На правах рукописи

КАРАСЕВА АЛИНА ИГОРЕВНА

НОВЫЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЛИНИИ И СВОЙСТВА ТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот Отдела биологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель:	**Кочеткова Татьяна Вячеславовна,** к.б.н., с.н.с. лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот ФИЦ Биотехнологии РАН
Официальные оппоненты:	**Грабович Маргарита Юрьевна,** д.б.н., профессор по специальности «Микробиология», профессор кафедры биохимии и физиологии клетки медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» **Лукина Анастасия Петровна,** к.б.н., заведующий лабораторией микробных технологий, доцент кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики, с.н.с. лаборатории биохимии и молекулярной биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится **17 декабря 2026 года в 14-00** на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.2.) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН: https://www.fbras.ru/dissertacionnyj-sovet-po-mikrobiologii.html.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года.

Ученый секретарь диссертационного совета доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Археи представляют наименее изученный домен жизни из-за относительно недавнего открытия этой группы, и особенно трудностей их культивирования. Они относятся к прокариотам, но значительно отличаются от бактерий, а на молекулярном уровне имеют много общих сходств с эукариотами. Археи играют важную роль в геохимических циклах и обнаруживаются как свободноживущими, так и в качестве симбионтов [Wolferen et al., 2022]. Большая часть культивируемых архей – экстремофильные организмы, многие из них – термофилы, растущие оптимально при температурах выше 50 °C. Однако подавляющая часть архей, доминирующих в горячих источниках, особенно с низкими значениями pH, остается некультивируемыми. Большинство из них относятся к глубоким филогенетическим линиям – порядкам, классам, или даже филумам. Условия среды обитания термофилов, часто в совокупности с экстремальными значениями pH, низким содержанием O_2, высокой концентрацией токсичных веществ, предполагают наличие особых стратегий у микроорганизмов. Так, ферменты термофилов (термозимы) активны и устойчивы в агрессивных средах, и имеют большое значение для биотехнологии [Zeldes et al., 2015]. Выделение новых таксонов в чистые культуры и их детальное исследование расширяют понимание экосистемных процессов, открывают новые свойства и метаболические возможности прокариот.

Степень разработанности темы исследования. По оценкам, только 3,5% разнообразия бактерий и архей выделено в чистые культуры [Lewis et al., 2021]. Неравновесие значительно: так, в крупнейшей коллекции DSMZ (Германия) хранится 12,5 тыс. типовых штаммов бактерий и всего 405 – архей. Развитие молекулярно-биологических методов позволило изучать микробные сообщества без культивирования, показав космополитичность архей. Их количество соотносимо или даже превосходит бактерий в горячих кислых источниках, гиперсоленых озерах, кислых шахтных водах, олиготрофной пелагиали Мирового океана, низкотемпературных анаэробных осадках морских и наземных экосистем [Baker et al., 2020; Zou et al., 2025]. Но молекулярные методы имеют и недостатки: предсказательный характер результатов, низкое качество генетического материала и т.д. Без чистых культур невозможно надежно определить метаболизм клеток, а значит, новые или необычные свойства микроорганизмов могут быть не распознаны.

Важный аспект – это возможность использовать организм или его ферменты в биотехнологии. Хотя ферменты бактерий и грибов (в силу простоты культивирования) применяются чаще, термофильные археи имеют бóльший потенциал [Bouzas et al., 2006; Castro et al., 2016]. Повышение температуры увеличивает скорость катализа, исключает затраты энергии на охлаждение системы, снижает риск контаминации [Donati et al., 2016]. Термозимы определяют успехи науки и медицины: так, ферменты бактерии *Thermus aquaticus* и археи *Pyrococcus furiosus* осуществляют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [Chien et al., 1976; Lundberg et al., 1991]. Метаболиты архей используются в производстве фармпрепаратов и косметики [Raddadi et al., 2015]. Химически стабильные липиды архейных мембран могут быть системой доставки лекарств [Eichler, 2001].

Горячие источники – привычные местообитания архей. В зонах вулканов воды в источниках в основном кислые за счет выходов H_2S и SO_2 [Qi et al., 2025; Rowe et al., 2024]. Большая часть микробных сообществ таких гидротерм представлена археями некультивируемых или мало изученных глубоких филогенетических линий. Среди них часто встречаются: 1) археи порядка *Fervidicoccales* (филум *Thermoproteota*) с единственным описанным видом *Fervidicoccus fontis*; 2) не имеющая культивируемых представителей группа A10/ARK15 (*Thermoplasmatota*), известная лишь по анализу участков ДНК; и 3) некультивируемые археи '*Candidatus* Marsarchaeota/Marsarchaeales', для которых предсказан гетеротрофный аэробный метаболизм и участие в циклах серы и железа. Эти группы населяют гидротермы Новой Зеландии, Китая, США, Японии, Италии и Курило-Камчатского региона [Barns et al., 1994; Jay et al., 2018; Kochetkova et al., 2022; Malygina et al., 2023; Qi et al., 2025; Rozanov et al., 2020, 2021].

Цели и задачи. Целью работы являлось выделение в чистые культуры и последующее описание фенотипических особенностей и новых свойств архей глубоких филогенетических линий, широко представленных в сообществах кислых горячих источников Камчатки и Курильских островов. Для ее достижения были определены следующие задачи:

1. Провести анализ микробного разнообразия горячих источников Курило-Камчатского региона с акцентом на распространенность архей и оценить влияние физико-химических параметров источников на структуру сообществ;
2. Определить количественную представленность целевых групп архей (порядка *Fervidicoccales*, некультивируемых линий A10/ARK15 и '*Ca*. Marsarchaeales') в горячих источниках Курило-Камчатского региона;
3. Получить накопительные и чистые культуры целевых групп архей;
4. Провести подробное фенотипическое и филогенетическое описание полученных изолятов;
5. Исследовать новые и потенциально выгодные для биотехнологии свойства глубоких филогенетических линий термофильных архей.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Впервые проведено масштабное исследование микробного разнообразия горячих источников Курильских островов (Итуруп и Кунашир). В сочетании с многолетними данными по Камчатке это позволило выявить зависимости распределения прокариот от физико-химических параметров и показать доминирование в анаэробных осадках кислых горячих источников архей глубоких линий, в основном некультивируемых.

Исследованы три глубокие филогенетические линии термофильных архей. На примере штаммов *F. fontis* впервые показана способность архей филума *Thermoproteota* расти на липидах. Выделены в чистые культуры и охарактеризованы первые археи нового порядка '*Thermolimicoccales*' (ранее группа A10/ARK15) внутри филума *Thermoplasmatota* и нового класса *Tardisphaeria* (ранее '*Ca.* Marsarchaeota/Marsarchaeales') внутри филума *Thermoproteota*. Показано, что представители этих групп могут достигать до 88% (например, археи A10) от

сообщества осадков горячих источников Курил и Камчатки, выступая первичными деструкторами сложных органических соединений. Исследован биотехнологический потенциал этих архей: показаны активности липазы из *F. fontis* 3639Fd, а из *Tardisphaera* spp. получены рекомбинантные ферменты с эндоглюканазной активностью, один из которых получил первичное биохимическое описание.

Результаты работы расширяют представление о глубоких филогенетических линиях термофильных архей: от выделения первых представителей новых групп до характеристики их метаболизма, экологической роли, закономерностей распространения и биотехнологической значимости.

Положения, выносимые на защиту:

1. В микробных сообществах гидротерм Курильских островов археи доминируют (до 96%) в источниках с температурами 50–95 °C и pH 1,5–3,0, при этом основным фактором их распределения является pH.
2. Выделенная из горячего источника Камчатки археа ‘*Thermolimicoccus acidophilus*’ АК-4214 является первым представителем глубокой линии A10/ARK15 филума *Thermoplasmatota* и образует новый порядок ‘*Thermolimicoccales*’. ‘*T. acidophilus*’ является термоацидофильным бродильщиком, использующим белковые и углеводные субстраты.
3. Археа *Fervidicoccus fontis,* единственный описанный представитель порядка *Fervidicoccales*, обладает способностью гидролизовать липидные субстраты.
4. Выделенная из горячего источника Камчатки археа *Tardisphaera saccharovorans* АК-3817 глубокой линии ‘*Ca*. Marsarchaeales’ представляет новый класс филума *Thermoproteota – Tardisphaeria* class. nov. Археа является первым термоацидофильным бродильщиком и разлагает углеводы, в особенности полисахариды.
5. Археи порядков ‘*Thermolimicoccales*’, *Fervidicoccales* и *Tardisphaerales* доминируют в сообществах осадков кислых горячих источников Курило-Камчатского региона, где выполняют роль первичных деструкторов.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты работы представлены в журналах уровня Q1 (mSystems, BMC Microbiology) и Q3 (Microbiology), высоко оценены на международных конференциях (Extremophiles, Греция; Molecular biology of archaea, Франция), представлены на 4-м и 5-м Российских микробиологических конгрессах и других отечественных конференциях, а также получили внимание СМИ. Достоверность результатов подкреплена использованием современных подходов, оборудования, материалов и программ. Эксперименты проведены в повторностях с обязательным контролем. Данные обработаны статистически.

Личный вклад автора. Соискатель лично принимал участие в отборе проб в ходе экспедиций к горячим источникам Курильских островов и Камчатки, описании разнообразия сообществ и поиске закономерностей, получении накопительных и выделении чистых культур, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей и тезисов конференций.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста и включает 36 рисунков, 1 таблицу, 5 приложений. Работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы, экспериментальная часть – результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы, который содержит 198 источников (8 русскоязычных и 190 иностранных).

Благодарности. Автор благодарит научного руководителя, к.б.н. Кочеткову Т.В. за передачу ценных знаний и опыта в области работ с термофильными археями, наставничество и поддержку на всех этапах исследования; сотрудников Лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот: к.б.н. Заюлину К.С. за обучение работе с ферментами архей, к.б.н. Клюкину А.А. за наставничество в молекулярно-биологических работах и разработку специфических праймеров и зондов, секвенирование ДНК, к.б.н. Ельченинова А.Г. за филогенетический анализ культур и помощь в описании разнообразия сообществ, зав. лаб. к.б.н. Фролова Е.Н. за ценные теоретические замечания, к.б.н. Перевалову А.А. и к.б.н. Прокофьеву М.И. за предоставленные культуры архей *F. fontis* и *T. miroshnichenkoae* соответственно. Автор благодарит с.н.с. Куличевскую И.С. за помощь с FISH, инженера Иваненко А.А. за определение продуктов метаболизма; сотрудницу ИБФМ им. Г.К. Скрябина Сузину Н.Е. за работы с образцами на ТЭМ и СЭМ. Автор благодарит Бэйл Н. (Институт морских исследований, Нидерланды) за анализ состава мембранных липидов; Центр коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН за техническое обеспечение ряда экспериментов. Автор выражает глубокую признательность д.б.н. Бонч-Осмоловской Е.А., д.б.н. Хижняк Т.В., д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Сорокину Д.Ю., к.б.н. Литти Ю.В. за ценные научные коммуникации. Автор благодарит Кроноцкий и Курильский государственный заповедники за возможность экспедиционных исследований и своих коллег за слаженную работу во время этих поездок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Природные образцы из горячих источников. Пробы воды и осадков из горячих источников Курил и Камчатки были отобраны автором и коллегами в экспедициях 2023 и 2025 гг. для изучения разнообразия архей и закономерностей их распространения. Проба воды и ила №3817 с Оранжевого поля, а также №4214 из источника Заварзин (кальдера Узон, Камчатка) были отобраны коллегами в 2019 и 2021 гг. Профилирование сообщества по участку V4 гена 16S рРНК выявило до 39% архей некультивируемых глубоких линий, и эти образцы были выбраны для дальнейшего выделения чистых культур.

