

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»
(МФТИ, Физтех)

На правах рукописи

Карасева Алина Игоревна

**НОВЫЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЛИНИИ И СВОЙСТВА
ТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕЙ**

Специальность 1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Т.В. Кочеткова

Оглавление

1	ВВЕДЕНИЕ.....	5
	Актуальность темы исследования.....	5
	Степень разработанности темы исследования.....	6
	Цели и задачи.....	9
	Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы	9
	Методология и методы исследования.....	10
	Положения, выносимые на защиту	12
	Степень достоверности полученных результатов	12
	Апробация результатов работы	13
	Личный вклад автора	13
	Статьи в рецензируемых журналах.....	13
	Материалы конференций	14
	Структура и объем работы	16
	Благодарности	16
2	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
	2.1 Общая характеристика архей.....	18
	2.2 Систематика и таксономия архей.....	23
	2.3 Термофильные археи	26
	2.3.1 История изучения термофильных архей	26
	2.3.2 Природные наземные места обитания термофильных архей	29
	2.3.3 Особенности микробных сообществ кислых гидротерм.....	31
	2.3.4 Некультивируемые группы термофильных архей	34
	2.4 Современные подходы для культивирования глубоких филогенетических линий архей.....	35

2.5	Практическая значимость термофильных архей	38
3	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
3.1	Объекты исследования	42
3.1.1	Пробы из горячих источников Курильских островов и Камчатки	42
3.1.2	Штаммы термофильных архей	44
3.2	Молекулярно-биологические методы.....	44
3.2.1	Выделение ДНК	44
3.2.2	Секвенирование библиотек ампликонов.....	45
3.3	Работа с природными пробами.....	45
3.3.1	Методы анализа микробных сообществ.....	45
3.3.2	Химический анализ вод и осадков	46
3.3.3	кПЦР.....	47
3.3.4	FISH.....	48
3.4	Работа с культурами архей.....	49
3.4.1	Приготовление питательных сред и их компонентов	49
3.4.2	Получение накопительных и чистых культур	51
3.4.3	Ростовые эксперименты	52
3.4.4	Определение филогенетического положения	55
3.4.5	Микроскопия	56
3.4.6	Определение продуктов метаболизма	56
3.4.7	Липидный анализ	57
3.5	Определение биотехнологического потенциала глубоких филогенетических линий термофильных архей	58
3.5.1	Ферментативная активность	58
3.5.2	Получение рекомбинантных ферментов	61

	3.5.3 Сравнительная геномика.....	61
4	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	63
	4.1 Микробные сообщества термальных источников Курил и Камчатки ..	63
	4.2 Получение чистых культур и фенотипическая характеристика архей глубоких филогенетических линий.....	75
	4.2.1 ‘ <i>Thermolimicoccus acidophilus</i> ’ АК-4214	75
	4.2.2 <i>Fervidicoccus fontis</i> 3639Fd.....	82
	4.2.3 <i>Tardisphaera saccharovorans</i> АК-3817	84
	4.3 Свойства и биотехнологический потенциал исследуемых термофильных архей	92
	4.3.1 Эстеразная и липазная активность <i>Fervidicoccus fontis</i>	92
	4.3.2 Активность рекомбинантных гликозидаз архей <i>Tardisphaera</i>	95
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
6	ВЫВОДЫ.....	106
	Список сокращений и условных обозначений.....	107
	Список литературы	110
	Приложения	133

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Археи на сегодняшний момент представляют наименее изученный домен жизни. Во-первых, это связано с относительно недавним открытием этой группы прокариот, а во-вторых, с трудностями работы с этими организмами, в частности, культивированием и выделением в чистые культуры. Однако известно, что многие молекулярные процессы архей и ферменты, обеспечивающие их протекание, не похожи ни на бактериальные, ни на эукариотические, либо содержат общие сходства и с теми, и с другими. Эти организмы играют важную роль в глобальных геохимических циклах (например, углерода, азота, серы) и обнаруживаются практически повсеместно (как свободноживущие, так и в качестве симбионтов других живых существ) [Wolferen van et al., 2022].

Большинство архей, выделенных в чистые культуры, являются экстремофильными организмами, многие из них – термофилы, растущие оптимально при температурах выше 50 °C. Природная среда обитания термофильных архей – горячие источники, где данные прокариоты, согласно молекулярно-биологическим исследованиям, занимают значительную часть сообщества – около 40–80%. Большинство из них относятся к глубоким филогенетическим линиям, и среди них отсутствуют культивируемые представители. Выделение новых таксонов в чистые культуры и их детальное исследование расширяет возможности как для понимания экосистемных процессов, так и для выявления новых свойств и метаболических возможностей живых организмов.

Подобные условия среды обитания (часто сопровождающиеся не только высокой температурой, но и экстремальными значениями кислотности, низким содержанием кислорода, высокой концентрацией тяжелых металлов и токсических веществ) предполагают наличие у термофильных архей особых молекулярных и биохимических механизмов функционирования их клеток. Особую ценность в этом случае приобретают ферменты термофилов – так называемые термозимы: их

высокая активность и устойчивость имеют большое значение для биотехнологии [Zeldes et al., 2015].

Таким образом, выделение новых таксонов термофильных архей и изучение их метаболических свойств представляют ценность как в вопросах фундаментальной микробиологии, так и в биотехнологическом аспекте применения микроорганизмов на производствах.

Степень разработанности темы исследования

По оценкам, около 3,5% от всего микробного разнообразия бактерий и архей, населяющих нашу планету, выделены в чистые культуры [Lewis et al., 2021]. При этом соотношение культивируемых бактерий и архей крайне неравномерно. В международных коллекциях микроорганизмов количество депонированных штаммов архей в десятки раз меньше, чем бактерий. Так, например, в одной из самых больших мировых коллекций Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, <https://www.dsmz.de/>, дата обращения 21.05.2026) в настоящее время хранится 12487 типовых штаммов бактерий и всего 405 типовых штаммов архей. С развитием молекулярно-биологических методов исследования (метабаркодинг по функциональным генам, метагеномика, метатранскриптомика, метаболомика) стало возможным изучать микробные сообщества, не прибегая к культивированию и выделению чистых культур, что, безусловно, расширило понимание ученых в вопросах разнообразия и возможностей прокариот. За время так называемой «геномной эры» в микробиологии стало очевидным, что археи населяют все экотопы на нашей планете. В некоторых из них они даже превосходят по численности бактерий, как, например, в экстремальных местах обитания (горячие кислые источники, гиперсоленые озера, кислые шахтные воды), олиготрофной пелагиальной зоне Мирового Океана, глубоких низкотемпературных осадках морских и наземных экосистем [Baker et al., 2020; Zou et al., 2025]. Однако многие доминирующие в природных сообществах археи относятся к глубоким филогенетическим линиям (уровня новых порядков, классов и даже филумов) и находятся в статусе «некультивируемые». Их экологические

функции и метаболические возможности остаются в значительной степени гипотетическими.

Горячие источники традиционно считаются привычными местами обитания большого разнообразия архей. Наиболее часто в зонах вулканов встречаются кислые горячие источники, на химический состав которых влияет большое количество серных соединений и вулканических газов, поднимающихся из магматических очагов [Qi et al., 2025; Rowe et al., 2024]. По всему миру – от Йеллоустонского национального парка (ЙНП) в США до гидротерм нашей страны – молекулярно-биологическими методами было обнаружено, что в сообществах доминируют некультивируемые или плохо изученные группы архей глубоких филогенетических линий, часто представленные всего 1–2 описанными организмами. Среди них: 1) глубокая линия, представленная единственным описанным видом *Fervidicoccus fontis* (порядок *Fervidicoccales*, филум *Thermoproteota*), выделенным из горячего источника Камчатки и повсеместно распространенным в наземных гидротермах [Perevalova et al., 2010]; 2) не имеющая к началу нашей работы культивируемых представителей группа архей A10/ARK15, относящаяся к филуму *Thermoplasmata*, и известная исключительно по анализу участков ДНК уже более 30 лет; и 3) группа архей предполагаемого филума ‘*Candidatus* Marsarchaeota’, для которых на основании метагеномных данных предсказан гетеротрофный аэробный метаболизм и участие в циклах серы и железа [Barns et al., 1994; Jay et al., 2018; Kochetkova et al., 2022; Malygina et al., 2023; Qi et al., 2025; Rozanov et al., 2020; Rozanov et al., 2021].

Молекулярно-биологические техники изучения микробных сообществ и микробного метаболизма обладают рядом недостатков как раз в силу предсказательного характера получаемых результатов и, зачастую, недостаточным качеством полученного генетического материала. Кроме того, без экспериментов с культурами невозможно надёжно установить функции генов, а значит, новые или необычные свойства микроорганизмов могут быть просто не распознаны. Выделение микроорганизма в чистую или высокообогащенную культуру и его

дальнейшее изучение позволяет уверенно определять его филогенетическое положение, метаболические возможности, экологическую роль.

Немаловажным моментом является возможность использовать выделенный штамм (или его фермент) в биотехнологии. В промышленности наиболее часто применяются ферменты бактерий и грибов (в силу относительной простоты их культивирования), но, согласно текущим исследованиям, ферменты термофильных архей обладают бóльшим потенциалом, т. к. их белки характеризуются высокими показателями стабильности [Miguel Bouzas de, Barros-Velazquez, Gonzalez Villa, 2006; Pineda De Castro, Dopson, Friedman, 2016]. Замена мезофильных биомолекул термостабильными с аналогичными свойствами несет множество преимуществ, т. к. повышение температуры ведет к увеличению скорости процесса, а также исключает затраты энергии на охлаждение системы, уменьшает пассивацию поверхностей и контаминацию [Donati, Castro, Urbiet, 2016]. Ферменты из термофильных прокариот открывают новые возможности для биокатализа и биотрансформации, а также для развития экономики и новых направлений исследований. Так, например, именно ферменты термофильных прокариот, бактерии *Thermus aquaticus* и архей *Pyrococcus furiosus*, помогают осуществлять прохождение полимеразной цепной реакции (ПЦР), без которой невозможны успехи современной науки и медицины [Chien, Edgar, Trela, 1976; Lundberg et al., 1991]. Экстремолиты архей, например, производные полиолов (эктоин, гидроксизэктоин и бетаин), углеводы (трегалоза, производные маннозы) используются в косметической и фармацевтической промышленности [Raddadi et al., 2015]. Чрезвычайно химически стабильные липиды мембран архей обеспечивают их перспективность в качестве систем доставки лекарственных препаратов [Eichler, 2001]. Большим плюсом применения подобных веществ является их биоразлагаемость.

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 было 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, что в анаэробных осадках кислых горячих источников доминируют археи глубоких филогенетических линий, в основном не имеющих культивируемых представителей.

Исследованы представители трех глубоких филогенетических линий термофильных архей, широко распространенных в горячих источниках. На примере *F. fontis* впервые показана способность архей филума *Thermoproteota*

расти на липидах. Выделены в чистые культуры и подробно охарактеризованы первые представители архей нового порядка '*Thermolimicoccales*' (ранее группа A10/ARK15) внутри филума *Thermoplasmatota* и нового класса *Tardisphaeria* (ранее '*Ca. Marsarchaeota*') внутри филума *Thermoproteota*.

Показано, что представители новых глубоких линий могут достигать до 88% (например, археи группы A10) от всего состава сообщества осадков горячих источников Курило-Камчатской гряды и играют роли первичных деструкторов сложных органических соединений – липидов, полисахаридов, белков. Проведено первичное исследование биотехнологического потенциала этих архей. В частности, показаны нативные активности липазы из *F. fontis* 3639Fd, а из представителей рода *Tardisphaera* получены рекомбинантные ферменты с эндоглюканазной активностью, один из которых получил первичное биохимическое описание.

Полученные результаты расширяют представление о глубоких филогенетических линиях термофильных архей: от выделения первых представителей нового порядка и класса до характеристики их метаболизма, экологической роли, закономерностей распространения и биотехнологического потенциала.

Методология и методы исследования

Отбор проб из горячих источников проводился с максимальным сохранением стерильности, минимизируя контакт с кислородом воздуха. В зоне отбора образцов измеряли температуру, pH, окислительно-восстановительный (Eh) потенциал. При необходимости отбирались также пробы воды и осадка для оценки химического состава источника. С использованием специальных пакетов в программном обеспечении R был проведен анализ состава микробных сообществ с поиском статистических зависимостей от физико-химических условий источников. Оценка состава микробных сообществ проводилась с помощью данных секвенирования нового поколения (NGS) варьируемых участков гена 16S рРНК, представленность целевых групп архей – с помощью количественной ПЦР (кПЦР) с использованием

специфических праймеров. В работе применялись следующие микробиологические методы: разработанная методика длительного высокотемпературного культивирования в анаэробных условиях для получения накопительных культур, метод предельных разведений для получения чистых культур, фазово-контрастная микроскопия, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия (ТЭМ, СЭМ). Фенотипическое описание новых видов проводилось в соответствии с современными требованиями: были определены оптимальные условия культивирования и параметры роста культур, спектры используемых 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). Таксономическая принадлежность новых изолятов определялась через полногеномный анализ (секвенирование Illumina, Nanopore) и построение филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия (Maximum/Approximately Likelihood) по наборам «ar53», «ar122». Работа по описанию ферментов из термофильных архей включала в себя построение филогенетических деревьев для отдельных белков, их рекомбинантную экспрессию в штаммах *Escherichia coli*, очистку полученных белков Ni-аффинной хроматографией, качественное и количественное биохимическое описание их свойств или же работу по изучению нативной активности. Доменная организация белков была предсказана с помощью онлайн-инструментов Phobius, Hmmer, ExPASy.

Положения, выносимые на защиту

1. В микробных сообществах гидротерм Курильских островов археи доминируют (до 96%) в источниках с температурами 50–95 °С и pH 1,5–3,0, при этом основным фактором их распределения является pH.
2. Выделенная из горячего источника Камчатки архея '*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. Архея *Fervidicoccus fontis*, единственный описанный представитель порядка *Fervidicoccales*, обладает способностью гидролизовать липидные субстраты.
4. Выделенная из горячего источника Камчатки архея *Tardisphaera saccharovorans* АК-3817 глубокой линии '*Ca. Marsarchaeales*' представляет новый класс филума *Thermoproteota* – *Tardisphaeria* class. nov. Архея 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 полученных результатов

Сочетание современных методов микробиологии, молекулярной биологии, биохимии и биоинформатики позволили получить качественные результаты в изучении представителей глубоких филогенетических линий архей, определить их особенности, свойства и потенциал для биотехнологии. Достоверность полученных результатов исследования подкреплена использованием современных подходов, сертифицированного оборудования и качественных материалов. Эксперименты проведены в нескольких повторностях с обязательной постановкой контроля. Полученные данные были проанализированы с помощью современных программ и методов статистической обработки.

Апробация результатов работы

По материалам научной работы были опубликованы 3 статьи в международных рецензируемых журналах уровня Q1 (mSystems, BMC Microbiology) и Q3 (Microbiology). Результаты были представлены в виде устных и стендовых докладов и получили высокую оценку на международных конференциях (Extremophiles (Греция), Molecular biology of archaea (Франция) и др.), 4-м и 5-м Российских микробиологических конгрессах и других отечественных конференциях, а также получили внимание СМИ.

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, филогенетическом анализе, написании статей и тезисов конференций.

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 отделение 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.

Структура и объем 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

Работа была выполнена на базе Лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот Отдела биологии экстремофильных микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН. Автор благодарит всех сотрудников лаборатории за благоприятную атмосферу сотрудничества и взаимопомощь, без которой выполнение данной работы было бы невозможным.

