
	<i>Geobacillus</i> 3SAk1	MW485510.2
	<i>Geobacillus</i> 3SAk2	MW485512.1
	<i>Geobacillus</i> 3SAk3	MW485515.1
	<i>Geobacillus</i> 3SAk4	MW485516.2
	<i>Geobacillus</i> 3SAk5	MW485517.2
	<i>Geobacillus</i> 3WAK1	MW485511.2
	<i>Geobacillus</i> 3WAK2	MW485513.2
	<i>Geobacillus</i> 3WAK3	MW485514.2
	<i>Caldicellulosiruptor</i> SAK	OR755661
Толық геном	<i>Polycladomyces zharkentensis</i> ZKZ2 ^T	JAFHAP000000000
	<i>Polycladomyces subterraneus</i> KSR 13 ^T	JANRH000000000
	<i>Caldanaerobacter subterraneus subsp.keratinolyticus</i> KAK	JAULJF000000000
Метагеном	N1	SRR26870416
	N2	SPP14001913
	N1_an	SRR26870414
	N1_ae	SRR26870415

ҚОСЫМША В

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ		РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН
REPUBLIC OF KAZAKHSTAN		
ПАТЕНТ PATENT		
№ <u>5803</u>		
ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL		
	(21) 2020/1048.2 (22) 20.11.2020 (45) 29.01.2021	
(54) КЕРАТИНОЛИТИКАЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІ БАР АНАЭРОБТЫ ТЕРМОФИЛЬДІ МИКРООРГАНИЗМДЕРДІ ӨСІРУГЕ АРНАЛҒАН ҚОРЕКТІК ОРТА ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АНАЭРОБНЫХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ CULTURE MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF ANAEROBIC THERMOPHILIC MICROORGANISMS WITH KERATINOLYTIC ACTIVITY (73) Кистаубаева Аида Сериковна (KZ); Машжан Ақжігіт Сембайұлы (KZ); Савицкая Ирина Станиславовна (KZ); Абдулжанова Малика Анварбековна (KZ); Бисенбай Акерке Онғарбайқызы (KZ); Құли Жансая Тілеубердіқызы (KZ); Kistaubayeva Aida Serikovna (KZ); Mashzhan Akzhigit Sembayuly (KZ); Savitskaya Irina Stanislavovna (KZ); Abdulzhanova Malika Anvarbegovna (KZ); Bissenbay Akerke Ongarbaykyzy (KZ); Kuli Zhansaya Tileuberdikyzy (KZ) (72) Машжан Ақжігіт Сембайұлы (KZ) Кистаубаева Аида Сериковна (KZ) Савицкая Ирина Станиславовна (KZ) Абдулжанова Малика Анварбековна (KZ) Бисенбай Акерке Онғарбайқызы (KZ) Құли Жансая Тілеубердіқызы (KZ) Mashzhan Akzhigit Sembayuly (KZ) Kistaubayeva Aida Serikovna (KZ) Savitskaya Irina Stanislavovna (KZ) Abdulzhanova Malika Anvarbegovna (KZ) Bissenbay Akerke Ongarbaykyzy (KZ) Kuli Zhansaya Tileuberdikyzy (KZ)		
		
ЭЦҚ қол қойылды Подписано ЭЦП Signed with EDS		Е. Оспанов Е. Оспанов Y. Ospanov
«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМҚ директоры Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности» Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE		

ҚОСЫМША Г