***Fervidicoccus fontis* штаммы 3639Fd, Kam940^T, 1507, 4215c, FoA-16.** *F. fontis* штаммы Kam940^T и 1507 являются единственными описанными в порядке *Fervidicoccales* [Perevalova et al., 2010]. Штамм 3639Fd был выделен А.А. Переваловой в 2018 г. из *in situ* накопительной культуры на трибутирине (ТБ) из источника Вертолетный кальдеры Узон (59 °C, pH 6,5). Фенотипическое описание чистой культуры *F. fontis* 3639Fd, геномный анализ, качественная проверка эстеразной/липазной активности, а также проверка роста всех доступных в коллекции лаборатории штаммов *Fervidicoccus* (Kam940^T, 1507, 4215c, FoA-16) на липидах проводились в рамках этой работы.

***Tardisphaera miroshnichenkoae* MP-3918^T.** Термофильная анаэробная архея *T. miroshnichenkoae* MP-3918^T была получена Прокофьевой М.И. из пробы термального грунта кальдеры вулкана Головнина о. Кунашир. Биомасса археи использована для полноценного исследования биотехнологического потенциала рода *Tardisphaera,* к которому относился новый вид *T. saccharovorans* АК-3817^T (выделен автором).

Методология исследования. Отбор проб из горячих источников проводили стерильно, минимизируя контакт с воздухом, измеряли температуру, pH, окислительно-восстановительный (Eh) потенциал, при необходимости отбирали воду на химический анализ. ДНК из образцов выделяли коммерческими наборами. Состав сообществ определяли высокопроизводительным секвенированием вариабельных участков гена 16S рРНК (NGS), представленность целевых групп архей – с помощью количественной ПЦР (кПЦР) со специфическими праймерами. В программной среде R проведен анализ состава микробных сообществ (α- и β-разнообразие) с поиском статистических зависимостей от физико-химических условий (тесты Мантела, Краскела-Уоллиса и Данн, корреляции Спирмена). Для определения операционных таксономических единиц (OTU) использовали базу данных SILVA r138.1, при необходимости приводя также и таксономию GTDB.

Микробиологические методы работы включали в себя: разработанный нами способ длительного культивирования в анаэробных условиях для получения накопительных культур; метод 10-кратных предельных разведений, фазово-контрастную микроскопию, флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH), трансмиссионную и сканирующую электронные микроскопии (ТЭМ, СЭМ). Фенотипическое описание изолятов проводили по современными требованиям: определяли оптимальные условия и параметры роста, спектры субстратов, способность к аэробному/анаэробному дыханию. Продукты метаболизма определяли

методом высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии (ВЭЖХ и ГЖХ). Анализ мембранных липидов проводили методом сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с высокоразрешающей масс-спектрометрией (UHPLC-HRMS). Секвенирование геномов чистых культур проводили на платформах Illumina/Nanopore. Таксономическую принадлежность новых видов определяли через полногеномный анализ и построение филогенетических деревьев методом Approximately Likelihood по наборам «ar53», «ar122».

Работа по описанию ферментов из термофильных архей включала построение филогенетических деревьев для отдельных белков (на основе данных CAZy, SwissProt и др.), их рекомбинантную экспрессию в штаммах *E. coli*, очистку полученных белков Ni-аффинной хроматографией на самотечных колонках и хроматографе Akta Start, качественное и количественное биохимическое описание их свойств или же работу по изучению активности на чашках. Структурные особенности белков рассмотрены с помощью онлайн-инструментов Phobius, Hmmer, Expasy.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Микробные сообщества горячих источников Курил и Камчатки

В ходе экспедиционных исследований были отобраны образцы из 34 источников в зонах активности вулканов Баранского (о. Итуруп), а также Головнина и Менделеева (о. Кунашир). На Камчатке были отобраны 29 проб из кальдеры вулкана Узон и Долины гейзеров. Физико-химические характеристики источников представлены ниже (Таблица 1).

Таблица 1 *– Параметры вод горячих источников Курильских островов и Камчатки.*

	Курильские острова	**Камчатка**
Температура, °C	40–94	21,5–96
pH	1,5–8,5	2,1–8,3
Eh, мВ	–60 – +240	–380 – +9
Минерализация, мг/л	174–3049	183–3856
Жесткость, мэкв/л	0,4–12,5	0,5–4
Доминирующие ионы	Cl^-, SO_4^{2-}, Na^+, Ca^{2+}	Cl^-, SO_4^{2-}, Na^+
K^+, мг/л	0,8 – 81,8	2,35 – 45,2
Содержание H_2S, мМ	0–3,96 (в большинстве не детектировался)	1,2–2,4 (детектировался во всех пробах)

В курильских образцах обнаружено 1688 OTU бактерий и 80 OTU архей. Бактерии преобладали в 27 образцах, составляя от 50 до 100% от всего состава; в 7 пробах доминировали археи (от 60 до 97%). Преобладающими архейными филумами были *Crenarchaeota* (сейчас *Thermoproteota*) и *Thermoplasmatota*. Наиболее распространенными родами были *Thermoplasma* (до 80%), *Sulfolobus* (до 70%), *Acidianus* (до 28%), *Metallosphaera* (до 30%), а также представители некультивируемых глубоких линий '*Ca.* Caldiarchaeales' (1,5–25%), BSLdp215 (1–20%) и '*Ca.* Geoarchaeales', по базе данных SILVA совпадающих с '*Ca.* Marsarchaeales' (1,5–42,5%). В отдельных пробах были обнаружены археи '*Ca.* Bathyarchaeia' (9%), '*Ca*. Nitrosotenuis' (10%) и линии A10/ARK15 (6%). В большей части проб с доминированием архей pH был ниже 3,0, а температура – от 50 до 94 °C (Рисунок 1, Рисунок 2).



Рисунок 1 *– Относительная представленность прокариот в сообществах горячих источников Курильских островов на уровне филумов. Группа «Others» включает OTU с содержанием <1%, а также неклассифицированные OTU. По GTDB: 1 – Bipolaricaulota, 2 – Actinomycetota, 3 – Atribacterota, 4 – Chloroflexota, 5 – Cyanobacteriota, 6 – Desulfobacterota C, 7 – Bacillota, 8 – WOR-3, 9 – Desulfobacterota E, 10 – Myxococcota A, 11 – Pseudomonadota, 12 – Desulfobacterota B, 13 – Desulfobacterota, 14 – Thermoproteota. Цитируется по [Karaseva et al., 2024].*

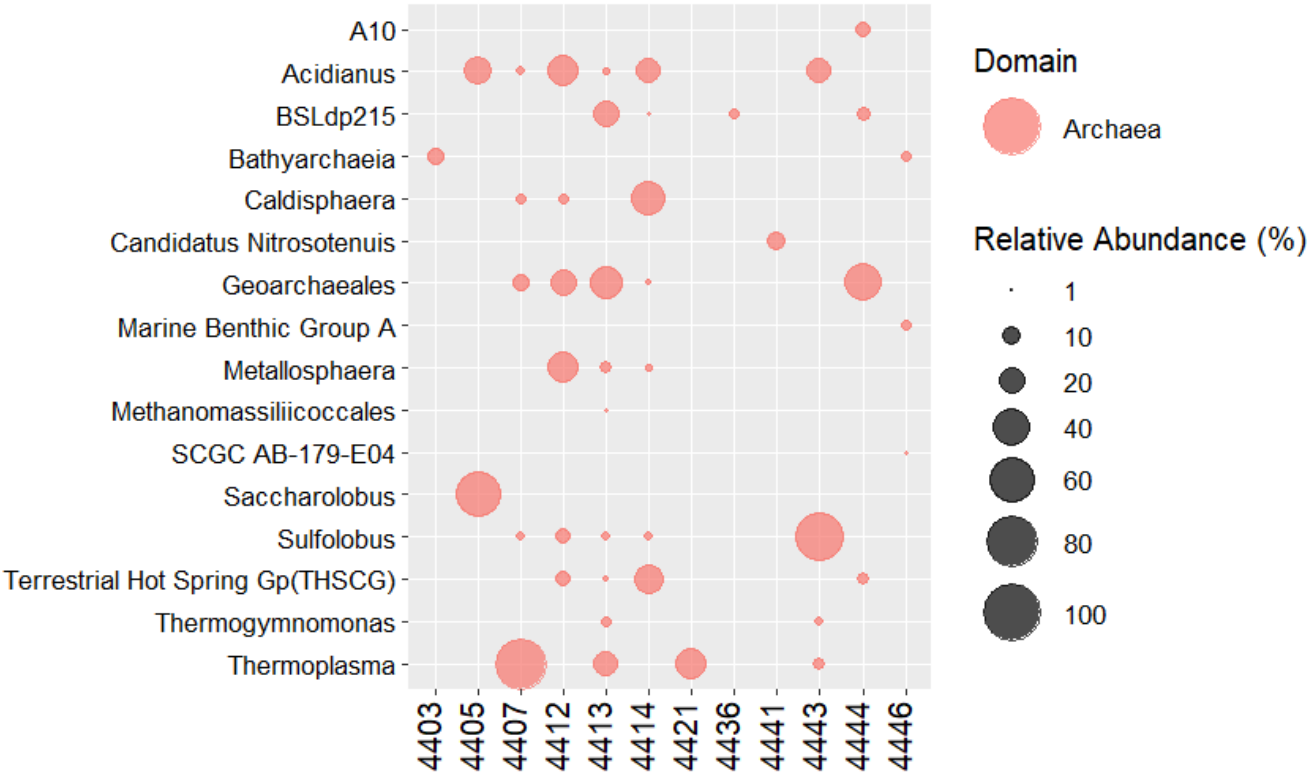


Рисунок 2 *– Относительная представленность архей в горячих источниках Курильских островов (отображены OTU, имеющие численность ≥1% хотя бы в одном образце). 'Ca. Geoarchaeales', по базе данных SILVA совпадает с 'Ca. Marsarchaeales'.*

Анализ β-разнообразия неметрическим многомерным шкалированием (NMDS) показал, что сообщества можно разделить на 3 группы по pH и преобладающей группе прокариот, что подтверждалось и другими статистическими тестами (Рисунок 3). Тест Мантела также показал, что микробное разнообразие имело высокую степень корреляции со значениями pH (R=0,66), а также умеренную степень с некоторыми химическими параметрами воды, такими как минерализация (R=0,44), элементный (R=0,54) и ионный состав воды (R=0,47). Анализ α-разнообразия выявил широкие диапазоны индексов Шеннона (0,8–5,1), инвертированного индекса Симпсона (1,5–94,2) и Chao1 (13–358). Сообщества с преобладанием бактерий выделялись бóльшим разнообразием, чем те, где доминировали археи.

Был проведен анализ представленности целевых групп архей (*Fervidicoccales,* '*Ca.* Marsarchaeales', A10/ARK15) в изучаемых образцах. Температурные и pH-диапазоны групп пересекались. Для подтверждения данных NGS был проведен точный учет по кПЦР групп A10/ARK15 и '*Ca.* Marsarchaeales'– это стало возможным после получения чистых культур (см. далее п. 2 результатов). Эти группы архей занимали в сообществах кислых горячих источников до 88 и 42,5% соответственно (Таблица 2). Результат для A10/ARK15 был дополнительно подкреплен FISH. Корреляции распределения целевых групп архей были найдены по pH и минерализации источников, а также уровню окислительно-восстановительного потенциала Eh.