Автор благодарит своего научного руководителя, к.б.н. Кочеткову Татьяну Вячеславовну за передачу ценных знаний и опыта в области работ с термофильными археями, справедливое наставничество и бесконечную поддержку на всех этапах диссертационного исследования. Автор благодарен сотрудникам лаборатории: к.б.н. Заюлиной Ксении Сергеевне за обучение работе по исследованию ферментов термофильных архей; к.б.н. Клюкиной Александре Антоновне за наставничество в молекулярно-биологических работах, а также разработку специфических для целевых групп архей праймеров и зондов для молекулярно-биологических экспериментов, необходимых для данной работы, и секвенирование ДНК из природных образцов, накопительных и чистых культур; к.б.н. Ельченинову Александру Геннадьевичу за филогенетический анализ чистых культур и помощь в работе по описанию разнообразия микробных сообществ; заведующему лаборатории к.б.н. Фролову Евгению Николаевичу за ценные теоретические замечания в ходе работы; к.б.н. Переваловой Анне Александровне и

к.б.н. Прокофьевой Марии Игоревне за предоставленные чистые культуры архей *Fervidicoccus fontis* и *Tardisphaera miroshnichenkoe* соответственно. Автор благодарит с.н.с. Лаборатории молекулярной экологии и филогеномики бактерий ФИЦ Биотехнологии РАН к.б.н. Куличевскую Ирину Сергеевну за помощь с FISH, инженера Лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания Иваненко Артема Александровича за работы по определению продуктов метаболизма термофильных архей, сотрудницу Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (г. Пущино) к.б.н. Сузину Наталью Евгеньевну за работы с образцами архей на ТЭМ и СЭМ. Автор признателен сотрудникам Томского политехнического (Лаборатория гидрогеохимии под рук. Хвощевской А.А.) и Московского государственного университетов (Кафедра геохимии Геологического факультета, Савенко А.В.) за работы по определению химического состава вод и осадков. Автор благодарит сотрудника Института морских исследований Нидерландов Николь Бэйл за работы по определению состава мембранных липидов. Автор также благодарит Центр коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН за предоставленную техническую составляющую ряда экспериментов. Автор выражает глубокую признательность д.б.н. Бонч-Осмоловской Елизавете Александровне, д.б.н. Хижняк Татьяне Владимировне, д.б.н. Дедыш Светлане Николаевне, д.б.н. Сорокину Дмитрию Юрьевичу, к.б.н. Литти Юрию Владимировичу за ценные научные коммуникации в ходе выполнения работы.

Автор благодарит коллектив сотрудников Кроноцкого и Курильского государственных заповедников за предоставленную возможность экспедиционных исследований. Автор также благодарен своим коллегам за слаженную работу во время этих поездок.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 21-54-10006 Ко-а «Новые термостабильные гидролазы архей Курило-Камчатского региона» и РНФ № 23-14-00312 ««Темная материя» архейного мира – культивирование и сравнительная геномика представителей новых глубоких филогенетических линий». Автор благодарит всех участников этих проектов.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Общая характеристика архей

Археи – одноклеточные прокариотические микроорганизмы, которые, наравне с бактериями и эукариотами, представляют отдельный домен жизни.

Первоначально архей не выделяли в самостоятельную таксономическую группу, так как внешне они не отличаются от бактерий. Развитие методов молекулярной биологии, в особенности секвенирования последовательностей ДНК и РНК по Сэнгеру, позволило перейти от фенотипических признаков микроорганизмов к анализу их генетического материала и более четкому представлению их происхождения и филогении. Выделение в отдельный домен произошло в 1977 г. коллективом Карла Вёзе, предложившим метод определения филогенетического положения организмов на основании сходства последовательностей 16S рРНК. Используя малую субъединицу рРНК в качестве эволюционного хронометра, он установил, что метаногенные микроорганизмы имеют фундаментальные генетические отличия от бактерий, и эти организмы были названы археобактериями («древними бактериями»), а в последствии археями. На основании этих данных была предложена новая система, разделившая прокариот на две группы. Это открытие привело к составлению трехдоменного древа жизни (эукариоты, бактерии и археи), ставшего парадигмой систематики живых организмов до недавнего времени. Однако сейчас накапливаются факты, позволяющие выделить на древе жизни только две основные ветви – бактерий и архей, а эукариот считать дочерней археям группой. Основанием для этой гипотезы стало открытие архей *Asgard*, чьи геномы содержат многочисленные последовательности, гомологичные генам эукариотических белков. Таким образом, современные данные реконструируют древо жизни не как три расходящиеся ветви, а как два домена, где сложная клеточная организация эукариот является результатом глубокой эволюции архей (Рисунок 1) [Anda De et al., 2026; Vosseberg et al., 2024; Williams et al., 2019; Woese, Kandler, Wheelis, 1990].

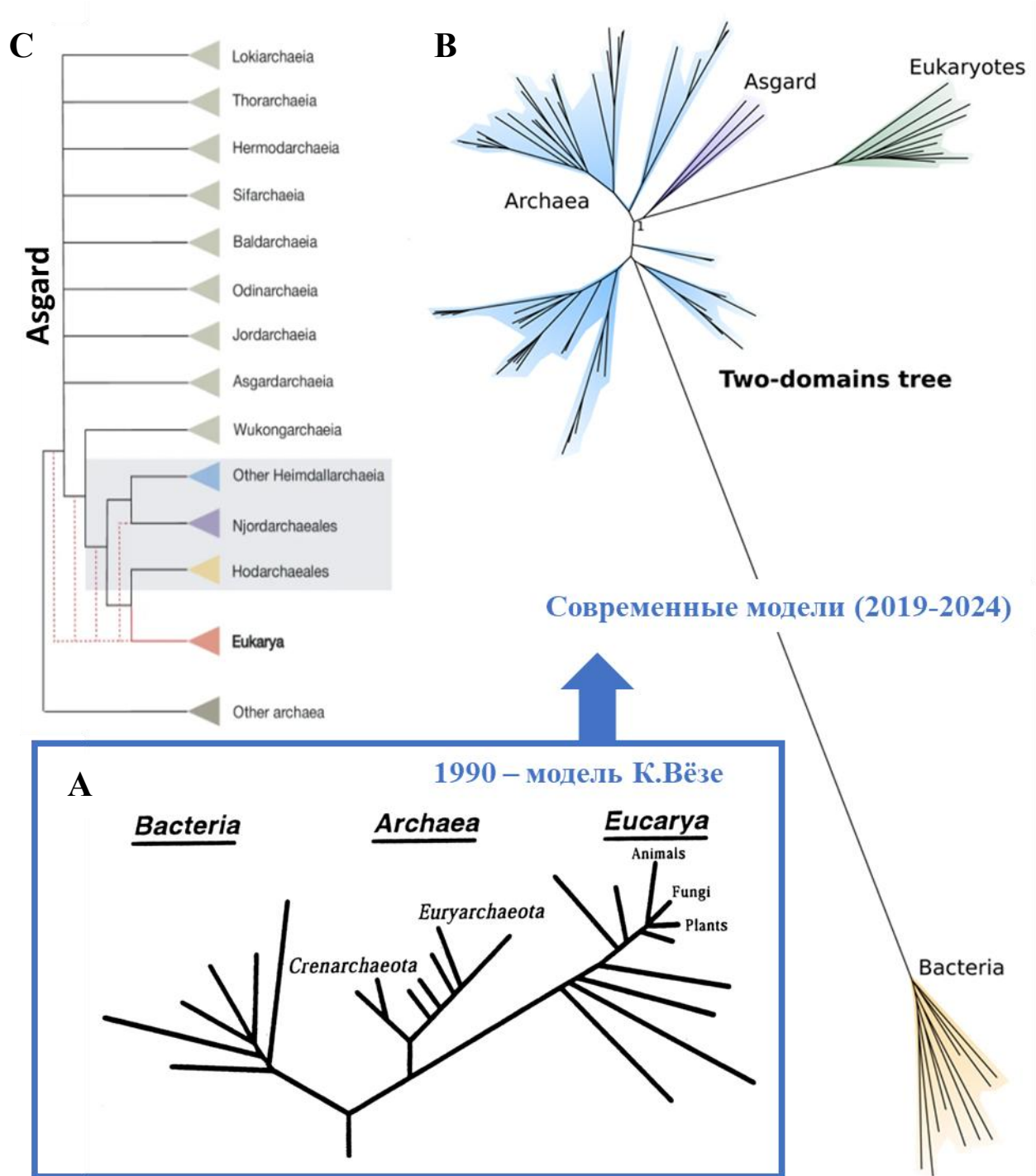


Рисунок 1 – Модели трех- (A) и двухдоменной (B) организации древа жизни и положение эукариот внутри группы Asgard (C). Цитируется по [Vosseberg et al., 2024; Williams et al., 2019; Woese, Kandler, Wheelis, 1990], с изменениями.

Архей традиционно считают типичными обитателями мест, экстремальных по физико-химическим параметрам, но они – космополиты. Чистые культуры были выделены из гидротермальных наземных и подводных систем, соленых и содовых озер, кислых шахт, систем очистки сточных вод и кишечника человека и

животных. Использование метагеномных методов детекции позволило обнаружить архей в океанических водах, пресных озерах и почвах [Chaban, Ng, Jarrell, 2006; Pester, Schleper, Wagner, 2011]. Археи могут вступать в симбиозы между собой, с бактериями в составе различных биопленок, а также с простейшими, корнями и листьями растений, с позвоночными и беспозвоночными животными [Moissl-Eichinger et al., 2018]. Современные данные показывают разнообразие архей в желудочно-кишечном тракте, дыхательных путях, мочеполовой системе, на поверхности кожи человека. Значение архей для здоровья изучается сравнительно недавно, и истинных патогенов среди них не обнаружено. Считается, что метаногенные археи позитивно влияют на ЖКТ, участвуя в дегазации и утилизации продуктов метаболизма бактериальной микрофлоры, таких как водород, углекислота и триметиламины. Есть данные, что некоторые молекулы архей (РНК, глицеролипиды) стимулируют врожденный иммунитет, а метан обладает противовоспалительными и антиоксидантными свойствами. При этом отмечается, что численность и разнообразие архей может быть ассоциированы с такими заболеваниями как синусит, вагинит и некоторыми видами рака [Kuehnast et al., 2025].

Среди архей встречаются лито- и органо-, авто- и гетеротрофные, аэробные и анаэробные, фото- и хемотрофные представители [Madigan et al., 2022]. Изучение архей позволило расширить физико-химические границы жизни: именно среди них известны самый термоустойчивый (*Methanopyrus kandleri*, растущий при 122 °С), кислотоустойчивый (*Picrophilus oshimae*, растущий при pH около 0), пьезоустойчивый (*Thermococcus piezophilus*, переносящий давление в 130 МПа), ксероустойчивый и галоустойчивый (*Haloquadratum walsbyi*, способный жить при 36% NaCl и активности воды 0,63) организмы Земли [Bolhuis et al., 2006; Golyshina et al., 2016; Schleper et al., 1995; Takai et al., 2008; Zeng et al., 2009].

Клетки архей сходны с бактериальными по строению и по некоторым молекулярным механизмам функционирования, однако, имеются принципиальные различия. Формы клеток могут быть разнообразными – от привычных палочек и кокков до геометрически правильных квадратов, как, например, у археи *H. walsbyi*

[Burns et al., 2007]. Клеточная стенка, как правило, отсутствует, но, если имеется, состоит из архейного пептидогликана (псевдомуреина). Его состав может быть различным из-за особенностей местообитания организма. Часть компонентов схожа по структуре с бактериальными аналогами, что свидетельствует о конвергентной эволюции прокариот. При этом процесс синтеза клеточной стенки архей гомологичен синтезу внеклеточного матрикса эукариотических клеток. Мембраны клеток архей отличаются от мембран остальных живых организмов – они состоят из разветвленных изопреноидных цепей фитанила, связанных с углеродом в положениях 2, 3 в молекуле глицерина простой эфирной связью, что влияет на её текучесть, вязкость и термоустойчивость [Albers, Meyer, 2011]. Некоторые археи, например, *Ignicoccus hospitalis*, могут иметь две мембраны, разделенные периплазматическим пространством [Huber et al., 2012]. На поверхности клеток могут встречаться гликопротеидные гексагональные структуры – S-слои, которые определяют их форму, участвуют в делении, защите, фаговой адгезии и работают как "молекулярные сита" клетки [Zhu et al., 2017]. Архейные жгутики имеют свой собственный способ сборки от основания и специфический набор кодирующих генов, объединенных в кластер [Ng, Chaban, Jarrell, 2006]. Для клеточной адгезии и образования биопленок некоторые археи используют специфические образования – канюли, гами, тафи – имеющие трубчатую или нитевидные структуры. У архей также обнаруживаются пили, сходные с пилиями IV типа у бактерий [Albers, Meyer, 2011; Galeva et al., 2025; Jarrell et al., 2013; Sleutel et al., 2025]. Недавние исследования показывают наличие у асгардархей клеточных выростов (протрузий) с настоящей системой цитоскелетных белков, внутриклеточных везикулоподобных структур [Imachi et al., 2025; MacLeod et al., 2025; Rodrigues-Oliveira et al., 2023]. Для физического разделения цитоплазматического содержимого в клетках архей могут иметься нанокомпарменты (НК) в виде белков-энкапсулинов и связанного с ними содержимого. Так, обнаруженные у археи *P. furiosus* НК содержат ферригидрит как продукт защиты от окислительного стресса. У некоторых галофильных архей обнаружены газовые везикулы, обеспечивающие клетке плавучесть и ряд других

адаптаций. В целом, исследование морфологии архей – растущая область, где особую ценность приобретает развитие методов визуализации (различные виды электронной и криоэлектронной микроскопии, зондовая микроскопия и т.д.) [Ansell et al., 2026; Charles-Orszag, Albers, 2025; Rodrigues-Oliveira et al., 2023].

Генетический материал архей представлен в виде кольцевой хромосомы и плазмид, и может быть копияным [Wolferen van et al., 2022]. Размер генома архей, как правило, в 2–3 раза меньше бактериальных. В целом, геном архей представлен оперонной структурой, часто с интронами. Гены, кодирующие ферменты, участвующие в репликации ДНК и экспрессии генов, схожи с эукариотическими. Имеются мобильные генетические элементы, в многокопийном состоянии встречаются профаги и плазмиды. Точек *ori* может быть несколько, инициация и регуляция репликации происходит за счет ДНК-полимеразы и других белков «эукариотического» типа, но сам способ репликации больше напоминает бактериальный. Горизонтальный перенос генов возможен не только между собой, но и с бактериями и эукариотами [Воробьева, 2007; O'Donnell, Langston, Stillman, 2013; Peeters et al., 2015]. Примечательно, что известная на весь мир система «иммунного ответа» микроорганизмов, CRISPR, впервые была обнаружена у архей [Lander, 2016; Mojica, Juez, Rodriguez-Valera, 1993]. В процессе транскрипции участвует мультисубъединичная РНК-полимераза, имеющая строение «эукариотического» типа. Субъединицы рибосом имеют коэффициенты седиментации 30S и 50S, как и у бактерий. Особенности трансляции у архей являются наличие последовательности Шайна-Дальгарно на мРНК (как у бактерий), метионина как первой аминокислоты пептида (как у эукариот), устойчивость к хлорамфениколу, чувствительность к дифтерийному токсину [Пиневиц, 2006]. В составе белков у архей встречаются уникальные аминокислоты – гипузин, селеноцистеин, пирролизин. В целом, процесс трансляции больше напоминает эукариотический. Шапероны архей, помимо основной функции, в условиях отсутствия клеточной стенки могут создавать филаментоподобные структуры, выполняющие функции цитоскелета, а при высоких температурах сохранять белки в активной конформации. Для разрушения белковых молекул в

клетках архей имеются протеасомы [Воробьева, 2007; Schmitt et al., 2020]. Некоторые белки архей могут выдерживать нагревание до 140 °С, обладать повышенной гидрофобностью и плотностью упаковки, что препятствует попаданию воды в структуру молекулы и снижает вероятность ее денатурации [Cicicopol et al., 1994; Lieph, Veloso, Holmes, 2006; Satyanarayana, Littlechild, Kawarabayasi, 2013]. Археи обладают разнообразными белками цитоскелета, например, кренактины, локиактины, аркадины, являющиеся предковыми формами актина эукариот. Также некоторые археи обладают гомологами белков цитоскелета бактериального типа, такими как FtsZ (гомолог тубулина), MreB (гомолог актина). У асгардархей обнаружены истинные микротрубочки, образуемые белками Atub, гомологичными тубулину эукариот [Wollweber et al., 2025], что подтверждает гипотезу происхождения цитоскелета эукариот от архей. Деление клеток (у метаногенов и галофильных архей) может происходить как по бактериальному типу (FtsZ-тип), так и по «эукариотическому» с помощью белков ESCRT-III, Vps4 и CdVB (у некоторых *Thermoproteota*), а также за счет действия обеих систем (аммиак-окисляющие археи, асгардархеи) [Ithurbide et al., 2022; Makarova et al., 2024; Pende et al., 2021; Wolferen van et al., 2022].