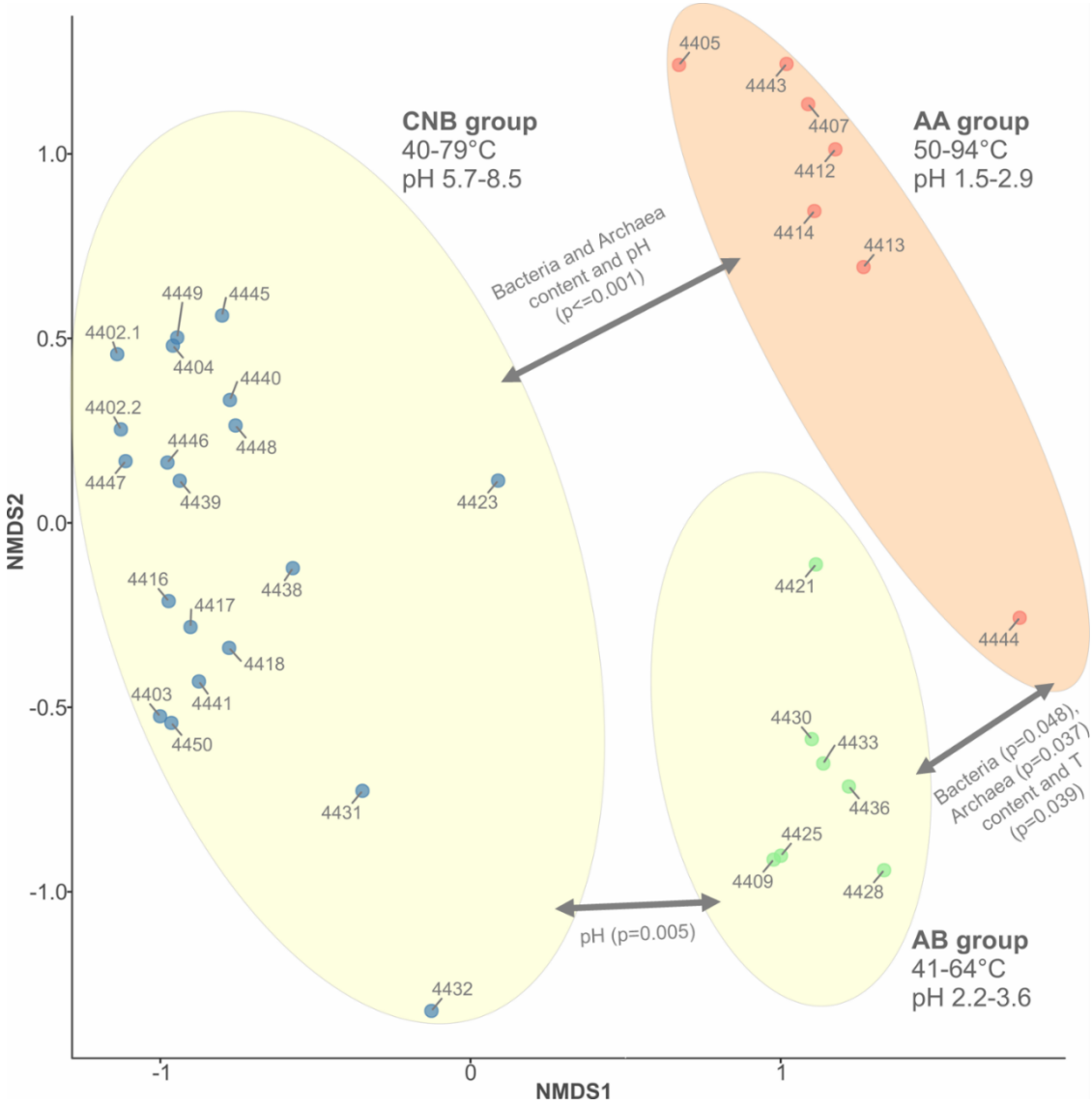


Рисунок 3 *– Результаты анализа β-разнообразия прокариотических сообществ горячих источников Курильских островов. NMDS-распределение источников с использованием расстояний Брея-Кёртиса (k=3; stress value=0.095) и результаты статистического сравнения полученных групп. CNB – околонейтральная бактериальная группа, AA – кислая архейная группа, AB – кислая бактериальная группа. Цитируется по [Karaseva et al., 2024], с изменениями.*

Таблица 2 *– Встречаемость целевых групп архей и физико-химические параметры горячих источников Курильских островов и Камчатки.*

	Курильские острова	**Камчатка**
Fervidicoccales		
Температура, °C	-	43–70
pH	-	4,0–6,5
max % в сообществе, NGS V4 16S рРНК	-	11
‘*Ca.* Marsarchaeales’		
Температура, °C	50–70	40–70
pH	1,5–3,0	2,5–6,5
max % в сообществе, NGS V4 16S рРНК	42,5	17
max % в сообществе, qPCR	42,5	17
A10/ARK15		
Температура, °C	50	30–80
pH	3,0	2,0–6,5
max % в сообществе, NGS V4 16S рРНК	6	60
max % в сообществе, qPCR	-	88

2. Получение чистых культур и фенотипическая характеристика архей глубоких филогенетических линий

‘*Thermolimicoccus acidophilus*’ АК-4214

При накоплении группы A10/ARK15 исходили из того, что они доминируют в донных осадках источников, где доступ O_2 ограничен [Maltseva et al., 2023; Sriaporn et al., 2023]. Накопительные культуры были поставлены в анаэробных условиях на среде Пфеннига при 60 °C и pH 5,6, в присутствии S^0, на длительный период инкубации (30–45 дней), на различных субстратах (мальтоза, целлобиоза, крахмал, ксилан или пуллулан). При микроскопии культур предпочтение отдавали коккам (привычная морфология *Thermoplasmatota*), контролировали изменения в составе по NGS, на основании этого корректировали условия. Так, удалось с 38% в исходной пробе накопить нужных архей до 98% на ксилане, переведя инкубирование с 60 до 50 °C и pH с 5,6 до 4,0. Ампициллин (10 мг/л) добавляли для подавления бактерий. Предельными разведениями получили однородную культуру. Результаты секвенирования подтвердили ее чистоту, штамм получил обозначение АК-4214 (Рисунок 4).

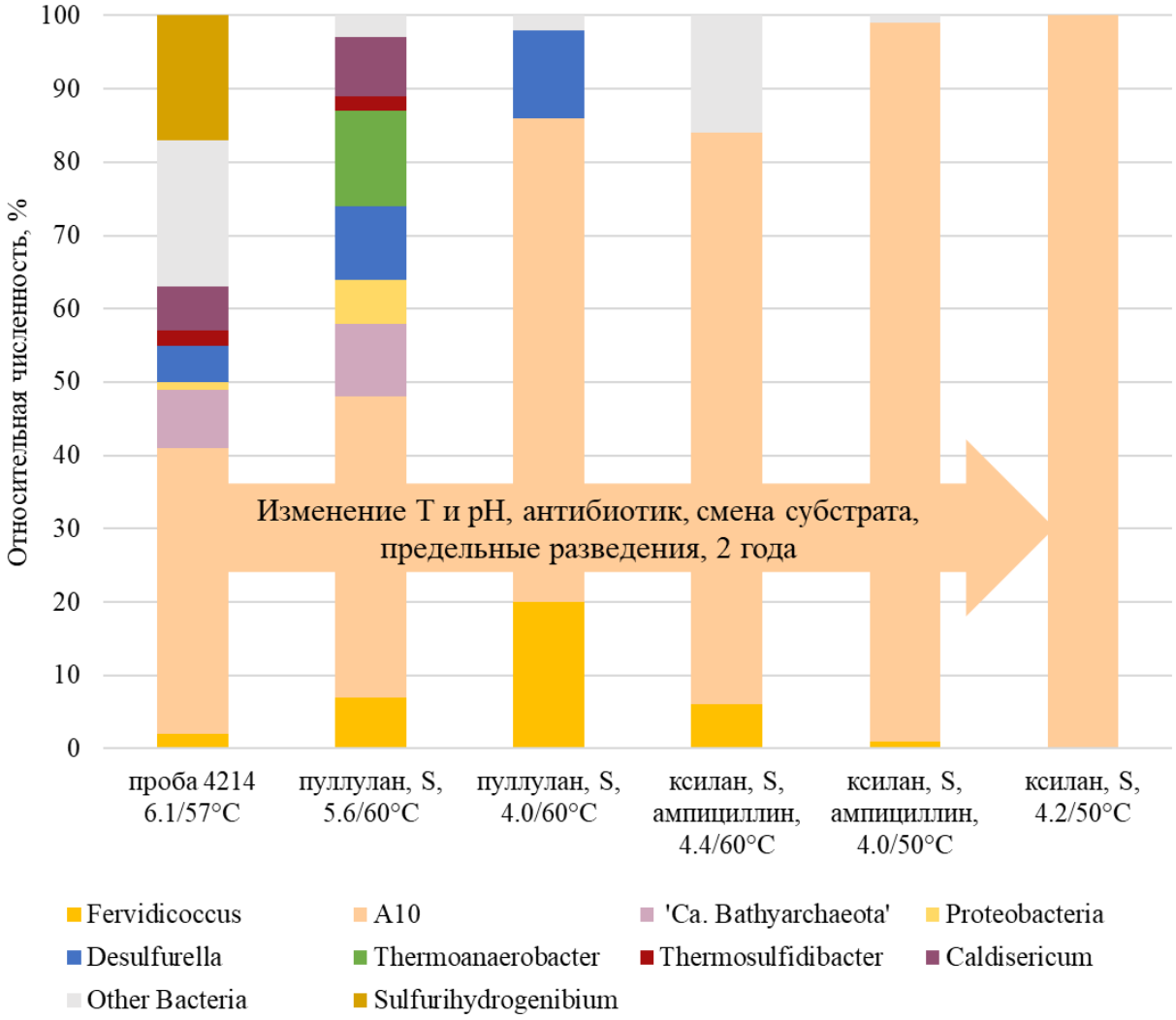


Рисунок 4 *– Краткая схема получения чистой культуры A10/ARK15 штамм АК-4214 из природной пробы горячего источника Камчатки.*

Клетки АК-4214 представлены кокками диаметром 0,5–1 мкм, по одиночке или в агрегатах, с 1–2 протрузиями. Окружены толстой клеточной оболочкой, имеют

периплазматическое пространство, в которое выделяются везикулоподобные структуры (Рисунок 5). Найденные особенности морфологии необычны для архей и их функции пока неизвестны. Анализ липидов мембран показал наличие глицерол-диалкил-глицерол-тетраэфиров (GDGT), содержащих до 4 циклопентановых колец, следовых количеств археолов.

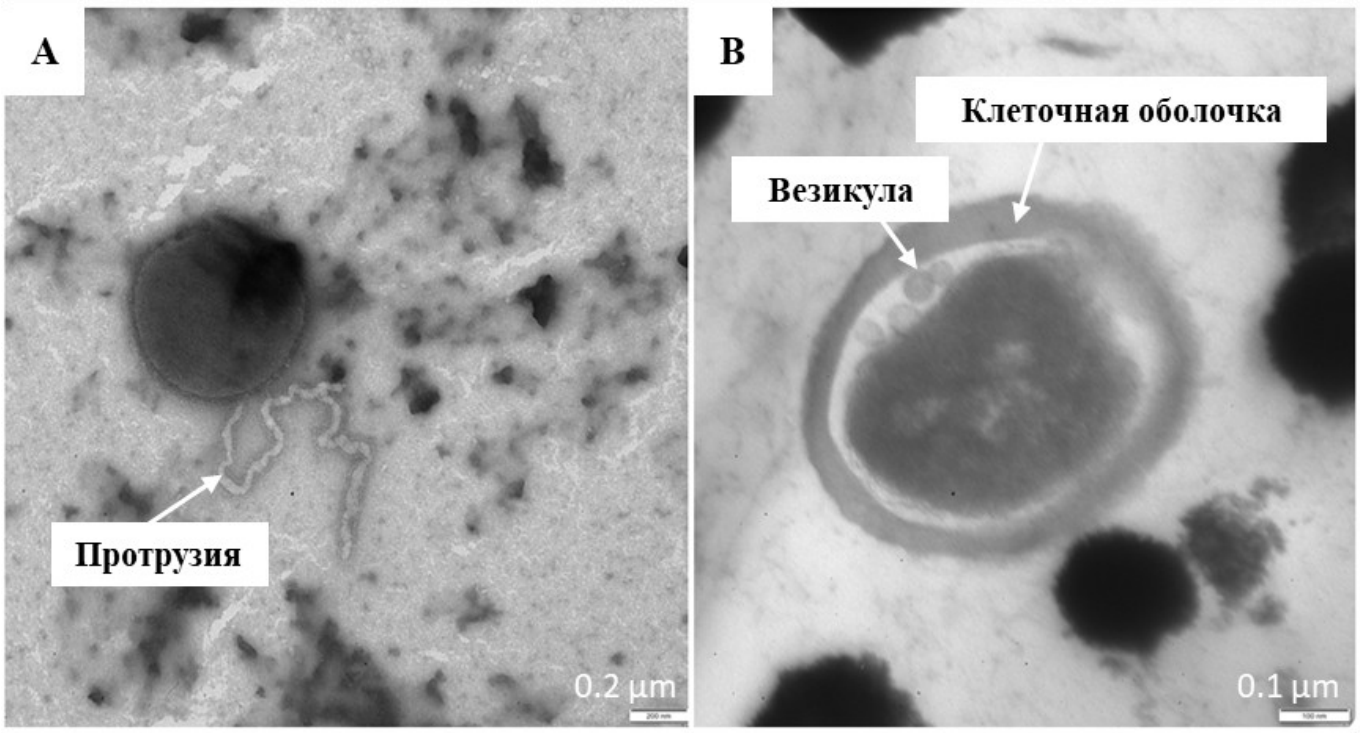


Рисунок 5 *– Микрофотографии клеток штамма АК-4214 (ТЭМ) (А – негативное контрастирование, шкала 0,2 мкм, В – ультратонкий срез, шкала 0,1 мкм).*

Архея растет при 47–77 °С, оптимально при 70 °С, и pH диапазоне 3,4–6,4 с оптимумом 4,0 (Рисунок 6). Время удвоения на среде с пептоном в оптимальных условиях составляет 64 ч. Анаэробный хемоорганогетеротроф, использует белковые соединения (пептон, дрожжевой экстракт (ДЭ), желатин) и некоторые углеводы (ксилоза, ксилан, трагакантовая и ксантановая камеди, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ)), облигатно зависит от присутствия S^0 в среде, а также ДЭ (0,05 г/л) как добавочного фактора роста. При росте на ксилозе с S^0 образуется ацетат, изо-валерат, CO_2 и H_2S.

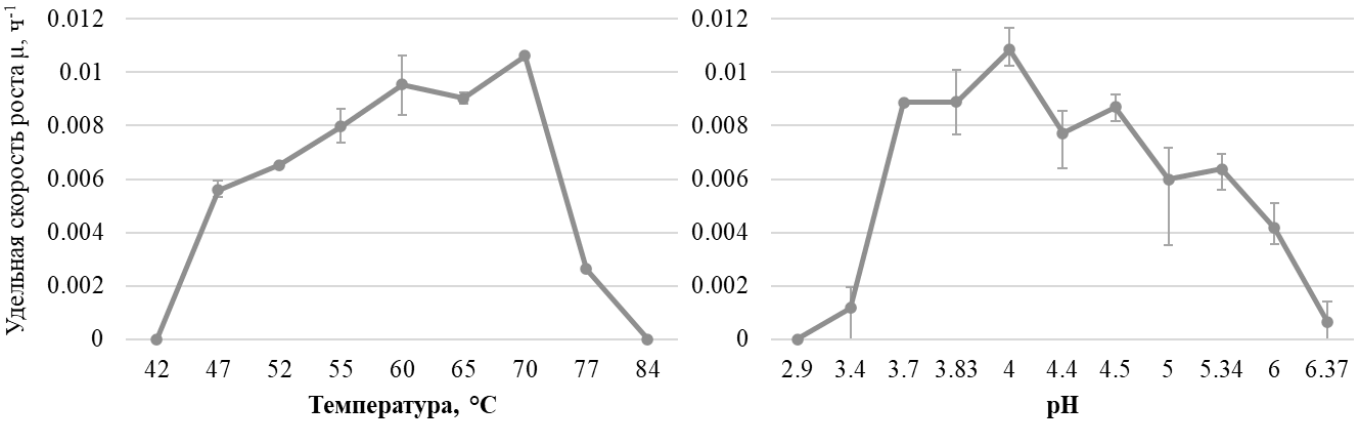


Рисунок 6 *– Удельные скорости роста штамма АК-4214 при различных Т и pH.*

Предполагается, что основной способ запасания энергии для штамма – «облегченное» брожение со сбросом электронов на S^0. В исследованиях генома коллегами был найден ген КоА-зависимой НАД(Ф)-оксидоредуктазы и не обнаружено генов белков электрон-транспортной цепи.

Штамм АК-4214 не способен расти на аэробной среде, и непродолжительное присутствие кислорода приводит к гибели клеток. Природные источники Камчатки, где археи этой группы встречаются до 88% – это крупные озерца или глубокие лужи (Рисунок 7), где пересыхание минимально, детектируется H_2S, и доступ O_2 в осадках очень мал, поэтому такой результат является закономерным.



***Рисунок 7** – Горячие источники Камчатки, где доля архей группы A10/ARK15 ежегодно остается большой (% по кПЦР).*

Последовательность гена 16S рРНК штамма АК-4214 по BLAST составила 86,3% сходства с ближайшим культивируемым видом ‘*Ca.* Aciduliprofundum boonei’ внутри класса *Thermoplasmata*. Филогеномный анализ по набору «ar53» показал, что АК-4214 принадлежит глубокой линии архей A10/ARK15 уровня нового порядка. Анализ по «ar122» репрезентативных композитных геномов (MAG) и чистых культур архей класса *Thermoplasmata* (GTDB R226), MAGов, относящихся к A10/ARK15 хорошего качества (полнота >90%, контаминация <5%) и полного генома АК-4214 подтвердил, что A10/ARK15 – новый порядок внутри класса (Рисунок 8). Первому представителю архей группы A10/ARK15, штамму АК-4214, было присвоено предварительное имя ‘*Thermolimicoccus acidophilus*’ gen. nov. sp. nov. (от лат. – «кислотолюбивый кокк из горячего ила»). Изолят относится к новому семейству ‘*Thermolimicoccaceae*’ fam. nov. внутри нового порядка ‘*Thermolimicoccales*’ ord. nov. филума *Thermolpasmatota*. Штамм АК-4214 задепонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номером VKM B-4012^T, а также в коллекции UNIQEM (UQM_42011).

Причины доминирования архей ‘*Thermolimicoccales*’ в сообществах (до 88%) пока не до конца понятны, но широкие температурный и pH-диапазоны роста штамма АК-4214 практически совпадают с параметрами источников, в которых детектируются археи нового порядка в больших долях. Это позволяет предположить высокую экологическую пластичность архей этой группы в природных условиях, где они, вероятно, являются деструкторами белковых и углеводных соединений.

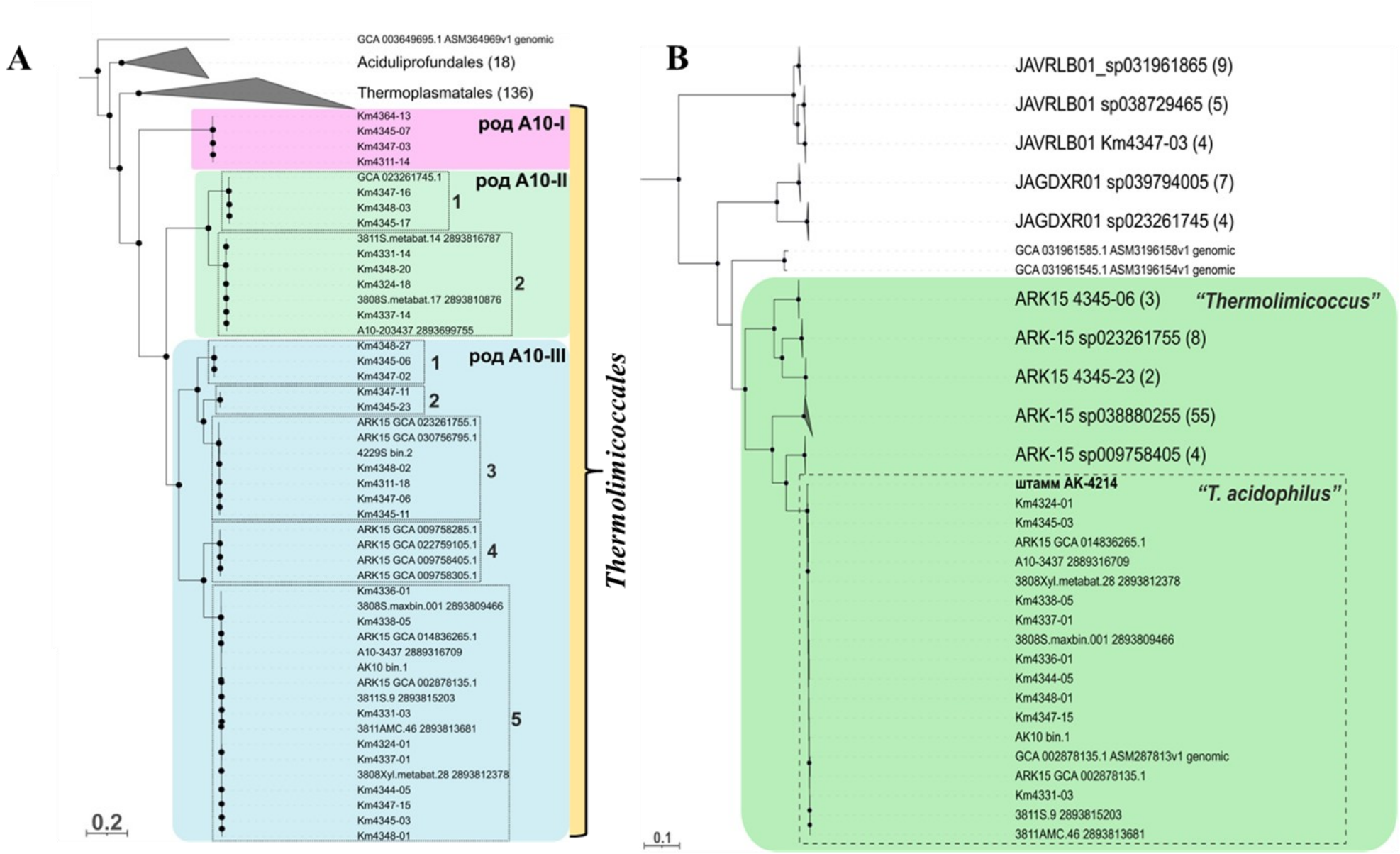


Рисунок 8 *– Филогенетические деревья, основанные на сравнении белков из (A) набора «ar122» для композитных геномов архей A10/ARK15, и (B) набора «ar53», показывающее положение штамма AK-4214 внутри порядка A10/ARK15. Род, к которому относится штамм AK-4214, ограничен светло-зеленой рамкой, а вид – пунктирной линией. Метод построения – Approximately-Likelihood.*

***Fervidicoccus fontis* 3639Fd**

Штамм 3639Fd был выделен на ТБ, который ранее не рассматривался в качестве субстрата ни для представителей этого вида и рода, ни для архей, принадлежащих к филуму *Thermoproteota*. Были подробно исследованы фенотипические характеристики археи, с акцентом на использование липидных субстратов. Показано, что штамм – умеренно ацидофильный хемоорганогетеротроф. Диапазон температур роста составил от 55 до 83 °C с оптимумом 70 °C, pH от 4,5 до 6,5 с оптимумом 5,6. 3639Fd использовал триглицериды и масла: ТБ, триолеин (ТО), моноолеин, кунжутное, хлопковое, подсолнечное масла; а также триптон, казеин, бутират, пируват, тартрат, пальмитат, стеарат, глюкозу, ксилозу, рамнозу, мальтозу, сахарозу, целлобиозу. S^0 стимулировала рост. Облигатно зависел от наличия в среде 0,1 г/л ДЭ как источника ростовых факторов. Рост на ТБ сопровождался образованием бутирата, CO_2 и H_2 (Рисунок 9). Минимальное время удвоения составляло 1,2 ч.