2.2 Систематика и таксономия архей

С момента работ команды Вёзе архей долгое время разделяли на два филума: *Euryarchaeota* (представленный метаногенами, галофилами и некоторыми (гипер-) термофилами) и *Crenarchaeota* (куда входили термофильные и гипертермофильные археи). Спустя 30 лет, систематика, а вместе с ней и таксономия архей стали расширяться стремительными темпами. В 2002 г. был открыт филум *Nanoarchaeota*, представители которого паразитируют на других археях [Huber et al., 2002]. В 2005 г. выделили первого представителя *Thaumarchaeota* (аммиак-окисляющих архей), а в 2008 – первую культуру термофильных *Korarchaeota* [Brochier-Armanet et al., 2008; Elkins et al., 2008; Könneke et al., 2005]. В 2011 г. было предложено объединить *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* и *Korarchaeota* в один суперфилум *TACK*. Туда же вошли некультивируемые на тот

момент филумы *Geoarchaeota*, *Bathyarchaeota* и *Verstraetearchaeota* [Spang, Saceres, Ettema, 2017]. С момента открытия наноархей было найдено большое количество микроорганизмов подобного строения и образа жизни, и учеными была предложена идея объединения этих групп в суперфилум *DPANN*, в который вошли филумы *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota* и *Nanohaloarchaeota*. Особый интерес научного сообщества вызывают представители суперфилума *Asgard*, среди которых, согласно гипотезе, находился предок эукариотической клетки [Tobiasson et al., 2026; Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017]. Первым культивируемым представителем асгардархей стал ‘*Ca. Promethearchaeum syntrophicum*’, исследование клеточной морфологии которого позволило построить модель происхождения эукариот от архей и нефагоцитарно захваченных ими предков альфапротеобактерий. Предложенная гипотеза указывает на важность синтрофических ассоциаций и мембранных взаимодействий клеток в процессе эукариогенеза [Imachi et al., 2020]. Недавно были получены обогащенные культуры асгардархей ‘*Ca. Lokiarchaeum ossiferum*’, ‘*Ca. Flexarchaeum multiprotrusionis*’, также привлекающие интерес исследователей своей способностью к синтрофии и уникальным клеточным строением [Imachi et al., 2025; Panagiotou et al., 2026; Rodrigues-Oliveira et al., 2023]. А в честь Линн Маргулис, впервые озвучившей гипотезу эндосимбиотического происхождения эукариот, было предложено назвать асгардархею ‘*Ca. Margulisarchaeum peptidophila*’. Симбиотические взаимодействия между археями раскрываются при выделении в чистые культуры представителей *DPANN*, долгое время считавшихся некультивируемыми [Sakai et al., 2022].

Современная систематика архей – это динамично развивающаяся область, где новые геномные данные постоянно уточняют эволюционные связи. Количество архей, известных лишь по фрагментам 16S рРНК или в виде собранных геномов из метагеномов (MAG или композитные геномы), занимает значительный процент данных, и потому возрастает число глубоких филогенетических линий со статусом *Candidatus*. В настоящий момент более 50% всех предложенных таксонов архей, независимо от ранга, состоят исключительно из MAG и/или одиночных

амплифицированных геномов (SAG), при этом более 80% видов, родов, семейств и порядков архей не имеют культивируемых представителей. В сравнении с бактериальными таксонами, лишь 10% архей имеют подтверждённые культуральными экспериментами сведения о метаболизме, в то время как почти 90% всех остальных архей представлены в виде MAG [Parks et al., 2026]. В базе данных полных геномов Genome Taxonomy Database (GTDB, <https://gtdb.ecogenomic.org/>) представлена полная систематика прокариот по принципу эволюционных дивергенций геномов каждого вида. В 2020 году данный подход применили к археям, и обособили 16 филумов, в некоторой степени изменив общепринятую до этого картину (основанную на фенотипическом описании культур). Так, филум *Euryarchaeota* разделили на *Methanobacteriota*, *Thermoplasmatota*, *Halobacteriota*, *Hydrothermarchaeota* и *Nadarchaeota*, а суперфилумы *Asgard* и *TACK* расклассифицировали на уровень филумов. В группе асгардархей появились новые филумы *Odinarchaeota*, *Heimdallarchaeota* и *Helarchaeota*, расширился суперфилум *DPANN*. В 2022 году методология, используемая для построения дерева архей, была пересмотрена. Предпочтительный набор маркеров, используемый для филогенетического построения, был изменен со 122 маркерных белков архей (ar122) на набор из 53 белков (ar53). В настоящий момент в GTDB отображено 24 филума архей (дата обращения: 21.05.2026).

Что же касается интенсивно пересматриваемой таксономии архей, одной из последних важных новостей стало предложение Международного комитета систематики прокариот (ICSP) разделить этот домен на царства *Methanobacteriati*, *Nanobdellati* и *Thermoproteati*, заменив группы *Euryarchaeota*, *DPANN* и *TACK* соответственно [Göker, Oren, 2024]. Позже архей *Asgardarchaeota* предложили перенести в отдельное царство *Promethearchaeati* [Imachi et al., 2024]. Ранг царства еще не включен в таксономию GTDB, однако, это может произойти в скором времени. Для прокариот, известных лишь по метагеномным данным, в 2022 году был создан новый номенклатурный код на основе данных геномной последовательности – SeqCode, который позволяет присваивать названия еще не

культивированным археям и бактериям. Это способствовало замене многих символьных наименований групп, однако не встретило единогласной поддержки микробиологического сообщества [Hedlund et al., 2022; Parks et al., 2026].

2.3 Термофильные археи

На текущий момент подавляющее большинство культивируемых архей являются экстремофилами, и большая часть из них – термофилы. Термофильными называют организмы, оптимальные температуры роста которых лежат выше 50 °C. Умеренно термофильные организмы живут при температурах от 50 до 70 °C, экстремально термофильные – от 70 до 85 °C, а гипертермофилы растут при температурах от 85 °C и выше [Stetter, 2006].

2.3.1 История изучения термофильных архей

До появления работ команды Карла Везе в 1977 году, термофильные археи и бактерии изучались совместно. В 1922 году, биологи Л. Моррисон и Ф. Таннер в своем большом обзоре сообщают о 68 работах, где упоминаются термофилы (хотя многие из них сейчас относят к термотолерантам). В этой же статье сообщается, что термин «термофильный» был предложен 1879 году французом П. Микелем, выделившим палочку рода *Bacillus*, имевшую предел роста 75 °C. Именно в те годы начинаются первые дискуссии, при какой температуре организм имеет право называться термофильным [Morrison, Tanner, 1922]. Первые, зачастую спорообразующие, термофильные микроорганизмы были обнаружены в метантенках, компостах, угольных отвалах. Исследования термофилов в начале XX века решали прикладные задачи: порчу пищевых продуктов, подвергавшихся тепловой обработке, переработку отходов растениеводства. Исследования середины XX века также строились исходя из практических задач: получения спирта, витаминов, органических кислот, горючих газов. Разрабатывались методы для подавления развития термофилов, вызывающих порчу консервов, коррозию железа и стали, саморазогревание зерна, сена, торфа и угля [Логинова, 1966].

В это же время активизируется интерес к микроорганизмам из термальных местообитаний, связанный с их биогеохимическими функциями. Российский

ученый Сергей Иванович Кузнецов, исследовавший в 50-е годы XX века горячие источники Камчатки, отметил, что на стеклах, которые инкубировались в высокотемпературных (80–100 °C) источниках, обнаруживаются клетки микроорганизмов [Кузнецов, 1955]. К середине 60-х годов XX века количество имеющихся в лабораторных культурах термофильных микроорганизмов исчислялось многими десятками, однако все они были аэробными [Логинова, 1966]. С проблемой культивирования анаэробов справился Роберт Хангейт, чьи методы приготовления сред и получения колоний до сих пор пользуются микробиологи всего мира [Chung, Bryant, 1997]. К концу 60-х годов наивысшей температурой для жизни считалась 73 °C [Brock, 1967], а работам Кузнецова, предсказавшему существование гипертермофилов, к сожалению, не было уделено должного внимания.

Революцию в изучении жизни при более высоких температурах создали труды Томаса Брока и его команды, начавших в 1965 году исследования микробных сообществ термальных источников ЙНП в США. В этих источниках были обнаружены микробы, которые не образовывали споры, и температурные характеристики их роста были намного выше известных – оптимум роста достигался при 70, а максимум – при 80 °C. Самыми знаменитыми выделенными организмами стали *T. aquaticus* (ферменты которого до сих пор используются при проведении ПЦР в лабораториях) и *Sulfolobus acidocaldarius* (первая выделенная термофильная архея, изучение метаболизма которой позволило понять роль микроорганизмов в глобальном цикле серы) [Brock, 1978]. Работы Брока привлекли интерес ученых к высокотемпературным местообитаниям, и вскоре, в 1980 году, группой немецких ученых Вольфрама Циллига и Карла Штеттера из наземных источников Исландии были выделены первые гипертермофилы – археи *Thermoproteus tenax* и *Methanothermus fervidus*. Они поддерживали рост при 97 °C и полном отсутствии кислорода в среде [Stetter, 2006]. С этого момента начался расцвет изучения гипертермофилов, продолжавшийся более двух десятилетий, во многом благодаря энтузиазму К. Штеттера и его научного коллектива. После наземных горячих источников он изучил подводные вулканические, а после

успешного нахождения микробной жизни выше 100 °C его лаборатория открыла более ста видов термофильных бактерий и архей в различных термальных местообитаниях. В 2003 году К. Штеттер удостоился медали Левенгука, что поставило его в одну линию с К. Вёзе [Lieph, Veloso, Holmes, 2006]. С его именем связано появление Центра изучения архей Регенсбургского университета в Германии, где разработаны уникальные методики культивирования термофильных архей.

Обнаружение глубоководных гидротермальных выходов, так называемых «черных курильщиков», не могло остаться незамеченным микробиологами [Corliss et al., 1979]. Здесь обнаружили полноценный биогеоценоз, полностью автономный и практически независимый от кислорода, солнечной энергии и организмов, обитающих на поверхности [Jannasch, Mottl, 1985]. Именно в «черном курильщике» была обнаружена архея *M. kandleri*, способная к росту при 122 °C [Takai et al., 2008]. Так, подводные гидротермы, а также вулканические сольфатары, кальдеры, подземные местообитания и наземные горячие источники к концу XX века перетянули на себя фокус внимания с прежде изучавшихся антропогенных местообитаний.

В настоящее время микробиологами выделено в чистые культуры и охарактеризовано более 1500 видов термофильных прокариот, и этот список продолжает пополняться благодаря усилиям ученых многих стран, в первую очередь Германии, России, США, Франции и Японии [Vilhelmsson et al., 2023]. Значительный вклад в изучение микробных сообществ в термальных местообитаниях, обеспечивший лидерство и признание в мировом научном сообществе, внесли отечественные микробиологи Георгий Александрович Заварзин и Елизавета Александровна Бонч-Осмоловская. За последние несколько десятилетий ими и их учениками были выделены и описаны десятки новых таксонов термофильных и гипертермофильных прокариот из различных мест, представления о разнообразии и экологии этих микроорганизмов значительно расширились.

2.3.2 Природные наземные места обитания термофильных архей

Наземные и глубоководные проявления геотермальной активности, такие как горячие источники, «черные» и «белые курильщики», сольфатары, трещины в дне океана и др., являются основными экотопами термофилов и гипертермофилов на поверхности Земли. Термофильных архей также можно найти в искусственно созданных термальных средах, таких как компостные установки, реакторы и распылительные сушилки, угольные отвалы, стоки с атомных электростанций, геотермальные станции [Rekadwad et al., 2023].

Горячие источники – это геотермальные системы, где подземные жидкости выходят на поверхность при температурах, превышающих 50 °C или как минимум на 10 °C выше среднегодовой температуры воздуха. Доступность для посещения людьми, видимые микробные сообщества в виде матов и обрастаний, и четко определяемые физико-химические градиенты делают их идеальными модельными системами, представляющими условия древней Земли в бескислородную эпоху. На нашей планете известно около 15 000 горячих источников, расположенных вдоль границ тектонических плит, в частности, Тихоокеанского огненного кольца и Альпийско-Гималайского пояса. Несмотря на их обилие, горячие источники остаются все еще недостаточно изученными. Темпы открытия новых представителей и таксонов увеличились с примерно 8 новых термофильных видов в год в период 2000–2010 гг. до примерно 20 видов в год в 2010–2024 гг., и тенденция только нарастает, в том числе, благодаря развитию метагеномики. В 2025 году крупное исследование китайских ученых позволило восстановить почти 3000 геномов архей из 152 наземных геотермальных источников, при этом 19% архей представляли собой совершенно новые таксоны, а 70% не имели даже формальных названий [Qi et al., 2024]. Пример далеко не единственный, и только подтверждает, что эти экосистемы содержат огромное скрытое микробное разнообразие, сулящее улучшить понимание эволюции и метаболизма экстремофилов, а также их биотехнологического потенциала [Wirajana et al., 2026]. В России природными наземными местообитаниями термофильных архей являются, в частности, горячие источники Камчатки, Курильских островов,

Чукотки, Сахалина, Кавказа, Байкальской рифтовой зоны [Kochetkova et al., 2020; Kochetkova et al., 2022; Maltseva et al., 2025; Toshchakov et al., 2021].

На полуострове Камчатка находится около 30 действующих вулканов, и одним из самых крупных проявлений геотермальной активности является кальдера вулкана Узон, изучаемая отечественными и зарубежными микробиологами уже более семидесяти лет как с точки зрения анализа полноценных сообществ, так и выделения новых видов термофильных прокариот. Здесь можно обнаружить горячие источники, грязевые котлы и вулканы, фумаролы, гейзеры. На небольшой площади кальдеры (108 км²) обнаружены все основные типы вод: хлоридно-натриевые с высокими концентрациями бора, мышьяка, сурьмы, ртути и лития; хлоридно-сульфатные, сульфат-хлоридные, сульфатные и бикарбонатные. Имеются большие запасы S–Hg–Sb–As–FeS-содержащих руд, обнаружено молодое нефтяное месторождение. Газовые выходы источников состоят из CO₂ и N₂, H₂, CH₄, H₂S, CO, NH₃ [Kochetkova et al., 2022].

На Курильских островах, несмотря на обилие горячих источников, основное внимание научных исследований уделяется только о. Кунашир (4 действующих вулкана) и о. Итуруп (9 действующих вулканов). Интенсивность изучения микробиоты гидротерм этой территории описывается единичными публикациями – вероятно, из-за ограничений транспортной доступности. Термальные воды Курил чрезвычайно разнообразны по минерализации, pH, температуре и химическому составу: здесь выделено, как минимум, семнадцать геотермальных зон с различными типами состава воды. В основном воды богаты галогенидами, сульфатами и гидрокарбонатами. Преобладающими катионами являются Na⁺ и Ca²⁺. Основные газовые компоненты гидротермальных флюидов могут представлять собой CO₂, N₂, CH₄, серосодержащие и инертные газы [Chudaev et al., 2006; Chudaev, 2003; Kalacheva et al., 2017; Kalacheva et al., 2022; Kalacheva et al., 2023; Kalacheva, Taran, 2019; Markhinin, Stratula, 1977; Zharkov, 2014; Zharkov, 2020].

2.3.3 Особенности микробных сообществ кислых гидротерм

Многие экологические факторы влияют на состав микробных сообществ гидротерм: доступность органических веществ, наличие кислорода, освещенность, уровень кислотности и температура, а также химический состав и происхождение вод. Среди всех вышеперечисленных факторов среды наибольшее влияние на микробные сообщества оказывает значение кислотности среды – pH [Sriaporn et al., 2023]. Наиболее часто в вулканических системах встречаются кислые горячие источники, химический состав которых определяется большим количеством серных соединений и выходов вулканических газов. И именно в таких условиях обнаруживается большое количество архей [Qi et al., 2025; Rowe et al., 2024].

Кислые горячие источники с pH ниже 3 обычно населяют сообщества с низким разнообразием, и преобладают в них термоацидофильные археи. Высокая концентрация ионов H^+ создает стрессовые условия для клеток – изменяется доступность металлов и электрохимические градиенты [Wirajana et al., 2026]. Биологический механизм существования архей в таких условиях функционирует за счет снижения протонной проницаемости мембраны, усиленной монослоем из тетраэфиров, которые менее чувствительны к кислотному гидролизу по сравнению с бислойными мембранами у бактерий и эукариот. Монослойное строение мембраны обеспечивает также и термостабильность. Ацидофилы формируют обратный мембранный потенциал, сохраняя положительный заряд внутри клетки. Это помогает противостоять высокой концентрации ионов H^+ снаружи за счет активной работы мембранных помп, а также закачке ионов K^+ внутрь [Lewis et al., 2021]. Увеличенное число водородных связей, уменьшенная длина поверхностных петель, более высокая гидрофобность ядра, усиленные ван-дер-ваальсовы, ионные взаимодействия и плотность упаковки способствуют термостабильности белков [Coker, 2019; Peters et al., 2026]. За счет фермента обратной гиразы ДНК термофильных архей обладает положительной суперспирализацией, что значительно повышает температуру плавления [Valenti et al., 2011]. Термоустойчивость ДНК у термофильных представителей обусловлена также связанными с ней длинноцепочечными и разветвленными полиаминами [Yamori et

al., 2020]. С приспособлениями к высокой температуре связано и увеличенное количество белков теплового шока, наличие ДНК-связывающих белков и гистонов [Hamana et al., 2003; Madigan, Brock, 2009]. В геномах архей кодируется значительное количество пролилизомераз, коррелирующее со степенью термофильности организма. Эти ферменты участвуют в фолдинге устойчивых белковых молекул [Feller, 2018].

В кислых гидротермах с повышенной температурой сообщества микроорганизмов представлены хемолитоавтотрофами в водной толще и гетеротрофами, обитающими в илистых осадках – это показано, например, для крупных систем Камчатки и Йеллоустона [Maltseva et al., 2023; Rowe et al., 2024]. Как показывают недавние исследования, горячие источники – это самый богатый археями наземный экотоп среди различных мест, где есть осадочные отложения (моря, океаны, промышленные водоемы и т.д.) (Рисунок 2) [Zou et al., 2025].

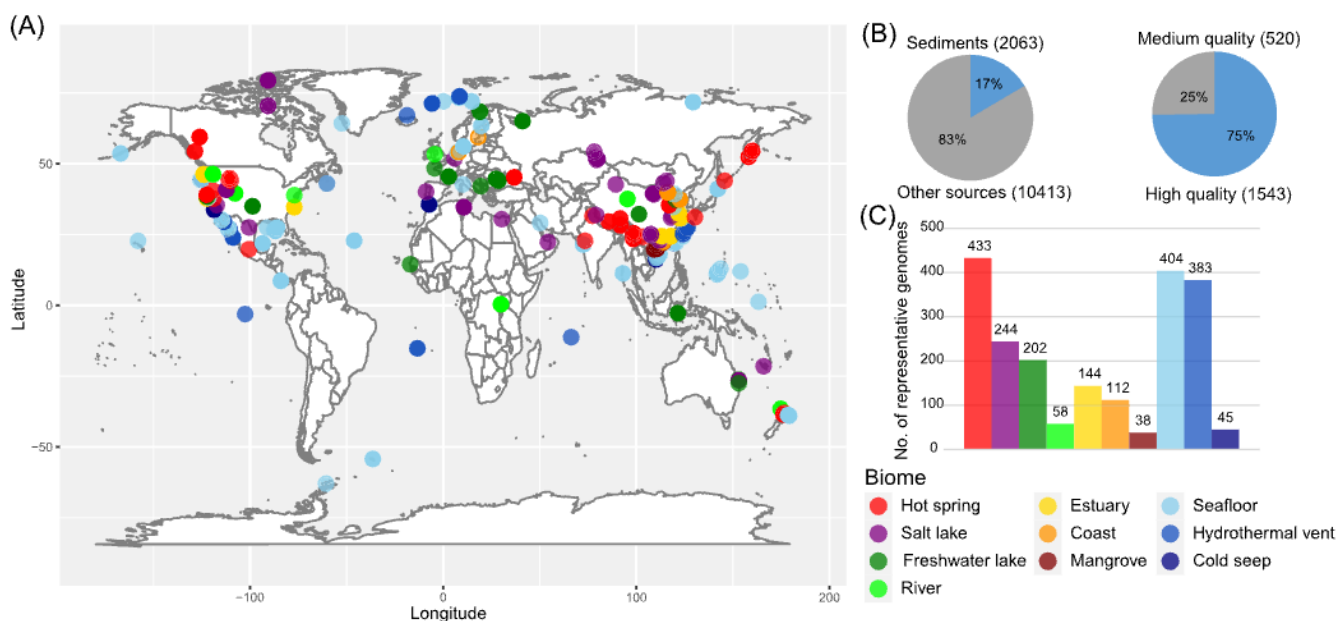


Рисунок 2 – Количество репрезентативных геномов архей, полученных из образцов природных местообитаний с осадочными отложениями. Цитируется по [Zou et al., 2025].

Сообщества осадков выполняют важнейшие экосистемные функции, включая разложение органического вещества, регенерацию питательных веществ и процессы анаэробного дыхания и брожения. Верхние слои осадка (0–2 мм) содержат аэробных гетеротрофов и факультативных анаэробов, в то время как более глубокие зоны (>2 мм) становятся все более восстановленными, и содержат

облигатных анаэробов, отвечающих за восстановление сульфатов, метаногенез и ферментацию. Термофильные археи доминируют в самых глубоких и горячих зонах осадка, где температура может превышать водную толщу на 5–15°C [Wirajana et al., 2026]. Субстратами для гетеротрофных термофильных архей в источниках могут служить различные органические соединения: углеводные компоненты клеток растений, водорослей и других микроорганизмов, липиды клеточных мембран и запасных соединений клеток, углеводороды, образуемые из биомассы прокариот, белки и их производные, низкомолекулярные органические соединения (кислоты, спирты, амиды и др.), образуемые в процессе брожения. Изучение микробного состава сообществ осадков – ключ к формированию полноценного представления круговорота веществ и энергии в экосистемном масштабе.

В хорошо охарактеризованных высокотемпературных источниках Камчатки, где фотосинтез уже ограничен за счет высоких температур, в роли первичных продуцентов органического вещества выступают бактерии филума *Aquificota*. Органическое вещество, автохтонное и аллохтонное, метаболизируется в гидротермах группой гетеротрофных прокариот, в основном, анаэробных. Среди бактерий наиболее часто детектируются *Dictyoglomota*, *Thermotogota*, *Bacillota*, *Caldisericota*, *Bacteroidota* и *Deinococcota*. Среди культивируемых архей с гетеротрофным метаболизмом в кислых горячих источниках обнаруживаются представители филумов *Thermoproteota* (в основном родов *Fervidicoccus*, *Caldisphaera*, *Sulfolobus*, *Saccharolobus*, *Acidilobus*, а также порядка *Conexivisphaerales*) и *Thermoplasmatota* (*Thermoplasma*) [Kochetkova et al., 2022; Maltseva et al., 2023].

Исследования же микробного разнообразия горячих источников Курил были сфокусированы в основном на описании чистых культур – было выделено около двух десятков видов архей и бактерий. Исследования полных микробных сообществ представлены очень небольшим количеством работ. В 2013 году были изучены сообщества метанотрофов нейтральных горячих источников на острове Кунашир [Kizilova et al., 2014]. В 2020 году было опубликовано исследование двух

кислых теплых источников в зоне ручья Кислый (pH 3,0/18 °C и pH 2,0/38 °C), где в более теплом источнике обнаруживалось около 38% архей, а после – еще двух в той же зоне вулкана Менделеева – источника Фауст (pH 2,0/48 °C) и Третьяковского источника (pH 6,0/52 °C) с преобладанием различных групп бактерий. На нейтральных Столбовских источниках с температурой 17–81 °C и pH 6,0–7,5 наиболее многочисленными были бактерии *Aquificota*, *Chloroflexota*, археи *Thermoproteota*. Общая тенденция этих исследований прослеживается в большей представленности архей в кислых источниках, а также с ростом их численности с повышением температуры. Несмотря на эти результаты, закономерности и экологические факторы развития и распространения микробных сообществ Курил остаются в значительной степени неизвестными [Malygina et al., 2023; Rozanov et al., 2020; Rozanov et al., 2021].

2.3.4 Некультивируемые группы термофильных архей

Открытие новых термофильных и гипертермофильных линий архей существенно продвигает понимание экологии этих микроорганизмов. Недавние исследования выявили новые группы архей горячих источников: *Conexivisphaera calida*, *Nanobdella aerobiophila*, *Microcaldus variisymbioticus*, ‘*Ca. Caldiarchaeum subterraneum*’, ‘*Ca. Geoarchaeota*’, ‘*Ca. Marsarchaeota*’ и ‘*Ca. Brockarchaeota*’ как потенциальных участников биогеохимических циклов углерода и азота. Группы некультивируемых архей глубоких филогенетических линий могут занимать значительные доли микробных сообществ, но не иметь даже предсказаний их экологической роли: это подтверждается исследованиями по всему миру, в том числе и в России [Beam et al., 2014; Kozubal et al., 2013; Maltseva et al., 2023; Sriaporn et al., 2023; Yoshitake et al., 2026]. Получить метагеномные данные, или, что еще лучше, чистую культуру таких архей – задача многих современных микробиологов.

Среди доминирующих групп архей в осадках кислых горячих источников обнаруживаются пока некультивируемые линии филумов *Thermoplasmatota* и *Thermoproteota*. Так, например, археи группы A10/ARK15 (*Thermoplasmatota*) были обнаружены молекулярно-биологическими методами более 30 лет назад в наземных горячих источниках Йеллоустона [Barns et al., 1994]. Метаболизм данной

группы был фрагментарно предсказан: сообщалось, что они могут участвовать в циклах преобразования соединений серы, расщеплении полисахаридов или даже выступать в роли первичных продуцентов в микробных сообществах [Merkel et al., 2017; Qi et al., 2024; Qi et al., 2025; Sriaporn et al., 2023]. В 2018 году вышла статья о часто встречающихся в гидротермах Йеллоустона археях предположительно нового филума ‘*Ca. Marsarchaeota*’ (родственному к филуму *Thermoproteota*). На основании метагеномных данных, обходя культивирование, исследователи предположили, что эта группа представлена факультативными аэробами с хемоорганогетеротрофным типом метаболизма, способными использовать Fe^{3+} в качестве терминального акцептора электронов при низком уровне O_2 [Jay et al., 2018].

Некоторые глубокие филогенетические линии архей, широко представленные во многих кислых гидротермах по всему миру, уже удалось выделить ранее, например, группа THSCG (сейчас порядок *Conexivisphaerales*) или порядок *Fervidicoccales*. Представители этих линий являются анаэробными умеренными термофилами, растущими на белковых субстратах (*F. fontis* Kam940^T также растет на моно-, дисахарах и пирувате), используя серу как конечный акцептор электронов (*Conexivisphaera calida* также использует и Fe^{3+}). Однако до сих пор эти группы представлены единственным видом (или даже штаммом), что ограничивает понимание метаболического потенциала и экологической роли этих групп архей [Kato et al., 2021; Perevalova et al., 2008; Perevalova et al., 2010].

Перечисленные выше группы архей глубоких филогенетических линий (A10, ‘*Ca. Marsarchaeota*’, *Fervidicoccales*) являются объектами исследования в данной диссертации.

2.4 Современные подходы для культивирования глубоких филогенетических линий архей

В эпоху геномики понимание разнообразия, распространения и метаболического потенциала архей значительно продвинулось. Однако, если одни новые группы удастся выявить с помощью анализа генов рРНК, то другие остаются

незамеченными из-за методических ограничений: отсутствия универсальных праймеров, узкого набора известных функциональных генов и прочих технических барьеров. Наличие генов не всегда указывает на их активность и экологические функции, что затрудняет оценку роли архей в естественной среде обитания. Такие методы, как изотопное мечение, метаболомика и метапротеомика помогают в прогнозировании, в то время как метатранскриптомика, FISH и ортогональное мечение аминокислот, а также флуоресцентная сортировка клеток, позволяют выявить функциональную активность клеток. Интеграция геномной реконструкции на уровне сообщества с анализом активности может прояснить микробное разнообразие и метаболические паттерны в сообществах. И наоборот, многие гипотезы, касающиеся физиологии и эволюции архей, требуют подтверждения с помощью экспериментов на основе культивирования, которые исторически представляли собой сложную задачу [Pandey, Dhakar, 2026; Simon et al., 2025].

При попытке культивирования важно учитывать физико-химические параметры исходных источников, соблюдать надлежащие условия отбора и хранения природных проб. В лабораторной практике стандартные микробиологические методики для выделения чистых культур теряют свою актуальность: так, твердые среды нестабильны при высоких температурах и не подходят для многих видов, подбор селективных условий культивирования становится более сложным. Археи могут нуждаться в симбиотических партнерах и их метаболитах, или, наоборот, не выдержать конкуренцию со стороны быстрорастущих соседствующих видов и продуктов их жизнедеятельности, подвергаться заражению вирусами, и самое главное, могут требовать длительного времени инкубации из-за невысоких скоростей роста. Современные микробиологи прибегают к целому спектру новых, а также модифицированных методик для решения этих вопросов, зачастую сочетая несколько из них [Pandey, Dhakar, 2026; Simon et al., 2025; Zou et al., 2025].

В случае проблемы межмикробного взаимодействия существует два противоположных подхода: выделения единичных клеток и культивирование

смешанных культур. Для первого применяются методы микроманипуляций, позволяющие изолировать отдельную клетку из смешанной культуры при воздействии лазерного излучения («оптический пинцет»), или через микрокапли жидкости (микрофлюидика, микроинкапсуляция), также отделить клетки возможно через фильтрацию или разведения [Rafiq et al., 2023]. Второй подход – совместное культивирование, позволяющее осуществить межвидовую передачу электронов, важных метаболитов и т.д. Так, например, были выращены первые представители паразитирующих архей DPANN: ‘*Ca. Nanoarchaeum equitans*’, ‘*Ca. Nanopusillus acidilobi*’ и ‘*Ca. Nanoclepta minutus*’ и др. [Kato et al., 2022; Sakai et al., 2022]. Преодолеть проблему медленной скорости роста некультивируемых архей может только время исследователя и тщательный подбор условий культивирования. Так были получены высокообогащенные культуры ‘*Ca. Caldarchaeota*’, ‘*Ca. Bathyarchaeota*’ и первые асгардархеи. Чтобы получить ‘*Ca. Promethearchaeum syntrophicum*’, исследователям потребовалось 12 лет непрерывного эксперимента [Buessecker et al., 2022; Imachi et al., 2024; Khomyakova et al., 2023]. Еще одним подходом к культивированию является создание для клеток условий, максимально близких к естественным – например, культивирования с добавлением стерильной воды из источника, использование технологии диффузионной камеры или iChip, где исходная проба не разбавляется и культивирование происходит *in situ*. Безусловно, неизмеримо полезным при разработке методик выделения и поддержания чистых культур является наличие качественной биоинформатической поддержки через профилирование сообщества по гену 16S рРНК, анализ MAG и изолированных геномов [Rafiq et al., 2023; Sun et al., 2020]. Ниже представлены основные группы архей и их культивируемые представители (Рисунок 3).

Таким образом, вопрос культивирования «некультивируемых» архей предполагает пересмотр стандартных микробиологических методик, открывая для исследователей бесконечный простор для научного поиска, выбора сочетаний и стратегий.

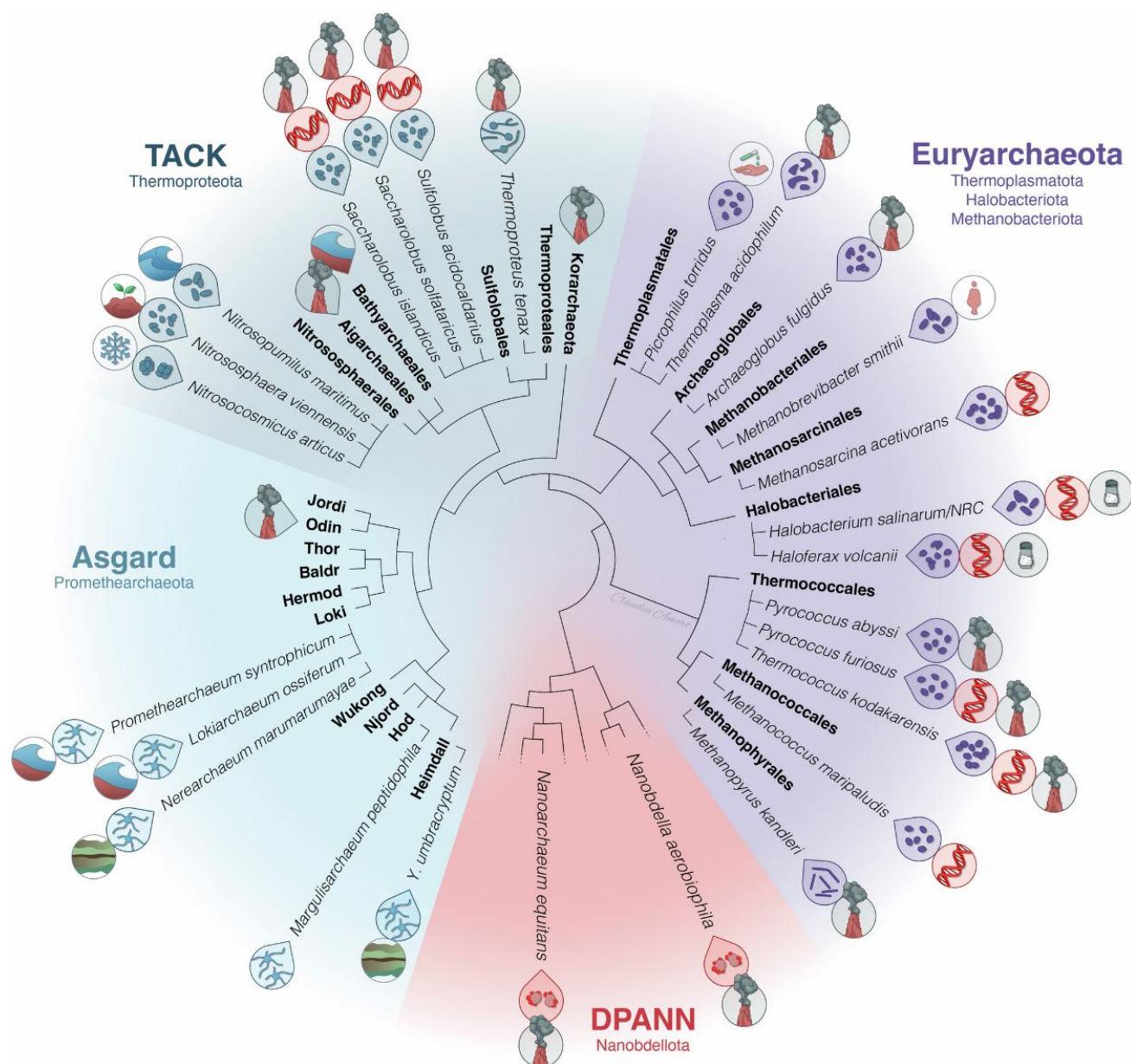


Рисунок 3 – Основные группы архей и часть их культивируемых представителей. Символы – местообитания (горячие источники, осадки, соляные промыслы, океан, почва, человек), символ ДНК указывает на модельные организмы, внутренние символы – формы клеток. Цитируется по [Schleper, Rodrigues-Oliveira, 2026].