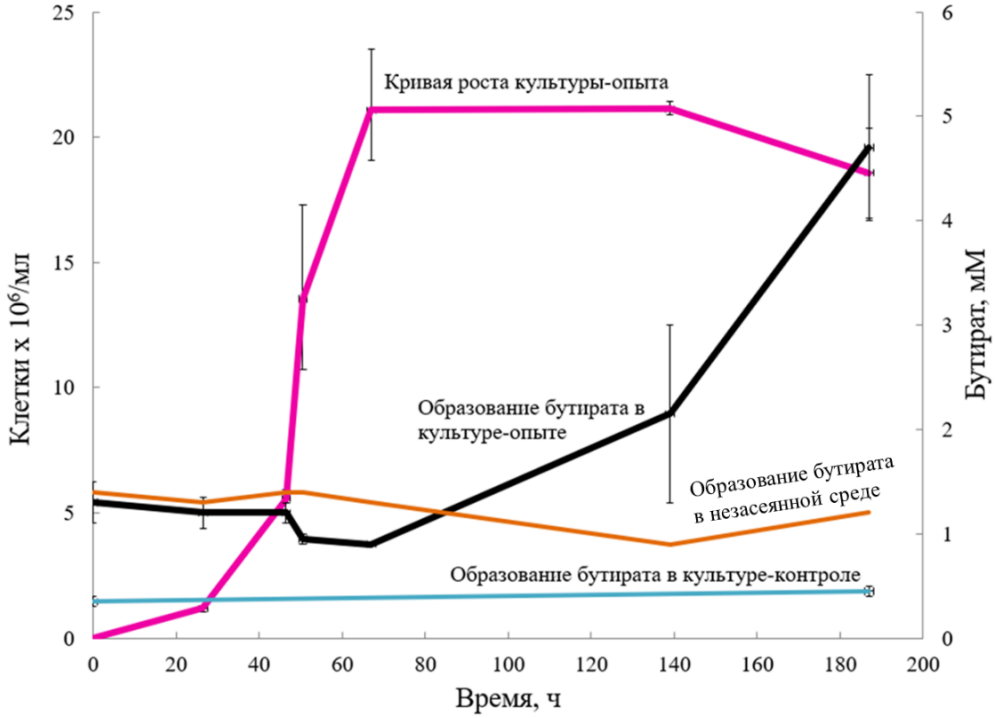


***Рисунок 9** – Рост F. fontis 3639Fd и образование бутирата на ТБ в оптимальных условиях (pH 5,6, 70 °C). Контрольные образцы: незасеянная среда с ТБ и культура, выросшая на ДЭ (1 г/л). Цитируется по [Карасева и др., 2021] с изменениями.*

Типовой штамм *F. fontis* Kam 940^T также был способен к росту на липидах: ТБ, оливковом, подсолнечном и хлопковом маслах. Еще один штамм 4215c, выделенный автором на ксилане с S^0 при pH 5,6, 70 °C тоже проявил такое свойство. Остальные штаммы *Fervidicoccus* sp. из лабораторной коллекции (FoA-16, 1507) не росли на липидных субстратах.

Таким образом, термоацидофильная архея *F. fontis,* представляющая единственный описанный вид порядка *Fervidicoccales,* способна гидролизовать широкий спектр липидных субстратов наряду с другими органическими соединениями. Рост на липидах ранее был показан только для археи *Thermococcus sibiricus* (филум *Methanobacteriota*) [Mardanov et al., 2009]. Таким образом, *F. fontis* является первым представителем филума *Thermoproteota*, обладающим такой способностью.

***Tardisphaera saccharovorans* АК-3817**

Для выделения архей группы ‘*Ca.* Marsarchaeales’ посевы из пробы №3817 инкубировали в течение 1 месяца в анаэробных условиях на среде Пфеннига с добавлением 0,05 г/л ДЭ и S^0 при pH от 3,5 до 6,0 и температурах 54–65 °C на широком спектре органических субстратов (ТБ, ТО, моноолеин, ДЭ 1 г/л, ацетат, бутират, микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), пуллулан, ксилан, гуаровая камедь, целлобиоза, глюкоза), а также в автотрофных условиях (H_2+CO_2). Рост бактерий подавляли антибиотиками. Через ряд пересевов на глюкозе, а также на МКЦ с S^0 и добавлением 40 мг/л ванкомицина и длительном инкубировании (минимум 20 дней) при pH 4,0 и температуре 65 °C получили устойчивое сообщество. Профилирование участка V4 гена 16S рРНК показало присутствие 57% архей порядка ‘*Ca.* Geoarchaeales’ (по базе данных SILVA совпадает с ‘*Ca.* Marsarchaeales’), 13% бактерий рода *Desulfurella*, 22% архей рода *Thermoplasma* и 8% архей группы A10/ARK15 (Рисунок 10, A).

Рост бактерии подавили, изменяя температуру от 50 до 65 °C. Далее для подавления роста археи рода *Thermoplasma* был добавлен новобиоцин, исключена S^0, температура поднята до 70 °C (поскольку эти археи чувствительны к антибиотику, нуждаются в сере и растут при более низких температурах [Segerer et al., 1988; Yamashiro, Yamagishi, 2005]). В качестве субстратов использовали МКЦ, пуллулан, крахмал и глюкозу. Для контроля использовали культуру *Thermoplasma* sp. 3817, выделенную из той же накопительной культуры, чтобы отследить различия в субстратных предпочтениях целевых архей со схожей морфологией. Через 20 дней на пуллулане получили активный рост крупных неровных кокков (контрольная культура росла на этом субстрате слабо).

После предельных разведений в вышеописанных условиях на 27 день удалось получить активно растущую культуру кокков. Для проверки чистоты клетки были высеяны на среду с 1 г/л ДЭ и глюкозы и инкубированы при 60 и 65 °C для выявления архей *Thermoplasma*. Выросшая при 60 °C культура была однородной, анализ состава сообщества подтвердил ее чистоту (Рисунок 10, A). Штамм получил обозначение АК-3817.

Штамм АК-3817 представлял собой неровные кокки размерами 0,4–1 мкм, покрытые S-слоем, с большим количеством нанокомпартментов (НК) неизвестной функции внутри клетки (Рисунок 10, B, C). Анализ липидного профиля мембран штамма АК-3817 показал наличие археолов (около 43%) и GDGT-0 – GTGD-4 (около 56%). Строго анаэробный термоацидофильный хемоорганогетеротроф, с диапазоном температур 37–75 °C с оптимумом при 65 °C, pH 3,0–4,7 с оптимумом при 4,1. Минимальное время удвоения клеток составило 52 часа в оптимальных условиях на галактоманнане с S^0. При росте с 1 г/л мальтозы с добавлением S^0 основными продуктами метаболизма были ацетат, этанол и CO_2. Образование небольшого количества H_2S (1,6 мМ) говорит о возможности «облегченного» брожения (это подтверждается и геномными данными).

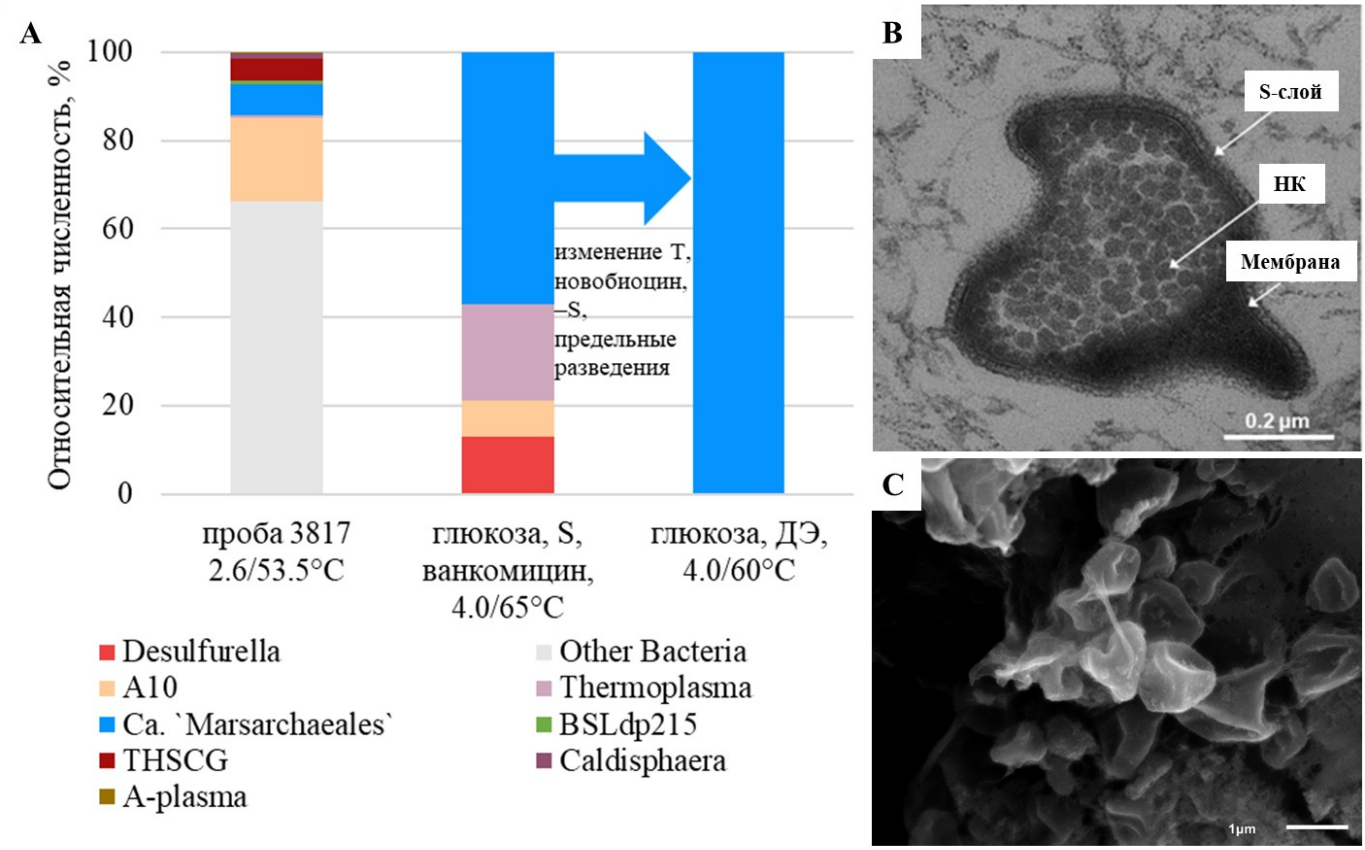


Рисунок 10 *– Краткая схема получения чистой культуры штамма АК-3817 из пробы горячего источника Камчатки (А) и микроскопия клеток штамма АК-3817. В – ТЭМ, ультратонкий срез клетки, шкала 0,2 мкм, стрелками отмечены S-слой, мембрана и нанокомпартменты (НК). С – СЭМ, шкала 1 мкм. Цитируется по [Prokofeva et al., 2025], с изменениями.*

Несмотря на невозможность роста в условиях с содержанием 2–21% O_2 в газовой фазе, уже выросшие в анаэробных условиях клетки были способны переживать и сохранять способность пересеваться до 7 дней инкубирования с воздухом. Это согласуется с естественными условиями в горячем источнике – неглубокой луже, которая периодически пересыхает (Рисунок 11).

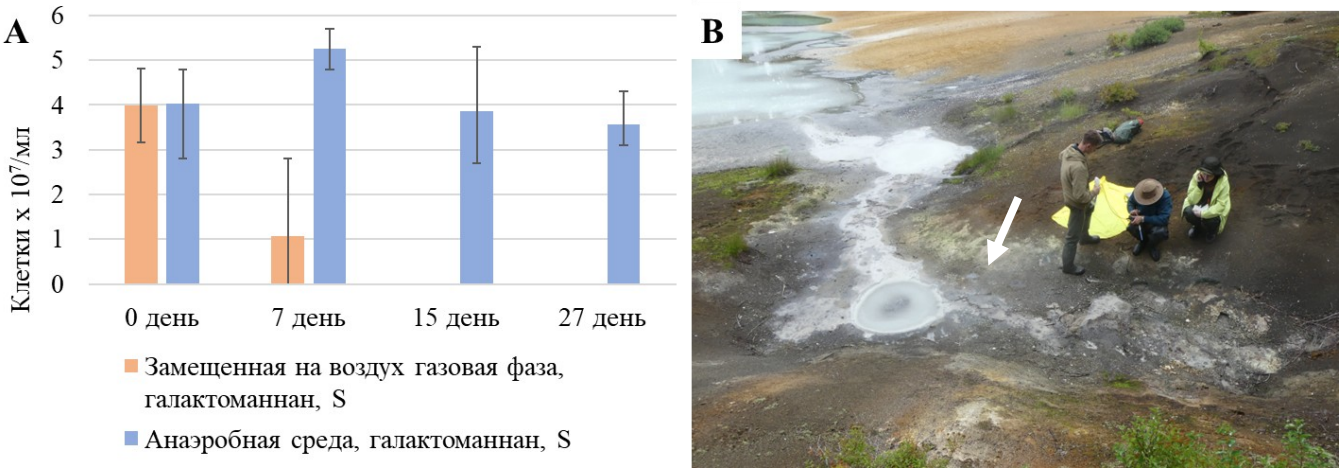


Рисунок 11 *– Результаты проверки способности роста штамма АК-3817 переживать кислородные условия (А), которые могут возникать в природном источнике 3817 (В).*

АК-3817 был способен сбраживать широкий спектр органических соединений: большую часть из них представляли полисахариды (Рисунок 12). Данная особенность подтверждалась и анализом генома, где были найдены гены сразу трех путей метаболизма сахаров (Энтнера-Дудорофа, Эмбдена-Мейергофа-Парнаса и неокислительной ветви пентозофосфатного пути) и большое количество генов гликозилгидролаз (GH).

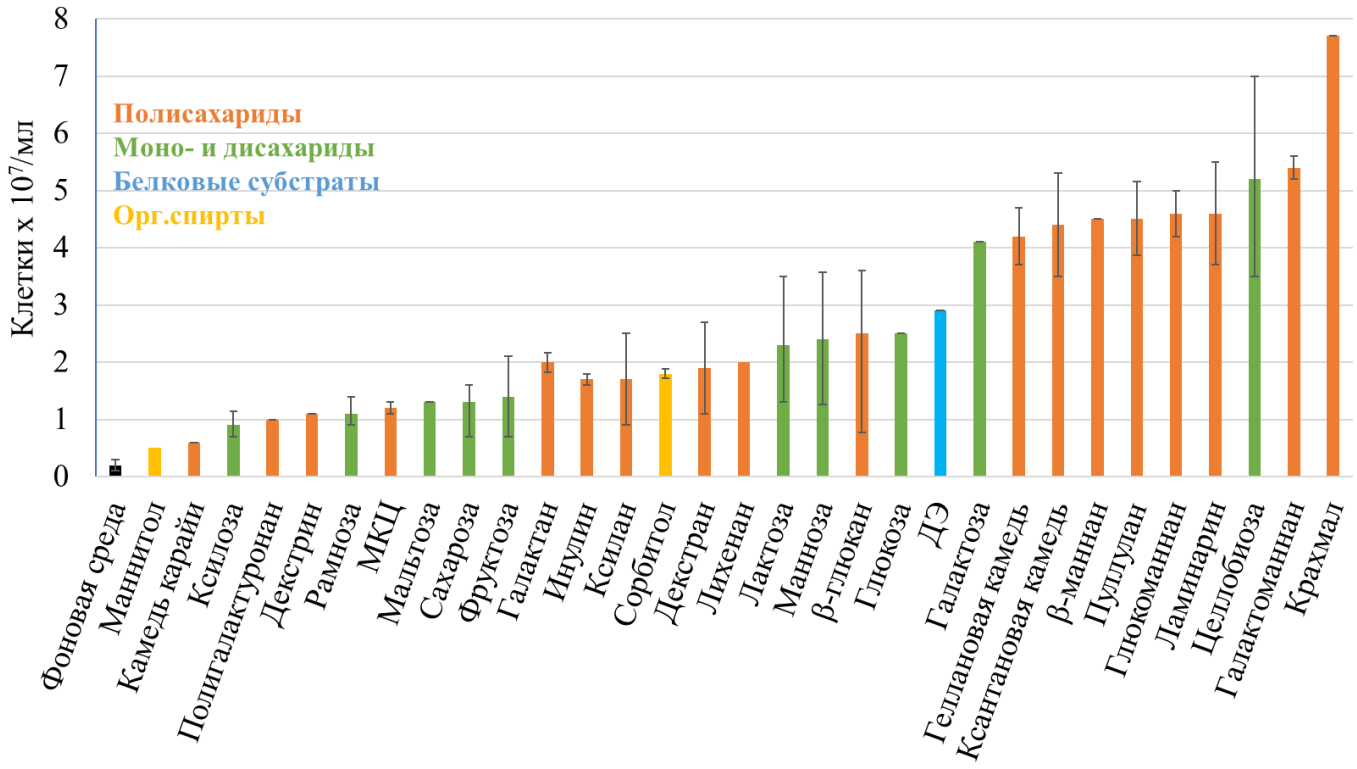


Рисунок 12 *– Рост штамма АК-3817 на различных органических субстратах.*

Последовательность гена 16S рРНК по BLAST показала <85% сходства с ближайшими культивируемыми видами класса *Thermoprotei*, что указывает на принадлежность АК-3817 к глубокой линии внутри филума *Thermoproteota*. Для определения точного положения проведен анализ по набору «ar53». Установлено, что штамм относится к новому классу внутри филума *Thermoproteota*. Данная клада включила в себя и архей, ранее описанных по MAG как '*Ca.* Marsarchaeota' [Jay et al., 2018]. Вместе со штаммом МР-3918, выделенным М.И. Прокофьевой, штамм АК-3817 образует отдельный новый род, включающий два вида. По скорости роста и субстратным предпочтениям АК-3817 получил название *Tardisphaera saccharovorans* sp. nov. (от лат. – «медленный шар, поедающий сахар»). Штамм АК-3817 депонирован в международных коллекциях (VKM B-3679^T, CGMCC 1.18047^T). Таким образом, в филуме *Thermoproteota* был предложен новый класс *Tardisphaeria* class. nov. с новым порядком *Tardisphaerales* ord. nov., в который входит два семейства: некультивируемые пока '*Ca.* Martarchaeaceae' и *Tardisphaeraceae* fam. nov., включающее штамм *T. saccharovorans* АК-3817 (Рисунок 13). Также в этот класс вошли некультивируемые археи группы '*Ca.* Geoarchaeales'.

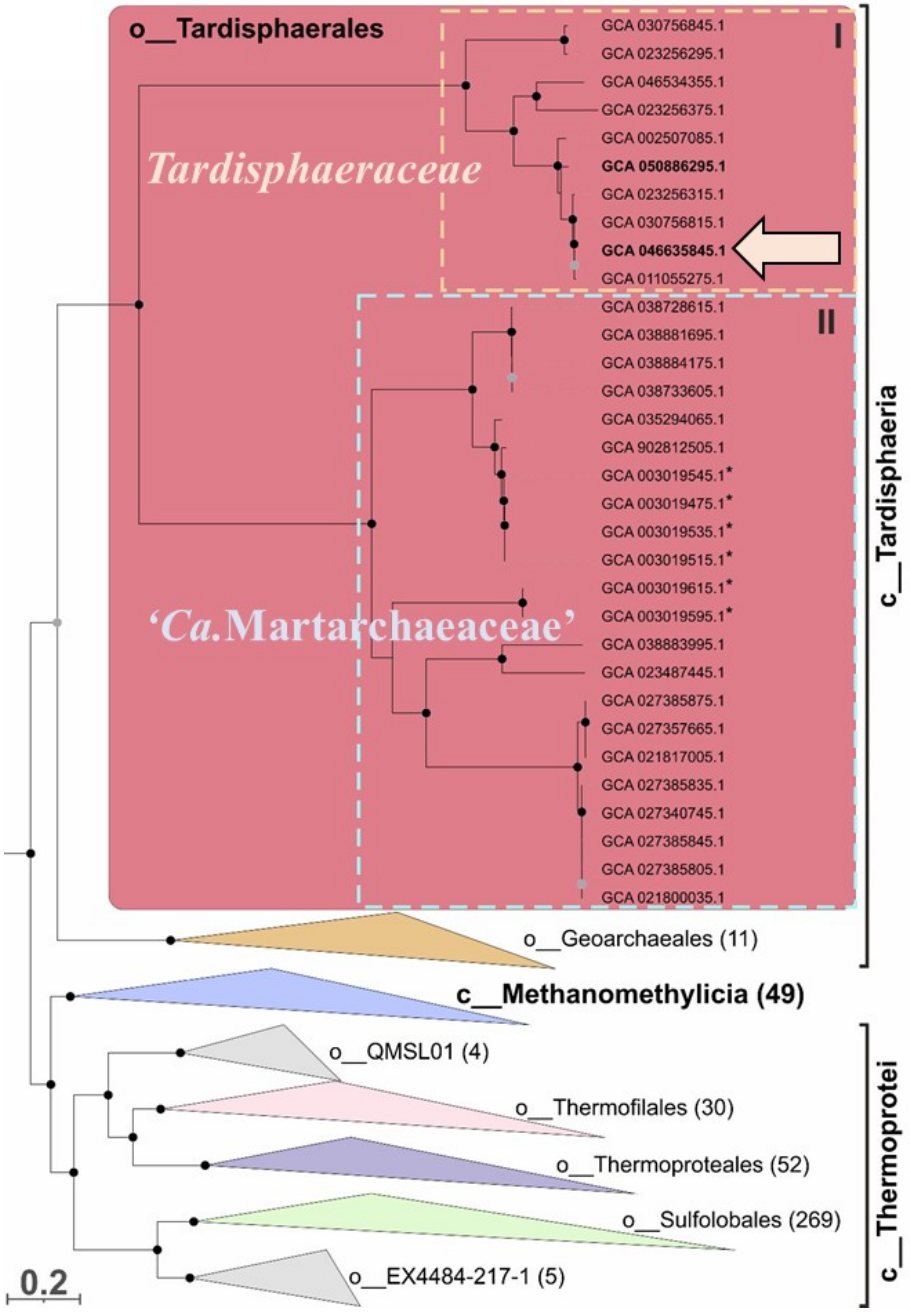


Рисунок 13 *– Филогенетическое дерево (метод Approximately-Likelihood) по набору «ar53» для рода Tardisphaera. Стрелкой отмечен штамм T. saccharovorans АК-3817, * – MAG, проанализированные в [Jay et al., 2018]. Черные точки в узлах показывают значение бутстрап более 95%, серые – от 90 до 94%. Цитируется по [Prokofeva et al., 2025], с изменениями.*

Стратегия архей *Tardisphaera* запасать энергию через брожение уникальна среди термоацидофильных прокариот – все известные культивируемые термоацидофилы используют более энергетически выгодные аэробное или анаэробное дыхание [Colman et al., 2018]. Разнообразие полисахаридов, используемое археями *Tardisphaera,* также является рекордно высоким среди ацидофилов: только некоторые гипертермофильные археи *Acidilobus*, *Caldisphaera* и *Saccharolobus* способны разлагать ксилан, крахмал, гликоген, лихенан и ламинарин (а последние два – только археи *Acidilobus*) [Itoh et al., 2003; Mardanov et al., 2010; Prokofeva et al., 2009; Sakai, Kurosawa, 2018].