2.5 Практическая значимость термофильных архей

Ферменты термофильных архей (термозимы) широко востребованы в различных областях биотехнологии. Применение термостабильных биомолекул вместо мезофильных аналогов дает значительные преимущества: повышение температуры ускоряет биохимические реакции, снижает энергозатраты на охлаждение систем, предотвращает пассивацию минеральных поверхностей и минимизирует риск контаминации вредоносными микроорганизмами.

Термостабильные ферменты имеют ряд физико-химических особенностей строения, такие как замена конформационно-напряженных остатков глицинами, добавление солевых мостиков, усиление гидрофобных взаимодействий, дополнительные ионные и водородные связи, улучшенная упаковка ядра молекулы. Это придает белкам не только более высокую термостабильность, но и устойчивость к химической денатурации. Примерами широко используемых термозимов являются ДНК-полимеразы, лигазы, амидазы, нитрилазы, гликозилгидролазы, эстеразы [Straub et al., 2018]. Стоит отметить, что актуальность таких исследований очень высока – количество научных публикаций о поиске новых ферментов термофильных архей возрастает в разных странах [Burkhardt et al., 2024].

Среди ДНК-полимераз и лигаз для проведения ПЦР и других реакций, модифицирующих нуклеиновые кислоты, применяются ферменты гипертермофильных архей родов *Pyrococcus* (Pfu, Pwo, Pfx) и *Thermococcus* (KOD1, Tli), а также различные смеси ДНК-полимераз (Herculase, Expand), состоящие из смеси Taq полимеразы (*T. aquaticus*) и Pfu/Pwo, отличающиеся высокой точностью реакций, по сравнению с бактериальными аналогами. Эти ферменты – основа лабораторных практик всего мира [Cabrera, Blamey, 2018; Terpe, 2013].

В фармацевтике используются архейные амидазы и нитрилазы, которые применяются в синтезе нестероидных противовоспалительных средств (ибупрофен, кетопрофен), антидепрессантов (ниаламид, габапентин), анальгетиков и др., а также при производстве глицина и витамина В3. Продуцентами таких ферментов являются гипертермофильные археи *Pyrococcus yayanosii*, *Sulfolobus tokodaii* и *Pyrococcus abyssi* [Cabrera, Blamey, 2018].

В пищевой промышленности для процессов осахаривания крахмала и получения мальтозного сиропа используются смеси ферментов, включающие архейные гликозилгидролазы. На рынке доступны ферментные смеси, содержащие глюкоамилазу из термоацидофильной археи *Saccharolobus solfataricus* (OPTIMAX) [Turner, Mamo, Karlsson, 2007]. Для переработки растительного сырья предлагаются термостабильные ферменты из термофильных архей. Ключевые

игроки российского рынка кормовых добавок для сельскохозяйственных животных (Агрофермент, NOVABIOTIC, Лафид, BiochemRU, Сиббиофарм, Биотроф и Feedland) в настоящий момент не имеют коммерческих архейных гликозидаз – они внедряют в производство целлюлазы, ксиланазы, фитазы, глюканазы и амилазы бактериального и грибного происхождения, необходимые для повышения усвояемости кормов. В России исследования гликозилгидролаз из термофильных архей ведутся на базе ФИЦ Биотехнологии РАН и Курчатовского института [Kil et al., 2024; Zayulina et al., 2025]. Кроме того, недавнее исследование амилаз и эндоглюканаз из термофильных архей для удаления биопленок с поверхностей из нержавеющей стали было успешным, что говорит о практической значимости этих ферментов в санитарной обработке оборудования пищевой промышленности [Pandey, Dhakar, 2026].

Одними из лидеров среди используемых в биотехнологиях ферментов являются эстеразы. Они используются в производстве оптически чистых соединений, моющих средств, производстве косметики и бумаги, обработке пищевых продуктов, производстве ванилина, синтезе биодизеля и биополимеров, а также в биокаталитическом разделении фармацевтических производных, сложных эфиров и аминокислот, производстве кожи, очистке сточных вод. Эстеразы гидролизуют синтетические полимеры (полиэтилентерефталат (ПЭТ), полиэтилен, полипропилен, нейлон). Первоочередными объектами в поиске микробных эстераз до недавнего времени были бактерии, однако сейчас растет интерес к археям, в особенности, термофильным [Chandra et al., 2020; Hess, Katzer, Antranikian, 2008; Wirajana et al., 2026].

Проблема доступности биотехнологически ценных ферментов термофильных архей в настоящее время решается через функциональный анализ MAG и получение целевых белков рекомбинантно через бактерий *E. coli* или архей *Haloferax volcanii*. Одновременно разрабатываются генетические инструменты и для самих термофильных архей (среди легко культивируемых представителей порядков *Thermococcales* и *Sulfolobales*). Однако такие методы зачастую не решают проблемы с трансляцией и фолдингом белка из-за физиологической разницы

между донором и продуцентом и неточности биоинформатических предсказаний [Counts et al., 2017]. Омикс-технологии (метагеномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика) позволяют получить детальное представление о метаболических процессах у термофилов. Так можно прогнозировать оптимальные условия, состав питательных сред и определять мишени для нокаута генов, способствуя оптимизации процессов [Pandey, Dhakar, 2026].

Термофилы являются незаменимыми моделями и для астробиологии, предоставляя информацию о пределах жизни на Земле и вне ее. Уникальные адаптации делают их подходящими кандидатами для экспериментов по переносимости клетками экстремальных условий. Так, например, одним из недавних исследований стало изучение возможности термоацидофильной археи *Acidianus manzaensis* переживать физико-химические условия, близкие к марсианским [Gfellner et al., 2025].

Подводя итог, хочется отметить, что биотехнологический и фундаментально-исследовательский потенциал термофильных архей напрямую зависит от сохранения их естественной среды обитания – горячих источников, которые активно используются в бальнеологии, туризме и гидроэнергетике, что требует строгого регулирования для защиты этих уникальных экосистем и, конечно, их обитателей [Pandey, Dhakar, 2026].

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Объекты исследования

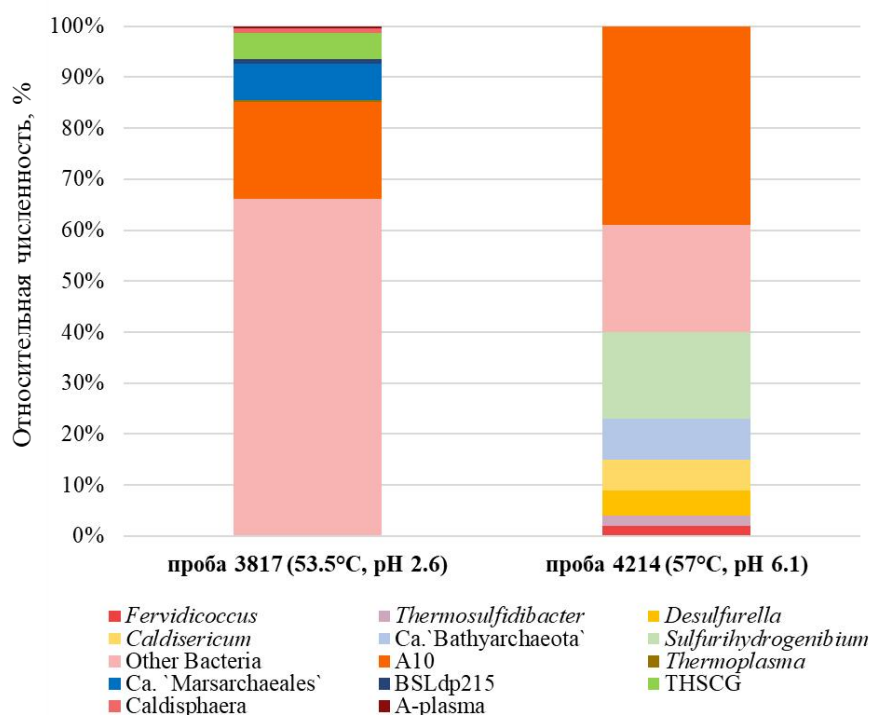
Объектами исследования были: 1) образцы осадков и воды из горячих источников Курил и Камчатки, отобранные для исследования микробного состава сообществ, корреляционных связей с физико-химическими параметрами, получения накопительных и чистых культур архей; 2) культуры архей *F. fontis* (штаммы 3639Fd, Kam940^T и 1507, FoA-16) и *T. miroshnichenkoae* MP-3918, переданные автору коллегами из лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот ФИЦ Биотехнологии РАН. Другие упомянутые в работе образцы и культуры были получены при непосредственном участии автора в ходе экспедиционных и лабораторных исследований.

3.1.1 Пробы из горячих источников Курильских островов и Камчатки

Образцы воды и осадков горячих источников отбирали в кальдере вулкана Узон и Долине гейзеров (Камчатка, 2025 год), а также зонах активности вулканов Баранского (о. Итуруп), Головнина и Менделеева (о. Кунашир) в 2023 году. Для культивирования осадки/микробные обрастания/кусочки грунта вместе с термальной водой отбирали в стеклянные стерильные флаконы с резиновыми пробками и завинчивающимися крышками, не оставляя излишков воздуха в пробе («выгоняя» его избыточным давлением через стерильную иглу). Для выделения ДНК около 500 мг образца собирали в пробирки Eppendorf объемом 2 мл с 1 мл стерильного фиксирующего буфера (100 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl). Для химического анализа отбирали по 150 мл термальной воды в стерильные пластиковые пробирки Falcon, при необходимости пропуская ее через фильтр Millipore с диаметром пор 0,45 мкм. Для анализа микроэлементов пробу фиксировали в особо чистой 3% HNO₃ в соотношении 14:1. В источниках с pH > 4 на месте проводили анализ на содержание CO₃²⁻ и HCO₃⁻ титрованием 0,1 Н HCl с фенолфталеином и метиловым оранжевым в качестве индикаторов. Для определения содержания соединений железа осадок собирали в пластиковые пробирки Falcon объемом 50 мл, после отстаивания воду сливали, а оставшееся

пространство заполняли 96% C_2H_5OH для предотвращения окисления. Для фиксации и дальнейшего определения содержания H_2S в пробах 30 мкл термальной воды переносили в 500 мкл раствора CH_3COOZn . Значения pH и температуры измерялись непосредственно в месте отбора с помощью pH-метра SG2 SevenGo™ (Mettler-Toledo, Швейцария) с датчиком InLab® Expert Go (Mettler-Toledo, Швейцария). Все образцы хранились при 4 °C во время экспедиции и транспортировались в лабораторию в термопакетах с хладагентами.

Проба воды и ила №3817 с Оранжевого поля кальдеры Узон (Камчатка) (53,5 °C, pH 2,6, координаты N54.304120, E160.00430), а также проба №4214 из горячего источника Заварзин кальдеры Узон (57 °C, pH 6,1, N54.498132, E160.0146) были отобраны сотрудниками лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот ФИЦ Биотехнологии РАН в 2019 и 2021 годах соответственно. Профилирование микробного сообщества по участку V4 гена 16S рРНК выявило присутствие архей до 39% от всего сообщества: в основном, представителей некультивируемых глубоких линий (Рисунок 4), поэтому эти образцы были выбраны для дальнейшего выделения чистых культур.



Источник на Оранжевом поле (проба 3817)



Источник Заварзин (проба 4214)

Рисунок 4 – Состав микробных сообществ проб № 3817 и № 4214 на основании профилирования участка V4 гена 16S рРНК.

3.1.2 Штаммы термофильных архей

Fervidicoccus fontis штаммы 3639Fd, Kam940^T, 1507, 4215c, FoA-16

F. fontis штаммы Kam940^T и 1507 являются единственными описанными представителями порядка *Fervidicoccales* (класс *Thermoprotei*, филум *Thermoproteota*) [Perevalova et al., 2010]. Штамм 3639Fd был получен А.А. Переваловой в 2018 г. путём *in situ* накопительного культивирования на трибутирине (ТБ) в горячем источнике Вертолетный кальдеры Узон (N 54°30.005, E 160°00.732; 59 °C, pH 6,5) и последующего выделения методом предельных разведений на ТБ. Фенотипическое описание чистой культуры 3639Fd, её геномный анализ и качественная проверка нативной эстеразной/липазной активности, а также рост на липидах всех доступных в коллекции лаборатории штаммов *Fervidicoccus* (Kam940^T, 1507, 4215c (выделена автором), FoA-16) проводился в рамках данного диссертационного исследования.

Tardisphaera miroshnichenkoe MP-3918^T

Термофильная анаэробная архея *T. miroshnichenkoe* MP-3918^T была получена Прокофьевой М.И. из пробы термального грунта кальдеры вулкана Головнина о. Кунашир (Курильские острова). Биомасса данной археи была использована для дополнительного исследования биотехнологического потенциала архей рода *Tardisphaera*, к которому также относился выделенный автором новый вид *T. saccharovorans* штамм АК-3817^T (получение этой культуры описано как результат данной работы).

3.2 Молекулярно-биологические методы

3.2.1 Выделение ДНК

Из природных проб и накопительных культур ДНК выделяли с помощью набора FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, США) в соответствии с протоколами производителя. Геномная ДНК штаммов АК-3817 и АК-4214 была выделена с использованием DNeasy PowerLyzer Microbial Kit (Qiagen, Нидерланды). Геномную ДНК штамма АК-4214 для нанопорового секвенирования выделяли с помощью набора QIAGEN PowerSoil Pro Kit (Qiagen). Механическое

разрушение клеток при необходимости проводили в гомогенизаторе FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, США). Концентрацию ДНК измеряли с помощью прибора Qubit 2.0 с использованием набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

3.2.2 Секвенирование библиотек ампликонов

Библиотеки ампликонов участка V4 16S рРНК готовили в двух повторностях для каждой пробы по методике [Gohl et al., 2016] с использованием универсальных праймеров 515F и 806R, включая технические последовательности Illumina [Fadrosh et al., 2014; Hugerth et al., 2014; Merkel et al., 2019]. Высокопроизводительное секвенирование (NGS) проводили с реагентами MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 циклов) MS-103-1002 на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Библиотеки для секвенирования Illumina (США) были подготовлены с помощью набора DNA Prep kit (Illumina, США). Были использованы реагенты для получения парных прочтений 2×100 п.о. и 2×151 п.о на платформах Novaseq 6000 и NovaSeq X Plus соответственно.

Данные секвенирования ампликонов гена 16S рРНК, полученных при профилировании микробных сообществ горячих источников Курильских островов, были депонированы в базе NCBI (PRJNA1125859). Последовательности полных геномов *F. fontis* 3639Fd и *T. saccharovorans* AK-3817 были задепонированы в GenBank под номерами GCA_015209645.1 и GCA_046635845.1 соответственно.

Секвенирование проводилось на коммерческой основе в фирмах ООО «АльгаВитаПро» (Illumina) или коллегами из НИЦ «Курчатовский институт» (Nanopore).

3.3 Работа с природными пробами

3.3.1 Методы анализа микробных сообществ

Прочтения последовательностей были предварительно обработаны, как описано в публикациях [Fadrosh et al., 2014; Gavrillov et al., 2019], и демультимплексированы с использованием QIIME v.1.9.1. Они были отфильтрованы по качеству, очищены от последовательностей праймеров 16S рРНК с

использованием CLC Genomics Workbench 10.0 (Qiagen, Германия). Присвоение операционных таксономических единиц (OTU) и таксономии производили по базе данных SILVA r138.1 (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs>), и где необходимо, дополнительно предоставляли номенклатуру по GTDB. Митохондриальные и хлоропластные последовательности были удалены из данных без пересчета относительной численности.

Визуализация данных была выполнена в Excel и R с использованием пакета ggplot2 [Wickham, 2016]. Для определения влияния физико-химических факторов на состав сообществ использовали тест Мантела в пакете vegan v.2.6.4 [Oksanen et al., 2001]. Анализ α -разнообразия на основе индексов Chao1, Шеннона и обратного индекса Симпсона был подтвержден с помощью phyloseq v.1.30.0 [McMurdie, Holmes, 2013]. Для оценки β -разнообразия было проведено неметрическое многомерное шкалирование (NMDS) с матрицей Брея-Кертиса в vegan v.2.6.4, по результатам которого были получены основные группы сообществ. Статистический анализ различий этих групп по температуре, pH и составу архей и бактерий проводили в пакете Broom [Robinson et al., 2014]. Он включал в себя тест Шапиро-Уилка на нормальность распределения, Краскела-Уоллиса или ANOVA для выявления статистических различий между группами, а также парные сравнения, выполненные с помощью тестов Тьюки или Данн. Попарные коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между относительным обилием основных таксонов на уровне порядков (доля которых составляла более 0,05% как минимум в одном источнике) и экологическими параметрами среды рассчитывали с помощью пакета microbiome версии 1.8.0 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/microbiome.html>), применяя поправку Бенджамини-Хохберга.

3.3.2 Химический анализ вод и осадков

Для определения ионов HCO_3^- использовалось потенциометрическое титрование (ANION 7051, Россия), а также титрование на месте отбора проб как описано ранее. Для определения ионов SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} и Cl^- использовалась система ионной хроматографии ICS-2000 (Spectronica, США) с

кондуктометрическим детектированием. Для Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и NH_4^+ использовался капиллярный электрофорез (Capel-105 М, Россия). Общую минерализацию рассчитывали, как сумму основных катионов и анионов. Жесткость воды определяли по сумме концентраций Ca^{2+} и Mg^{2+} . Определение элементного состава проводили с помощью масс-спектрометра Perkin Elmer NexION 300D (США), а также SUPEC 7000 (Focused Photonics Inc, Китай) [Комарова Н.В., Каменцев Я.С., 2006; Савенко В.С., 1986]. Определение растворенного H_2S проводили, как указано далее.

Для минералогических исследований образцы осадков анализировали методом порошковой рентгеновской дифракции с использованием дифрактометра ULTIMA-IV Rigaku (Япония) в следующем режиме работы: 40 кВ-40 мА, медное излучение, никелевый фильтр, полупроводниковый детектор нового поколения DTex/Ultra.

3.3.3 кПЦР

Для количественного определения общего числа прокариот с помощью кПЦР использовали пару универсальных праймеров: 515F и Pro-mod-805R 3' [Hugerth et al., 2014; Merkel et al., 2019]. Для определения численности представителей порядка *Tardisphaerales* (бывш. 'Ca. Marsarchaeota', по базам данных часто определяющихся также как 'Ca. Marsarchaeales') в природных образцах была разработана специфическая система праймеров в программе Primrose [Ashelford, 2002] с использованием последовательностей гена 16S рРНК 29 представителей порядка, а также 127 нецелевых последовательностей других архей в качестве отрицательных контролей *in silico*. Специфичность праймеров была проверена в TestPrime 1.0 [Klindworth et al., 2013]. Последовательности праймеров представлены ниже (5'>3'):

Tard-1138F GGCAACGGCAGGTCAGCA

Tard-1290R TTCCAGGTTACGAGGGC

Для построения калибровочных кривых использовали геномную ДНК *T. miroshnichenkoae* MP-3918. Все ПЦР-анализы, включая стандартную кривую, экспериментальные образцы и отрицательные контроли, проводили в трех

повторностях, и рассчитывали среднее количество копий гена 16S рРНК. В качестве матриц для отрицательных контролей использовали геномную ДНК двух чистых культур *F. fontis* 3639Fd и *Thermoplasma* 3817с. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора qPCRMix-HS SYBR (Evrogen, Россия). Относительную численность *Tardisphaerales* на основе данных ПЦР рассчитывали, как отношение количества копий гена 16S рРНК *Tardisphaerales* на мл каждого образца к общему количеству копий гена 16S рРНК прокариот на мл того же образца.

Для оценки распространенности A10/ARK15 в горячих источниках были разработаны специфические праймеры A10-F/A10-R (5'>3'):

A10-F	GGATGCGTGCGGTTTAATTGG
A10-R	GCCCTACGGTRCGAGCTG

Для построения калибровочных кривых использовали геномную ДНК штамма АК-4214. кПЦР выполняли аналогично, как описано выше. Универсальные праймеры Pro-mod-341F/805R использовали для общего подсчета прокариот [Takahashi et al., 2014]. Визуализация данных была выполнена в R с использованием пакета ggplot2.

3.3.4 FISH

Для детекции целевых групп архей методом FISH использовали уникальные и универсальные зонды следующих нуклеотидных последовательностей, меченные флуоресцентным красителем Cy3 (цианин 3) на 5'-конце:

A10-617	[Cy3]GTAATCCCGAAGGGACCACCTGTGG
A10-848	[Cy3]GGAGCACCGCAACGGGAGGATG
ARCH915	[Cy3]GTGCTCCCCCGCCAATTCCT

Зонды A10-617, A10-848 были разработаны с использованием программного обеспечения Primrose и проверены в онлайн-сервисах TestPrime 1.0/TestProbe 3.0. Универсальный зонд Arch915 является широко используемым в общемировой практике для детекции клеток архей [Medina-Sánchez, Felip, Casamayor, 2005].

Для фиксации природный образец или отцентрифугированные клетки чистой культуры (штамм АК-4214) ресуспендировали в 0,5 мл фосфатного буфера (PBS)

(г/л): NaCl – 8,0, KCl – 0,2, Na₂HPO₄ – 1,44, NaH₂PO₄ – 0,2, H₂O – 1 л, pH 7,0. К полученной суспензии добавляли 1,5 мл раствора 4% формальдегида в PBS и инкубировали в течение 1,5 часов. Образец осаждали центрифугированием (8000 об/мин в течение 5 минут) и дважды промывали PBS. Фиксированные образцы ресуспендировали в смеси C₂H₅OH и PBS (1:1) и до анализа хранили при -20 °C. 1–2 мкл суспензии фиксированных образцов наносили на обработанные в 0,1% растворе желатина предметные стекла. Препараты выдерживали 24 часа при комнатной температуре. Затем стекла проводили через растворы C₂H₅OH (50%, 80%, 100%), оставляя по 3 мин в каждом. Гибридизацию препаратов с зондом проводили по методике [Stahl D.A., Armann R., 1991] при 46 °C. После препараты в течении 10 минут докрашивали 1 мкМ раствором универсального красителя для ДНК 4',6'-диамидино-2-фенилиндола (ДАФИ), промывали dH₂O и высушивали. Препараты смотрели в эпифлуоресцентный микроскоп Zeiss Axioplan 2 (Германия) со светофильтрами Zeiss 20 для Cy3-меченных зондов и Zeiss 02 для окраски ДАФИ.

3.4 Работа с культурами архей

3.4.1 Приготовление питательных сред и их компонентов

Для получения накопительных и чистых культур термофильных архей глубоких филогенетических линий и работы с ними использовали технику анаэробного культивирования на модифицированной минеральной среде Пфеннига. Этот подход был выбран в связи с тем, что целевые группы архей обнаруживались (по литературным и нашим данным) в осадочной восстановленной зоне кислых горячих источников, и потому с большей вероятностью являлись анаэробами.

Для приготовления 1 л анаэробной среды брали навески минеральных солей (г/л): MgCl₂*6H₂O, KCl, NH₄Cl, KH₂PO₄ – по 0,33, CaCl₂ – 0,1 и растворяли в dH₂O. После раствор кипятили в течение 5–7 минут после закипания. Среду охлаждали в потоке 100% N₂ или CO₂. Затем добавляли по 1 мл р-ров витаминов [Wolin, Wolin, Wolfe, 1963] и микроэлементов [Кевбрин В. В., Заварзин Г. А., 1992], состав

которых приведен ниже. В некоторых случаях добавляли дрожжевой экстракт (ДЭ) (0,05–0,1 г) в качестве ростового фактора.

<u>Раствор витаминов</u>	мг/л:	<u>Раствор</u> <u>микроэлементов</u>	мг/л:
B ₇	20	(NH ₄) ₂ SO ₄ FeSO ₄ *6H ₂ O	784
B ₉	20	CoCl ₂ *6H ₂ O	238
B ₆	100	(NH ₄) ₂ SO ₄ NiSO ₄ *6H ₂ O	395
B ₂	50	Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	24
B ₁	50	Na ₂ WO ₄ *2H ₂ O	33
B ₃	50	ZnSO ₄ *7H ₂ O	144
B ₅	50	CuCl ₂ *2H ₂ O	2
B ₁₂	1	Na ₂ SeO ₄	94
B ₁₀	50	HBO ₃	6
Липоевая кислота	50	MnCl ₂ *4H ₂ O	99

Анаэробный дозатор (BioHit prospenser, Финляндия) перед добавлением среды также заполняли газом (N₂ или CO₂) в течение 5–10 минут. Для поддержания pH добавляли Na₂HCO₃/MES/HEPES в концентрации 10 мМ. В качестве восстановителя среды добавляли 0,3–0,5 г/л Na₂S*9H₂O, после чего среду быстро переливали в дозатор под током газа. Необходимые значения pH среды получали титрованием р-ром 6 Н НСl или 10% NaOH, под контролем pH-электрода (Hanna instruments pH211, Германия). Готовую среду разливали под током газа по пробиркам Хангейта (по 10 мл, общий объем пробирки – 18 мл), при необходимости добавляя в них нерастворимые компоненты (S⁰) или субстраты для роста в конечной концентрации 1 г/л. Стерилизовали в автоклаве (121 °С, 0,5–1 АТИ, 40–60 минут).

При необходимости после автоклавирования в среду добавляли растворимые стерильные субстраты: растворы органических кислот, сахаров и т.д., в конечной концентрации 1–2 г/л. Для подавления роста бактерий вносили стерильные

растворы антибиотиков: ванкомицина, новобиоцина, неомицина, канамицина, ампициллина или стрептомицина (в концентрации 1–10 мг/л).

Для проверки способности к использованию акцепторов электронов в среду, приготовленную без Na_2S , добавляли растворы натриевых солей NO_3^- (10 мМ), NO_2^- (2 мМ), или цитрат Fe^{3+} (10 мМ) и ферригидрит (50 мМ Fe^{3+}). В среду же, приготовленную обычным образом (с Na_2S), добавляли S^0 (1 г/л), а также растворы натриевых солей SO_3^{2-} , SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ или полисульфид (по 10 мМ). В случае проверок аэробного роста питательную среду готовили без восстановителя и без постоянного тока газа; для создания микроаэробных условий во флаконы с анаэробной невосстановленной средой закалывали 2% O_2 . При проверке карбоксидотрофии среда готовилась без органического субстрата с добавлением CO в газовую фазу в концентрации 2–20%. Автотрофный рост проверяли в двух вариациях среды: газовая фаза $\text{H}_2:\text{CO}_2$ (в отношениях 1:9, 1:1 или 4:1) с S^0 , SO_4^{2-} , ферригидритом, NO_2^- или NO_3^- в качестве акцепторов электронов; или газовая фаза $\text{N}_2:\text{CO}_2$ (4:1) с FeCl_2 (10 мМ) в качестве донора электронов и NO_3^- или S^0 в качестве акцепторов.

Концентрированные растворы вносимых компонентов (субстратов, солей) готовили из сухих навесок и автоклавировали. Растворы сахаров и антибиотиков стерилизовали фильтрованием (0,22 мкм, Millipore, Германия). Ферригидрит (90 мМ) готовили на основе раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (24 г/л), который титровали 10% раствором NaOH до pH 9,0.

3.4.2 Получение накопительных и чистых культур

Для получения накопительных культур 1 мл смеси воды и осадков из флакона с пробой стерильно отбирали шприцом и вносили в пробирку со стерильной средой (10 мл). Разбавленную пробу использовали как посевной материал (в объемном соотношении 1:10) для получения накопительных культур в различных условиях (субстратах, акцепторах электронов, вариации pH и T). Устойчивые накопительные культуры получали серией последовательных пересевов. Длительное культивирование (до 2 месяцев инкубирования каждого пересева) было использовано как ключевой подход при попытке накопления целевых культур

архей групп ‘*Ca. Marsarchaeales*’ и A10/ARK15. Микробное сообщество каждого пересева, по возможности, анализировалось методом NGS по гену 16S рРНК. Согласно результатам этого анализа проводилась корректировка селективных условий для накопления целевой группы или избавления от спутников (изменение Т, рН, ограничение в доступности акцепторов электронов, смена субстрата, добавление антибиотиков и пр.). Для выделения чистых культур использовали метод предельных разведений (до разбавления посевного материала в 10^8 раз). Культуры инкубировали в термостатах Binder и/или Thermo (Германия) от 50 до 82 °С в течение 5–50 дней, периодически проверяя рост клеток микроскопированием.

Признаками чистоты культуры являлись морфологическая однородность при микроскопии и при пересеве на среду, богатую органическими субстратами (ДЭ, глюкоза, пептон по 1 г/л) на различные температуры для выявления минорных спутников. Обязательно чистоту культуры проверяли методом NGS по гену 16S рРНК и полногеномным секвенированием.

3.4.3 Ростовые эксперименты

Все эксперименты с чистыми культурами проводили в 2–5 повторностях. Для создания благоприятных условий роста определяли оптимальную температуру и рН, после чего проводили проверку роста на различных субстратах и определяли урожайность и минимальную скорость роста, определяли продукты метаболизма и особенности строения клеток (см. далее). Для визуализации роста культуры проводили подсчеты клеток и вычисляли скорости роста и время удвоения по формуле:

$$\mu = \frac{2,303 \times (\log_{10} N_1 - \log_{10} N_0)}{t_1 - t_0}, \quad (1)$$

$$g = \frac{0,693}{\mu}, \quad (2)$$

где μ – удельная скорость роста, ч^{-1} ; N_1 – количество клеток в конечный момент времени t_1 ; N_0 – количество клеток в начальный момент времени t_0 ; g – время удвоения клеток, ч.

Для определения возможности роста на целевых субстратах, штаммы последовательно переседали трижды в одних и тех же условиях. Урожайность в третьем пересеве сравнивали с ростом на фоновой среде (без субстрата). За положительный принимали рост, превышающий фоновый минимум в 2 раза. Полный список протестированных субстратов приведен ниже (Sigma, Megazyme, Диаэм, Fluka, Supelco, Реахим, Хеликон):

- Моно-, ди- и олигосахариды: арабиноза, галактоза, глюкоза, ксилоза, манноза, рамноза, рибоза, фруктоза, N-ацетилглюкозамин; лактоза, мальтоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза; рафиноза;
- Полисахариды: авицел (микrokристаллическая целлюлоза (МКЦ)), аморфная целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), арабинан, арабиногалактан, арабиноксилан, галактан, ксилан, ксилоглюкан, β -глюкан, курдлан, ламинарин, лихенан, пахиман, галактоманнан, глюкоманнан, маннан, геллановая камедь, гуаровая камедь, камедь карайи, камедь рожкового дерева, ксантановая камедь, трагакантовая камедь, пектин, полигалактуронан, рамногалактуронан, агароза, альгинат, декстран, декстрин, инулин, крахмал, пуллулан, хитин, хитозан;
- Спирты: маннитол, сорбитол, этанол, глицерин;
- Белковые соединения: альбумин, желатин, казеин, кератин, пептон, триптон, белок пера, белок семян хлопка;
- Липидные соединения: ТБ, триолеин (ТО), моноолеин, твин 80, оливковое, подсолнечное, хлопковое, кунжутное масло;
- Органические кислоты: феруловая кислота, ацетат, пируват, формиат, бутират, лактат, фумарат, тартрат, сукцинат, малат, пальмитат, стеарат;
- Многокомпонентные субстраты: ДЭ, лист бамбука, лист кукурузы, мясной экстракт, опилки еловые, сено, соевая мука, шрот подсолнечника, шрот сои, свиная щетина, перо, кожа змеи;
- Ароматические соединения: нефть, лигнин;
- Синтетические полимеры: ПЭТ.