Источниками полисахаридов для архей в гидротермах могут быть компоненты клеточных стенок, внутри- и внеклеточного органического вещества прокариот,

остатки высших растений, грибов, лишайников и т.д. Способность архей *Tardisphaera* извлекать энергию «понемногу, но отовсюду» говорит об уникальной экологической стратегии этой глубокой филогенетической линии и объясняет ее большую представленность (более 40%) в микробных сообществах осадков кислых горячих источников Камчатки, а также гидротермах Японии, Китая, Тайваня, Новой Зеландии, Италии и США. Обилие генов гликозидаз (активность которых предстоит подтвердить, см. далее) делает этих архей перспективным источником ферментов, устойчивых к резким физико-химическим воздействиям. Такие ферменты особенно востребованы в промышленных процессах, протекающих при низких значениях pH и высоких температурах, например при производстве кормовых добавок и в крахмальной промышленности [Girfoglio et al., 2012; Straub et al., 2018; Wang et al., 2020].

3. Свойства и биотехнологический потенциал исследуемых термофильных архей

Эстеразная и липазная активности *Fervidicoccus fontis*

В геноме штамма *F. fontis* 3639Fd был обнаружен ген α/β-гидролазы (MBE9391013.1), последовательность которого была близка к моноацилглицерол-липазам, расщепляющим сложные эфиры карбоновых кислот (КФ 3.1.1.x). При выравнивании с 15 семействами эстераз был определен ее каталитический мотив – GASMGG, семейств III и V. При уточнении филогении ближайшими гомологами являлись неохарактеризованные α/β-гидролазы архей, включая белок из типового штамма *F. fontis* Kam940^T. Ближайшие охарактеризованные ферменты термофильных архей родов *Pyrobaculum, Picrophilus, Sulfolobus* были активны против субстратов с короткими цепями жирных кислот (C_2–C_4), и, таким образом, принадлежащими к эстеразам, но не липазам [Arpigny et al., 1998; Hess et al., 2008; Shao et al., 2014]. Ближайшими охарактеризованными липазами являются ферменты мезофильных бактерий родов *Psychrobacter* и *Moraxella* [Arpigny et al., 1993; Feller et al., 1991] (Рисунок 14).

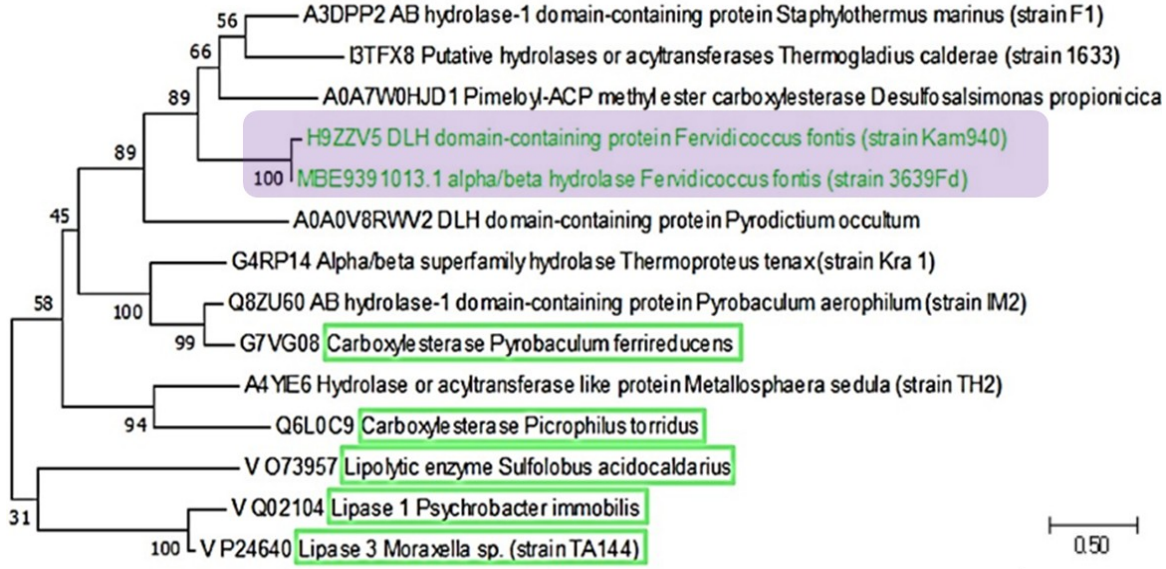


Рисунок 14 *– Филогенетическое дерево предполагаемой липазы F. fontis. Зеленые рамки – ближайшие охарактеризованные липазы и эстеразы архей и бактерий. Дерево построено в MEGA 7, метод Maximum-Likelihood, модель Джонсона-Тэйлора-Торнтона.*

При определении активности эстераз и липаз у *F. fontis* 3639Fd качественным методом на агарозных чашках с ТБ и ТО положительный результат наблюдали во фракции связанных с клеткой белков (ФСКБ), полученной при обработке клеток археи детергентами. Эстеразная активность на ТБ после двух дней инкубации при 70 °С наблюдалась во ФСКБ с клеток, выросших на ТБ, но не на глюкозе. Это говорило об индуцибельности выработки ферментов. Для проверки липазной активности использовали чашки с ТО и родамином В в качестве красителя. После двух дней инкубации наблюдали зоны интенсивного свечения вокруг опытных лунок (Рисунок 15).

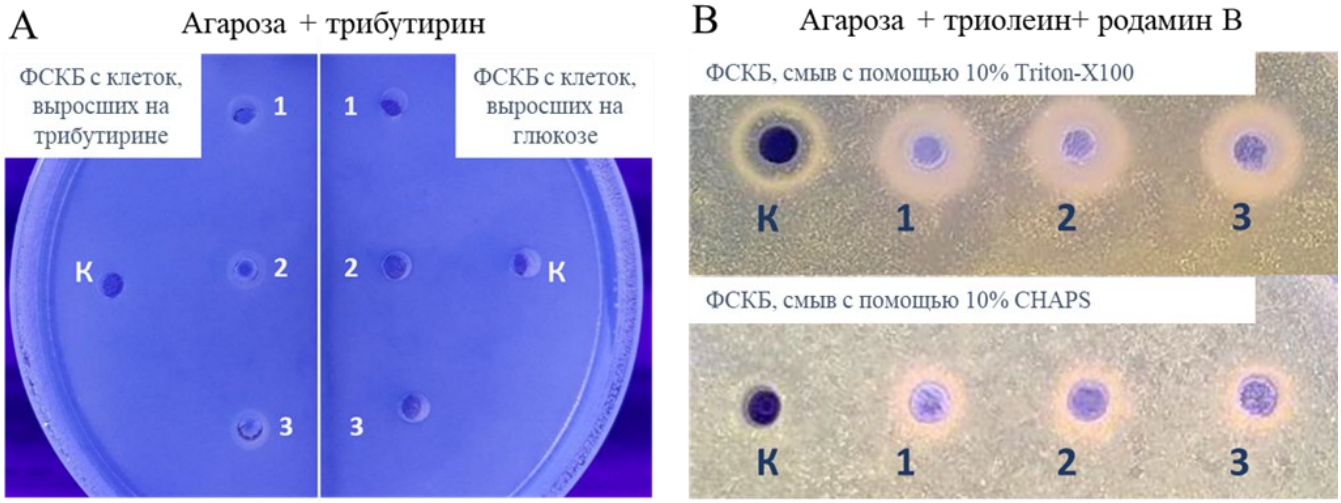


***Рисунок 15** – Определение нативной эстеразной активности 3639Fd и индуцибельности/конститутивности фермента (А) и нативная липазная активность 3639Fd (В). 1, 2, 3 – ФСКБ (в трех повторностях), К – контроль (инкубированная незасеянная обработанная среда).*

Нативная индуцибельная эстеразная и липазная активности ФСКБ *F. fontis* 3639Fd свидетельствует о функционировании генов, кодирующих эти ферменты. Это подтверждает способность данной археи к росту на липидах различной длины жирнокислотной цепи. Липазная ферментная активность является редкой среди термофильных архей – истинная липаза была найдена лишь у *Archaeoglobus fulgidus* [Meghwanshi et al., 2022]. Это открывает перспективы дальнейших исследований в области биотехнологии.

Активность рекомбинантных гликозидаз архей *Tardisphaera*

В геноме *T. miroshnichenkoae* MP-3918 и *T. saccharovorans* AK-3817 коллегами было найдено большое количество генов гликозидгидролаз (GH), что коррелировало с ростом архей на полисахаридах. Внимание в этой работе было уделено семействам GH, гидролизующим разветвленные полисахариды. Для рекомбинантной экспрессии были выбраны два гена из семейства GH12: PRZ02_06100, PRQ610_06305, и два из семейства GH50: PRZ02_05685, PRQ610_06715. Выбор был обусловлен малым количеством архейных ферментов в семействе (GH12) или их отсутствием (GH50). GH12 имеет эндо-глюканазную активность и 95 биохимически охарактеризованных белков (из них 7 архейных). В GH50 известны агаразная и галактозидазная активности и все 40 описанных ферментов принадлежат бактериям. Наш филогенетический анализ показал, что белки архей *Tardisphaera* семейства GH12 относятся к термо- и

гипертермофильным эндоглюканазам. Белки GH50 были удалены от известных описанных гомологов, но сформировали группу с предполагаемыми β-галактозидазами и описанной β-1,3 эндоглюканазой.

Мы получили три белка (по названию гена и номеру семейства: PRQ50, PRQ12 из *T. miroschichenkoae* и PRZ50 из *T. saccharovorans*) и показали их активность качественным методом на агарозных чашках с β-глюканом и лихенаном. Однако наибольшую активность при количественном определении (динитросалициловым методом) показал PRQ50: она составила 37–42 мкг редуцирующих сахаров/мг белка*ч в диапазоне pH от 3,5 до 6 при 83 °C на лихенане. PRQ50 выбрали для дальнейшей характеристики.

Определение оптимумов pH и температуры работы фермента проводили в следующих условиях: 3 мг/мл лихенана, время инкубирования 2 часа, концентрация белка в реакции 70 мкг/мл. Контролями были инкубированные субстрат и фермент по отдельности. Оптимальный pH для PRQ50 – 5,0 (с диапазоном 3,0–8,0), а температура 65 °C (диапазон 37–100 °C) (Рисунок 16, A, B). Добавление к реакционной смеси ионов Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+} увеличивало активность. Добавление детергентов в концентрации 1 мМ не меняло работы. PRQ50 гидролизовал лихенан, β-глюкан, ламинарин (Рисунок 16, C, D).