Способность к использованию акцепторов проверяли в однократном пересеве (в трех повторностях) с контролем образования индикаторных продуктов (например, появлению H_2S , изменению окраски культуральной жидкости и т. д.) и сравнении с ростом на средах без акцептора.

Для проверки переносимости кислородных условий клетки выращивали до стадии поздней экспоненты в оптимально подобранных условиях, после чего клетки подсчитывали. Далее половину флаконов открывали на 40 минут в стерильном ламинарном боксе для смены газовой фазы. После флаконы закрывали, оставляя в резиновой крышке стерильную иглу с ватой для доступа воздуха. Другая половина флаконов не подвергалась воздействию и использовалась в качестве контроля. Все флаконы помещали в термостат, после чего через интервальные промежутки времени клетки микроскопировали, считали и пересевали в оптимальные условия для проверки жизнеспособности (Рисунок 5).

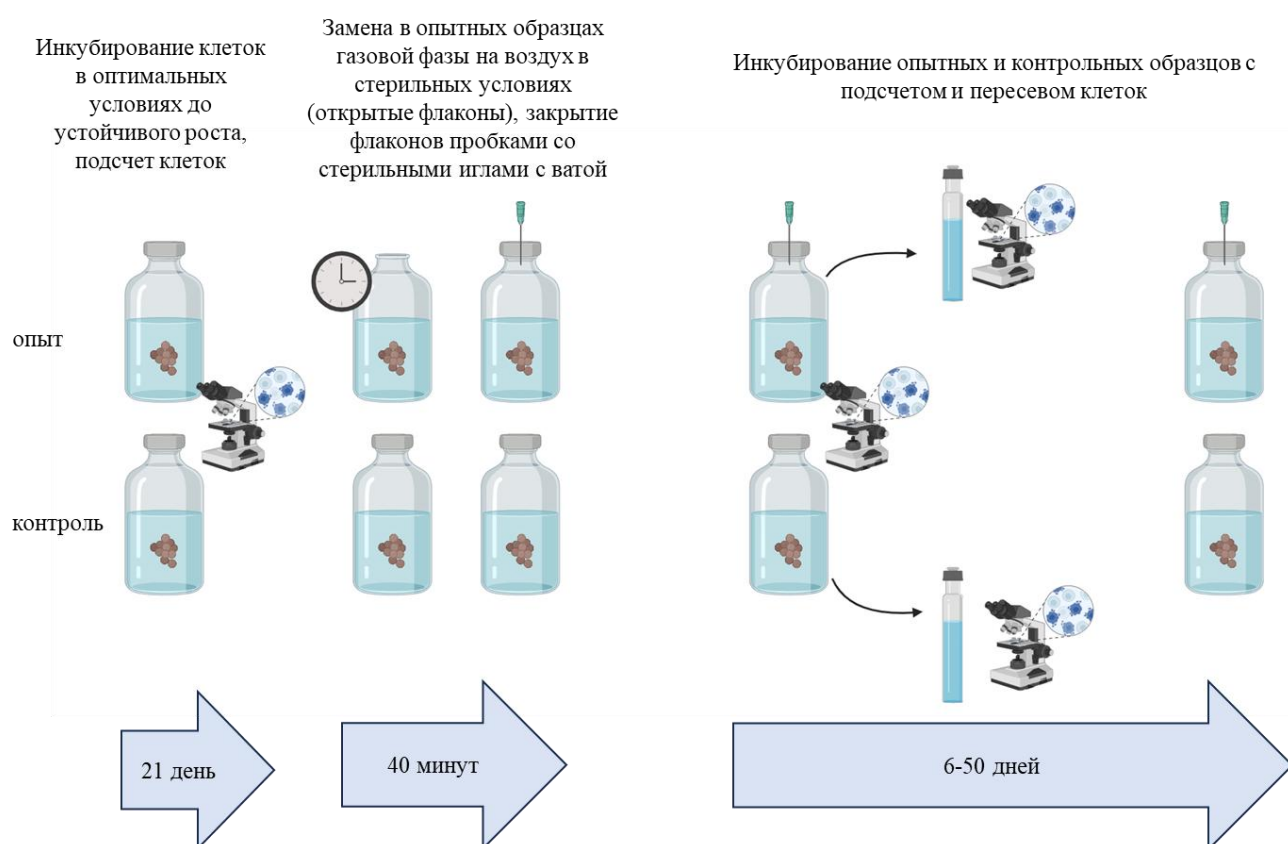


Рисунок 5 – Схема эксперимента по определению переносимости кислородных условий.

3.4.4 Определение филогенетического положения

Определение таксономического положения штамма 3639Fd внутри рода *Fervidicoccus* проводили при помощи ДНК-ДНК гибридизации *in silico* с использованием Genome-to-Genome Distance Calculator [Auch et al., 2010]. Для этого использовали геномные последовательности типового штамма Kam940^T, взятого из открытой базы данных GenBank и штамма 3639Fd, полученного в 2019 г. при помощи технологии Illumina MiSeq сотрудниками лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот ФИЦ Биотехнологии РАН.

Первоначальная идентификация штамма АК-3817 (из группы ‘*Ca. Marsarchaeales*’) была выполнена с использованием поиска BLAST с последовательностями гена 16S рРНК в базе данных NCBI core_nt (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). После получения полного генома (Illumina) филогенетическое положение штамма было проанализировано с использованием набора консервативных белков «ar53». Для анализа использовали *in silico* транслированные геномы новых изолятов и репрезентативные геномы филума *Thermoproteota* (согласно GTDB R226), которые были выравнены с использованием gtdb-tk v.2.4.1 [Chaumeil et al., 2022]. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия было построено с использованием IQtree v.3.0.1 [Wong et al., 2026] с наилучшей моделью, предсказанной ModelFinder [Kalyaanamoorthy et al., 2017] (LG+F+I+G4), и 1000 сверхбыстрых бутстрап-репликаций. Дерево было оформлено с помощью iTOL v.6 [Letunic, Bork, 2024].

Для определения филогенетического положения архей из группы A10/ARK15 брали полный набор белков «ar122» из репрезентативных геномов класса *Thermoplasmata* (согласно GTDB R226), а также высококачественных геномов, относящихся к группе A10/ARK15, и выравнивали с использованием gtdb-tk v.1.7.0. Полученное выравнивание было обрезано с помощью trimAL v.1.4.1 [Capella-Gutiérrez, Silla-Martínez, Gabaldón, 2009] с опцией –gt, равной 0,85. Филогенетическое дерево было построено с использованием IQtree v.3.0.1 с моделью LG+G+I и 1000 сверхбыстрыми бутстрап-репликациями в качестве значений поддержки. Для определения филогенетического положения штамма АК-

4214 с использованием gtdb-tk v.2.4.0 были выявлены и выравнены консервативные белки из набора «ar53» в *in silico* транслированных репрезентативных геномах класса *Thermoplasmata*. Полученное выравнивание использовалось для построения филогенетического дерева в программе FastTree 2.1.11 [Price, Dehal, Arkin, 2010] с выбором модели WAG +G и 1000 повторений SH-теста в качестве значений поддержки.

3.4.5 Микроскопия

Фазово-контрастная микроскопия и подсчет клеток

Рост культур наблюдали с помощью световой микроскопии, используя прямой подсчет клеток. Готовили препарат «раздавленная капля» объемом 2 мкл и микроскопировали под иммерсией с увеличением 1000 раз на микроскопе Zeiss Axio Lab A1 (Германия) с фазово-контрастным объективом. Подсчитывали клетки в 15–20 полях зрения, среднее значение умножали на коэффициент $5,16 \cdot 10^6$, показывающий количество клеток в 1 мл культуры (радиус поля зрения микроскопа 0,1, покровное стекло 18*18 мм).

При просмотре клеток в режиме флуоресценции препарат окрашивали раствором акридинового оранжевого, добавляя его к образцу в объемном соотношении 1:1, после чего выдерживали 1 минуту в темноте. Живые клетки на препаратах окрашивались в зеленый цвет.

Трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия

В процессе подготовки препаратов клеточные культуры осаждали центрифугированием (9000g, 30 минут), а затем применяли стандартные методы фиксации клеток и окраски срезов [Suzina et al., 2022]. Ультратонкие срезы исследовали под ТЭМ JEM-1400 (JEOL, Япония). Для СЭМ образцы готовили, как описано ранее [Ponamareva et al., 2015], с использованием вакуумного распылительного оборудования JFC 1100 (JEOL, Япония). Анализ СЭМ проводили с помощью микроскопа JSM-6510LV (JEOL, Япония).

3.4.6 Определение продуктов метаболизма

Перед анализом продуктов метаболизма супернатант, отделенный от выросших клеток центрифугированием (9000g, 30 минут), подкисляли 20 мкл

концентрированной HCOOH . Летучие жирные кислоты и спирты определяли методом ГЖХ на хроматографе Кристалл 5000.2 (Хроматэк, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение проводили на колонке Zebron ZB-WAXplus или Solgel-Wax. Определение сахаров и спиртов проводили при помощи ВЭЖХ на хроматографе Стайер (Аквилон, Россия). Разделение проводили на колонке Aminex HPLX-87H. Образование CO_2 детектировали на хроматографе Кристалл 5000.2 с колонкой Hayesep Q.

Количество H_2S в природных пробах и чистых культурах определяли колориметрически [Trüper, Schlegel, 1964]. В 500 мкл 10% р-ра CH_3COOZn вносили 30 мкл культуральной жидкости или медленно пропускали 300 мкл газовой фазы (фиксация в виде ZnS). После добавляли 1260 мкл dH_2O и 200 мкл N,N -диметил- n -фенилендиамина (0,2% р-р в 20% H_2SO_4). Пробирку встряхивали, добавляли 10 мкл $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$ (10% раствор в 2% H_2SO_4), снова встряхивали, выдерживали 20 минут в темноте. Окраску образцу давал метиленовый синий, образующийся при взаимодействии ZnS с N,N -диметил- n -фенилендиамином в присутствии железоаммонийных квасцов. Интенсивность окраски определяли на спектрофотометре Genesys 10Vis (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 670 нм.

3.4.7 Липидный анализ

Для определения липидного профиля культуры архей наращивались в оптимальных условиях (для штамма АК-3817 на галактоманнане с S^0 при pH 3,9 и 60 °C, для штамма АК-4214 на пептоне с S^0 при pH 4,0 и 70 °C) до фазы стационара. Биомасса осаждалась центрифугированием (9000g, 30 мин) и лиофилизировалась в течение суток на установке VirTis benchtop K (VirTis, США). Липиды экстрагировали из лиофилизированной биомассы, которую обрабатывали ультразвуком в смеси $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{PBS}$ (2:1:0,8). Экстракт доводили до конечного соотношения растворителей 1:1:0,9 для разделения фаз. Органическую фазу отбирали, водную фазу дважды реэкстрагировали CH_2Cl_2 . Объединенный экстракт упаривали под потоком N_2 . Перед анализом растворяли в смеси $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (9:1) и фильтровали через 0,45 мкм шприцевые целлюлозные

фильтры. Анализ проводили методом сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с высокоразрешающей масс-спектрометрией (UHPLC-HRMS) с обращенной фазой на хроматографе Agilent 1290 Infinity (Agilent, США). Разделение выполняли на колонке C18 при 30°C с градиентом от 5–100% фазы $C_3H_8O/CH_3OH/CHOOH/NH_3$ за 80 мин (с потоком 0,2 мл/мин). Количественную оценку проводили по площадям пиков.

3.5 Определение биотехнологического потенциала глубоких филогенетических линий термофильных архей

3.5.1 Ферментативная активность

Нативная эстеразная и липазная активности

Определение нативной эстеразной и липазной активностей *F. fontis* 3639Fd проводили на агаризованных чашках с ТБ и ТО соответственно. В дистиллированную воду добавляли 2% агарозы (Хеликон, Россия), нагревали до полного растворения, вносили 1% ТБ/ТО (Sigma Aldrich, США), сонифицировали на ультразвуковой мойке Сапфир УЗВ 9.5 (Россия) до образования мутной суспензии в течение 10 минут при 56 °C, после чего в чашки с ТО добавляли краситель родамин В 0,001% (Acros, Бельгия) в конечной концентрации 2 мл/л и разливали по чашкам Петри. Далее, в застывшем слое вырезали лунки объемом 60 мкл, куда вносили исследуемые образцы: культуральную жидкость, целые клетки, фракции связанных с клеткой белков (ФСКБ), клеточный лизат, инкубированные среды без клеток, или контрольные образцы.

Для получения образцов 3 л выросшей в оптимальных условиях культуры штамма 3639Fd (pH 5,6, 70 °C, 0,1 г/л ДЭ с ТБ/глюкозой) центрифугировали (9000g, 20 минут) и отбирали супернатант, лизаты клеток получали обработкой ультразвуком на сонификаторе Soniprep 150 plus (Великобритания) с добавлением 500 мкл среды и 50 mM буфера MES (pH 5,7) при амплитуде 12,1 в течение 4 мин на льду. Для получения ФСКБ к осадку клеток добавляли по 100 мкл детергентов 10% Triton-X100/ 10% CHAPS/ 1M NaCl/ 3M мочевины/ 10% Tween 80 (Fluka, Sigma, Thermo Fisher, США, Диаэм, Россия, Roth, Германия) и инкубировали 1 ч на

шейкере BioSan (Латвия) при 30 °С, 600 об./мин. От детергентов при необходимости избавлялись с помощью центриконов Amicon ultra 3000 mwco (Sigma Aldrich, США). После этого к добавляли 400 мкл буфера MES.

Чашки с внесенными образцами (по 60 мкл в лунке) инкубировали в течение двух дней при 70 °С в емкостях с небольшим количеством буфера на дне (во избежание высыхания геля), добавляя в лунки еще по 60 мкл образцов после выпитывания первой порции через сутки. Эстеразную активность отмечали по образованию вокруг лунок прозрачных зон, а липазную – светящихся в ультрафиолете (365 нм) зон, что свидетельствовало о высвобождении жирных кислот при разложении субстрата.

Индукцибельность наработки фермента проверяли, сравнивая активности культур, выросших на липидном субстрате (ТБ), и на субстрате другой химической природы (глюкоза). Образцы для эксперимента готовили единообразно, как описано выше.

Качественная оценка активности гликозидаз

Чашки Петри заливали 2% агарозным гелем на основе 50 мМ TrisHCl pH 7,5 с 0,2% β-глюкана или лихенана (Megazyme, Ирландия). После застывания геля в нем так же были сделаны лунки, в которые вносили до 60 мкл образцов: полученных фракций рекомбинантного фермента из *Tardisphaera* spp. (см. далее), культуральной жидкости, лизата клеток, осадка клеток, либо не связавшихся с колонкой белков. Далее чашки в емкостях с буфером помещали в термостат на 60 °С, и инкубировали 16 часов. После чашки заливали 0,1% раствором Конго красного (Sigma, США) и оставляли окрашиваться на 30 минут, отмывали 1 час в 1 М NaCl, для контрастирования на 20 секунд заливая 5% ледяной уксусной кислотой. Зоны активности определяли по бесцветным участкам вокруг лунок, которые образуются в местах гидролиза полимерного субстрата.

Количественная оценка активности гликозидаз

С рекомбинантно полученными белками из *Tardisphaera* spp. проводили ферментативную реакцию, где в качестве субстратов использовали растворы различных полисахаридов в буфере (в зависимости от исследуемого диапазона pH:

для значений 2,5–4,5 был использован 50 mM HEPES, для 4,5–6,5 – 50 mM MES, 6,5–8,0 – 50 mM HEPES). Общий объем реакции составлял 2 мл, концентрация субстрата – 2–3 мг/мл, концентрация белка варьировалась разбавлением исходного препарата буфером для его хранения в 5–20 раз. В качестве субстратов проверяли лихенан, агарозу, пахиман, курдлан, глюкоманнан, арабиногалактан, галактан, карбоксиметилцеллюлозу, β -глюкан, ламинарин. При проверке влияния различных ионов (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , K^+ , Na^+) и детергентов (мочевина, Твин 80, ЭДТА, 2-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия) в реакционную смесь добавляли соответствующий раствор до концентрации 1 mM. Контрольные образцы имели тот же состав, но без исследуемого белка (вместо которого был добавлен буфер для его хранения), также был поставлен контроль реагента с dH_2O . Пробирки с реакционной смесью инкубировали в диапазоне температур 25–98 °C в твердотельных термостатах Термит (ДНК-технология, Россия), последовательно отбирая образцы в нескольких временных точках, начиная с 0 и до 48 часов. Все эксперименты проводили минимум в двух повторностях. Реакцию останавливали добавлением реагента на основе динитросалициловой кислоты (ДНСК).