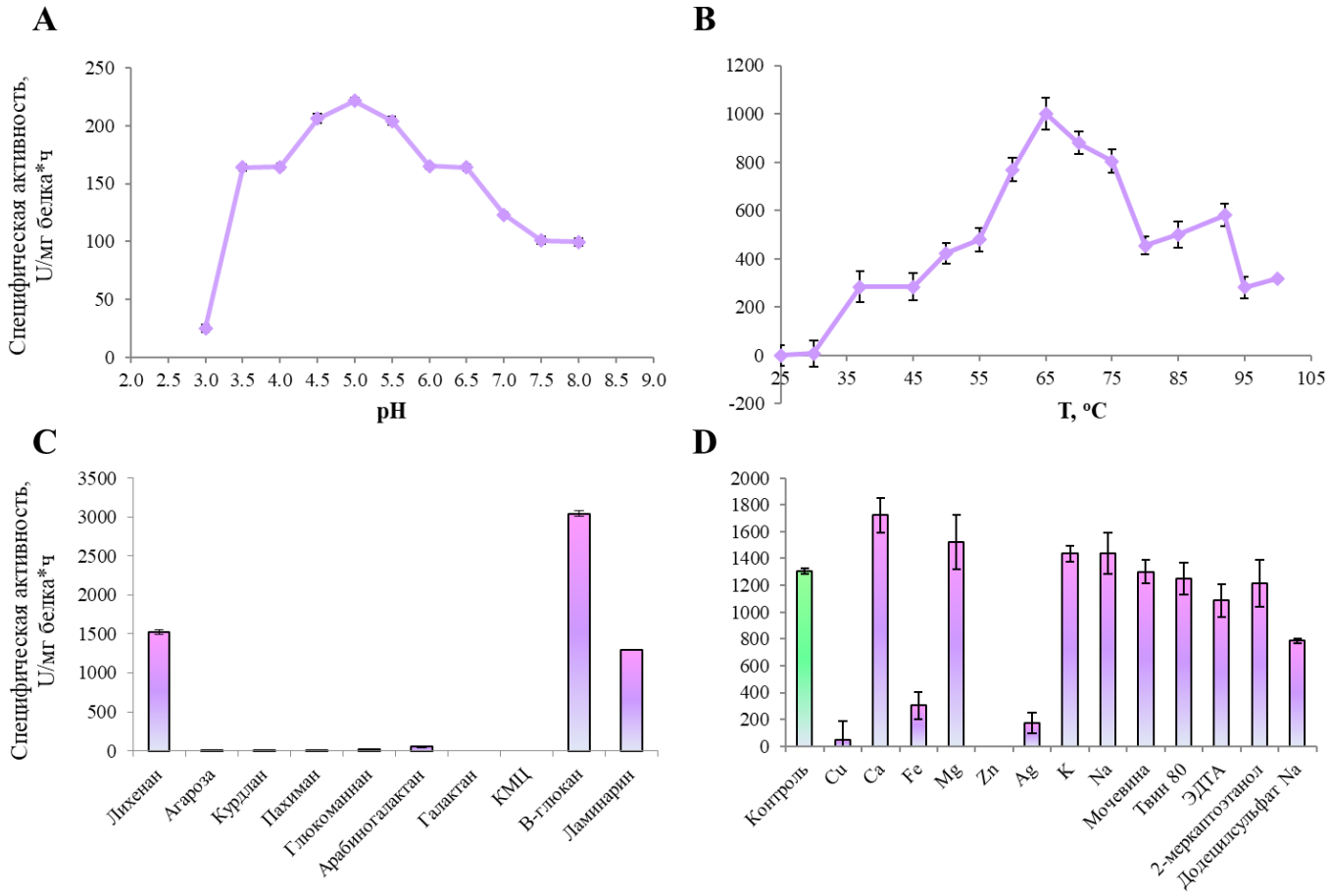


Рисунок 16 *– Начальная биохимическая характеристика белка PRQ50. A – зависимость активности на лихенане от значений pH при 83 °C. B – зависимость активности на лихенане от температуры при оптимальном pH. C – субстратная специфичность в оптимальных pH и температуре. D – активность на лихенане в присутствии различных ионов и детергентов, оптимальные температура и pH.*

Таким образом, была предварительно охарактеризована первая гликозидаза архей рода *Tardisphaera*. Белок работает в широком диапазоне pH и температур с оптимумом, близким к физиологическим предпочтениям организма-хозяина. Гликозидаза PRQ50 принадлежит к семейству GH50, в котором является первым биохимически описанным белком, выделенным из архей. Она активна в отношении β-(1,3) и β-(1,4) связей между остатками глюкозы в субстратах. β-(1,4)-эндоглюканазная (целлюлазная) активность впервые показана для белков семейства GH50. Активность этого фермента (как, вероятно, и многих других гликозидаз у *Tardisphaera*) позволяет этим археям использовать широкий спектр полисахаридов и занимать доминирующие положения в анаэробных сообществах осадков кислых горячих источников. Продолжение исследований ферментов этих микроорганизмов имеет значительный потенциал для биотехнологического применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на развитие методов, позволяющих изучать микробные сообщества в обход культивирования, ключевые вопросы физиологии, экологии и эволюции микроорганизмов остаются без ответа до тех пор, пока не получена чистая или высокообогащенная культура. В этом исследовании такой подход стал основным: от молекулярно-экологического скрининга горячих источников до выделения и всесторонней характеристики чистых культур первых представителей архей трех глубоких филогенетических линий – ‘*Thermolimicoccales*’ (ранее A10/ARK15), *Fervidicoccales* и *Tardisphaeria* (ранее ‘*Ca.* Marsarchaeota/Marsarchaeales’), представленных в значительных количествах в микробных сообществах. Две из этих групп оставались недоступны для изучения из-за отсутствия чистых культур. Разработанная методика длительного накопительного инкубирования при ступенчатом подборе температуры, pH и субстрата может быть применена для выделения и других труднокультивируемых архей.

Мы описали биотехнологический потенциал наших объектов. Характеристика рекомбинантной гликозидазы PRQ50 из архей *Tardisphaera* и нативной липазной активности *F. fontis* подтверждает, что ферменты термоацидофильных архей могут быть востребованы для процессов, протекающих при повышенных температурах и низких значениях pH.

Изученные глубокие линии могут выполнять роль деструкторов сложных органических соединений – углеводов, белков и липидов. Это указывает на значительный вклад термоацидофильных архей в цикл углерода в природных экосистемах.

ВЫВОДЫ

1. Первый масштабный скрининг микробного разнообразия горячих источников Курильских островов показал, что археи доминируют (до 96% сообщества) в высокотемпературных (50–95 °C) гидротермах с pH ниже 3,0.

2. Основными группами архей в горячих кислых источниках Курил и Камчатки являются глубокие филогенетические линии *Fervidicoccales*, A10/ARK15 и ‘*Ca.* Marsarchaeales’, составляя до 11, 88 и 42% соответственно.

3. Благодаря разработанной технике длительного культивирования из осадков горячих источников Камчатки выделены первые представители линий A10/ARK15 и ‘*Ca.* Marsarchaeales’, штаммы АК-4214 и АК-3817.

4. Штамм АК-4214 – медленнорастущий анаэробный термоацидофил, гидролизующий белки и углеводы, отнесенный к новому виду и роду ‘*Thermolimicoccus acidophilus*’ из нового семейства ‘*Thermolimicoccaceae*’ порядка ‘*Thermolimicoccales*’ филума *Thermoplasmatota.*

5. Штамм АК-3817 – медленнорастущий анаэробный термоацидофил, сбраживающий углеводы, особенно полисахариды, относящийся к новому виду *Tardisphaera saccharovorans* нового семейства *Tardisphaeraceae*, порядка *Tardisphaerales* и класса *Tardisphaeria* филума *Thermoproteota*.

6. Представители глубокой линии архей *Fervidicoccales*, штаммы *Fervidicoccus fontis,* способны гидролизовать липидные субстраты с коротко- и длинноцепочечными жирнокислотными остатками, что свидетельствует о новом для филума *Thermoproteota* свойстве.

7. Рекомбинантный белок PRQ50 из археи *Tardisphaera* обладает эндоглюканазной активностью в отношении β-(1,3) и β-(1,4) связей в широком диапазоне температур (37–100 °C) и значений pH (3,0–8,0), что делает его перспективным ферментом для применения в биотехнологических процессах, протекающих в условиях экстремальных параметров среды.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Карасева А.И.**, Ельченинов А.Г., Перевалова А.А., Заюлина К.С., Кочеткова Т.В., Кубланов И.В. *Fervidicoccus fontis* 3639Fd – первая кренархеота, способная расти на липидах // Микробиология. – 2021. – Т. 90 – №4 – с.421-429 – doi: 10.31857/S0026365621040078.

2. **Karaseva A.I.**, Elcheninov A.G., Prokofeva M.I., Klyukina A.A., Kochetkova T.V. Microbial diversity of hot springs of the Kuril Islands // BMC Microbiology. – 2024. – V.24 – 547 – doi: 10.1186/s12866-024-03704-8.

3. Prokofeva M.I.*, **Karaseva A.I.*,** Tulenkov A.S., Klyukina A.A., Suzina N.E., Bale N.J., Mets A., Schleper C., Elcheninov A.G.*, Kochetkova T.V.* Polysaccharide-degrading archaea dominate acidic hot springs: genomic and cultivation insights into a novel *Thermoproteota* lineage // mSystems. – 2025. – V.10 – №10 – e00710-25 – doi: 10.1128/msystems.00710-25 (* – равный вклад авторов).

Материалы конференций

1. **Карасева А.И.** Новые свойства термофильной археи *Fervidicoccus fontis* // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020» [Электронный ресурс] / Отв.ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. – Электрон. текстовые дан. (1500 Мб.) – М.: МАКС Пресс, 2020. – Режим доступа: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2020/index.htm, свободный – Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020». №57. ISBN 978-5-317-06417-4.
2. **Карасева А.И.**, Ельченинов А.Г., Перевалова А.А., Заюлина К.С., Кочеткова Т.В., Кубланов И.В. Липолитические свойства термофильной археи *Fervidicoccus fontis* // Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16–18 ноября 2022 г. – М.: ВАШ ФОРМАТ, 2022. – с.101. ISBN 978-5-00147-435-7.
3. Прокофьева М.И., **Карасева А.И.**, Ельченинов А.Г., Клюкина А.А., Кочеткова Т.В., Кубланов И.В. Термоацидофильные археи рода *Tardisphaera* – первые культивируемые представители глубокой филогенетической линии внутри суперфилума TACK // Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний: Материалы III Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 80-летию д.б.н., проф. Б.Б. Намсараева, 100-летию Республики Бурятия, 300-летию Российской академии наук (3–7 июля 2023 г., Улан-Удэ – Байкальск) / отв. ред. Д.Д. Бархутова, О.П. Дагурова, Т. Г. Банзаракцаева; Сибирское отд-ние РАН [и др.]. – Новосибирск: СО РАН, 2023. – с.91. ISBN 978-5-6048598-6-5.
4. **Карасева А. И.**, Ельченинов А.Г., Туленков А.С., Кочеткова Т.В. Тише едешь – дальше будешь: выделение медленнорастущей археи, представителя глубокой линии внутри филума *Thermoproteota* // Тезисы 4 Российского Микробиологического Конгресса. – Томский государственный университет, 2023. – с.212. ISSN 978-5-00200-015-9.
5. Кочеткова Т.В., **Карасева А.И.**, Прокофьева М.И., Туленков А.С., Кубланов И.В., Клюкина А.А., Ельченинов А.Г. Исследование архей глубоких линий, доминирующих в кислых горячих источниках // Тезисы 4 Российского Микробиологического Конгресса. – Томский государственный университет, 2023. – с.54. ISSN 978-5-00200-015-9.
6. **Karaseva A.I.**, Elcheninov A.G., Prokofeva M.I., Klyukina A.A., Kochetkova T.V. Little islanders: microbiomes of the Kuril Islands hot springs // 14TH INTERNATIONAL CONGRESS ON EXTREMOPHILES – Greece, 22-26 September 2024, poster 32, page 135.
7. Kochetkova T.V., Prokofeva M.I., **Karaseva A.I.,** Tulenkov A.S., Klyukina A.A., Elcheninov A.G. Slow and steady wins the race: the first cultivated *Marsarchaeales* dominating acidic hot springs // MOLECULAR BIOLOGY OF ARCHAEA – France École polytechnique (Palaiseau), 24-27 June 2024, poster 14, page 87.
8. Klyukina A.A., Elcheninov A.G., Prokofeva M.I., **Karaseva A.I.**, Tulenkov A.S., Kochetkova T.V. Specific primers for quantification of a deep phylogenetic lineage *Marsarchaeales* in microbial communities of acidic hot springs // QUIMICUBA 2024, XI International Congress of Chemistry, Biochemistry and Chemical Engineering, VI International Symposium ON Biochemistry AND Molecular Biology – Havana, Cuba, 04-08 November 2024, poster I-052, page 424.
9. **Карасева А.И.**, Ельченинов А.Г., Туленков А.С., Клюкина А.А., Кочеткова Т.В. Выделение и характеристика новых порядков архей, доминирующих в горячих источниках Курил и Камчатки // Тезисы 5 Российского Микробиологического Конгресса. – ВолГМУ, Волгоград, 2025. ISSN 978-5-9652-1099-2.
10. Туленков А.С., Ельченинов А.Г., **Карасева А.И.**, Меркель А.Ю., Заюлина К.С., Клюкина А.А., Кочеткова Т.В. К вопросу о сапротрофной природе термофильных архей *Thermoplasmata* A10 // Тезисы 5 Российского Микробиологического Конгресса. – ВолГМУ, Волгоград, 2025. ISSN 978-5-9652-1099-2.