Для приготовления останавливающего ферментную реакцию реагента использовали (г/л): NaOH – 15, Na_2SO_3 – 5, фенол – 2, ДНСК – 10 и 200 г тартрата К-Na (Sigma, Thermo Fisher, США, Диаэм, Россия). К 500 мкл отобранной пробы добавляли 500 мкл реагента, перемешивали и инкубировали в твердотельном термостате при 98 °C 15 минут, после чего остужали пробирки на штативе с хладагентом. При наличии в растворе редуцирующих сахаров, образующихся при расщеплении углеводного субстрата, окраска менялась: происходило восстановление желтой 3,5-динитросалициловой (ДНСК) кислоты до оранжево-красной 3-амино-5-нитросалициловой кислоты карбонильными группами. Оптическую плотность проб измеряли при длине волны 575 нм на спектрофотометре SPECTROstar nano (BMG LabTech, Германия). Концентрацию редуцирующих сахаров определяли с помощью калибровочных кривых для глюкозы, целлобиозы, маннозы, галактозы с концентрациями от 20 до 500 мкг/мл (с которыми была проведена реакция с реагентом).

3.5.2 Получение рекомбинантных ферментов

Небольшой выход биомассы штаммов *T. miroshnichenkoae* МР-3918 и *T. saccharovorans* АК-3817 не позволил изучить нативные активности целевых белков, поэтому было принято решение о переходе к их гетерологической экспрессии. При получении рекомбинантных гликозидаз пользовались описанной методикой [Zayulina et al., 2025].

Для получения ДНК-фрагментов генов PRZ02_06100 и PRZ02_05685 из *T. saccharovorans* АК-3817 был дополнительно использован метод «вложенной» ПЦР. Для подбора праймеров использовали NCBI PrimerBLAST [Ye et al., 2012], SnapGene (<https://www.snapgene.com/>), OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com>). Полученные фрагменты были клонированы с использованием aLICator LIC Cloning & Expression System (Thermo Scientific, Германия) в экспрессионный вектор pLATE51, который затем использовали для химической трансформации штамма *E. coli* XLBlue. Наличие и корректность вставки подтверждали методом селекции по ампициллину, а также секвенированием плазмид, выделенных с помощью набора Plasmid miniprep (Евроген, Россия). Экспрессию белков проводили со штаммами *E. coli* BL21(DE3). Частичную очистку белка проводили аффинной хроматографией на Gravity Flow колонках (носитель Ni-NTA HP агароза, Cytiva) в ступенчатом градиенте имидазола (25–500 мМ) или на хроматографе низкого давления (FPLC) AktaStart, с колонкой Ni-NTA HisTrap 1 ml. Визуализацию полученных препаратов проводили электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. При необходимости фракции полученных белков обессоливали и концентрировали с помощью ультрацентрифужных модулей Sartorius 20 кДа. Белки хранили в 50 мМ TrisHCl, pH 7,5.

3.5.3 Сравнительная геномика

Определение типа и каталитического мотива предполагаемого фермента, ответственного за разложение липидных субстратов (*F. fontis* штаммы 3639Fd и Kam940^T), а также ферментов разложения полисахаридов (у *Tardisphaera* spp.) проводили с помощью сравнения последовательности с базой данных семейств эстераз и гликозидаз с выбором BLAST для выравнивания. Для анализа

трансмембранных частей, а также наличия сигнального пептида был использован сервис Phobius [Käll, Krogh, Sonnhammer, 2004], для определения примерной молекулярной массы и изоэлектрической точки белков – онлайн-инструменты Hmmer и ExPASy [Finn, Clements, Eddy, 2011; Gasteiger, 2003].

При построении филогенетического дерева предполагаемых ферментов в качестве базы данных использовали набор белковых последовательностей прокариот, сформированный по критериям:

1. Сходство аминокислотной последовательности и предполагаемой/подтвержденной функции белка (эстеразная/липазная или гликозидазная активность) при проведении BLAST-анализа по базам данных UniProtKB (<https://www.uniprot.org/uniprotkb>), SwissProt [Bairoch, 2000], Lipase Engineering Database [Fischer, 2003], CAZy [Cantarel et al., 2009];
2. Наличие подтвержденной эстеразной/липазной или гликозидазной активности (например, на рекомбинантных штаммах) у представителей термофильных архей или бактерий и принадлежности к определенному семейству ферментов.

Филогенетическое дерево строилось при помощи программы MEGA 7 и 11 (<https://megasoftware.net/>) с выбором метода построения Maximum-Likelihood и моделью Джонсона-Тэйлора-Торнтонна.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Микробные сообщества термальных источников Курил и Камчатки

Результаты этого подраздела диссертации цитируются по статьям автора [Karaseva et al., 2024] и [Prokofeva et al., 2025].

Курильские острова

В экспедиции 2023 г. получены образцы из 34 термальных источников (Рисунок 6). Пробы №№4402–4409 были отобраны в районе с. Рейдово и вулкана Баранского на о. Итуруп. Диапазон температур составил 45–94 °С, рН 1,5–7,5. На о. Кунашир отобраны пробы №№4412–4450 около вулкана Головнина (оз. Кипящее, Северные и Южные Алехинские источники, Черепаховое и Безымьянное сольфатарные поля) и вулкана Менделеева (руч. Кислый, Горячий пляж, Нижнедокторские, Третьяковские, Столбовские источники, Северо-Западное сольфатарное поле). Температуры составляли 40–79 °С, диапазон рН 1,8–8,5.

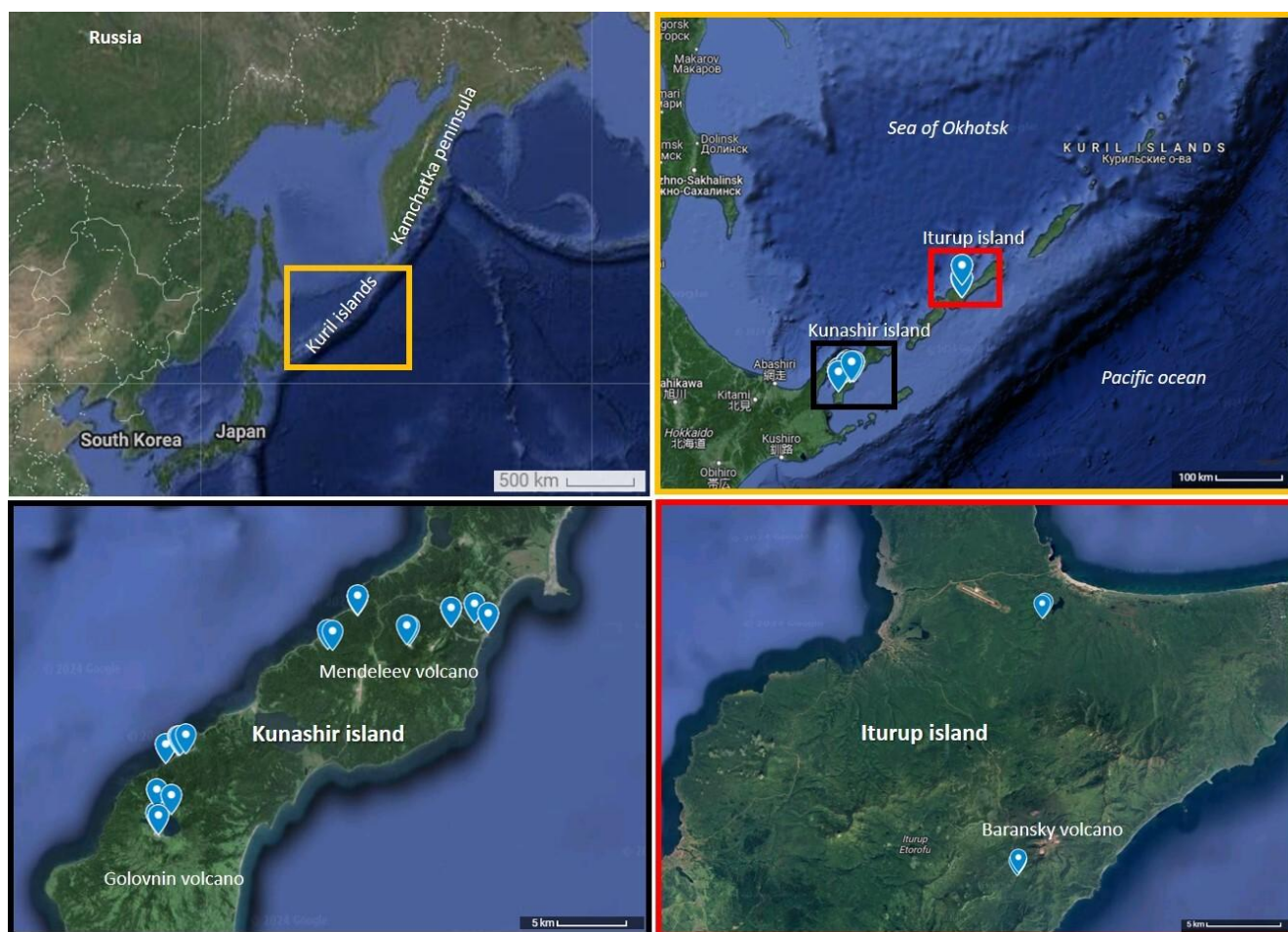


Рисунок 6 – Места отбора проб из горячих источников островов Итуруп и Кунашир. Цитируется по [Karaseva et al., 2024].

Минерализация воды составила 174–3049 мг/л, диапазон жесткости 0,4–12,5 мэкв/л. Основными доминирующими анионами были Cl^- и SO_4^{2-} , катионами – Na^+ и Ca^{2+} . Содержание H_2S варьировалось от 0 до 3,96 мМ, в большинстве проб он не детектировался (Рисунок 7, Приложение А). В целом, полученные данные о химическом составе вод Курильских гидротерм согласуются с аналогичными данными по ближайшим гидротермальным системам Камчатки и Японии, что позволяло ожидать схожие закономерности в составе микробных сообществ [Homma, Tsukahara, 2008; Kompanichenko, 2019; Matsumoto G. I., Shimizu R., Nagura M., 2020; Sasaki et al., 2021; Sasaki, 2018; Taran et al., 2022]. Всего было обнаружено 1688 OTU бактерий и 80 OTU архей (Рисунок 8).

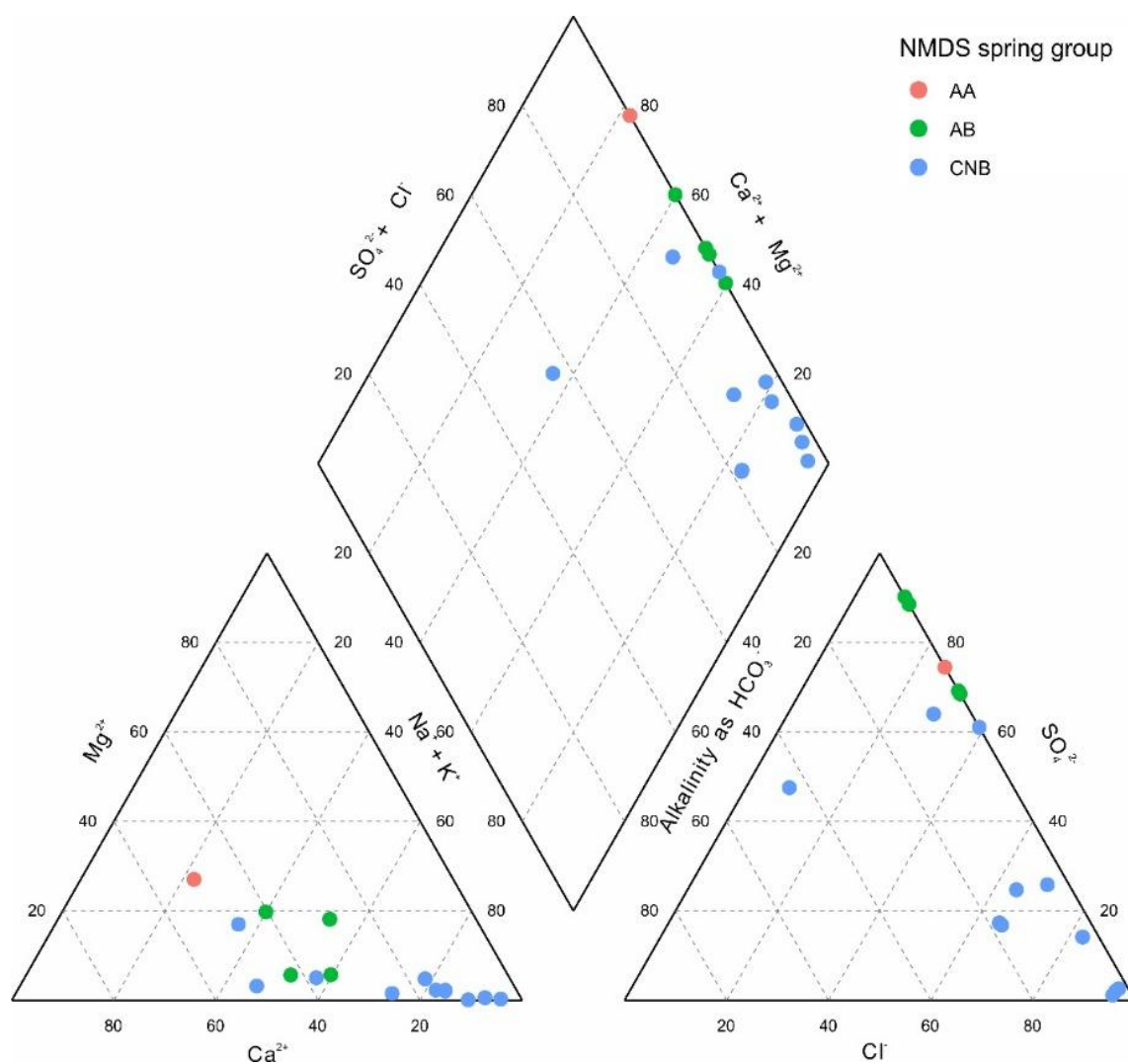


Рисунок 7 – Химический состав вод горячих источников Курильских островов. Диаграмма Пайпера с содержанием основных катионов и анионов. Цветовые обозначения AA, AB, CNB отражают разделение источников по pH и микробному составу на основании NMDS-анализа (см. далее по тексту). Цитируется по [Karaseva et al., 2024].



Рисунок 8 – 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].

Бактерии преобладали в 27 образцах, составляя от 49,3 до 99,6% от сообщества. Среди бактерий чаще встречались представители филумов *Proteobacteria* (сейчас *Pseudomonadota*), *Aquificota* и *Chloroflexi* (*Chloroflexota*). Наиболее многочисленными родами были *Sulfurihydrogenibium* (до 72,6%), *Hydrogenobaculum* (до 66,1%), *Acidithiobacillus* (до 44,5%), *Roseiflexus* (до 53%) и *Thiomonas* (44,4%). В 7 пробах доминировали археи (от 58,9 до 96,5%). Преобладали филумы *Crenarchaeota* (сейчас *Thermoproteota*) и *Thermoplasmata*. Наиболее распространенными родами были *Thermoplasma* (до 80,1%), *Sulfolobus* (до 69,5%), *Acidianus* (до 28%), *Metallosphaera* (до 29,2%), а также представители некультивируемых глубоких линий ‘*Ca. Caldiarchaeales*’ (1,5–25%), BSLdp215 (1,1–20,4%) и ‘*Ca. Geoarchaeales*’, по базе данных SILVA совпадающих с ‘*Ca. Marsarchaeales*’ (1,6–42,5%). В отдельных пробах обнаружены археи ‘*Ca. Bathyarchaeia*’ (8,7%), ‘*Ca. Nitrosotenuis*’ (10,3%) и линии A10/ARK15 (6,25%). Встречались и морские некультивируемые группы архей в пробах из приливной зоны побережья с термальными выходами. В небольших долях обнаружены археи группы *Asgard* (до 0,5%) (Рисунок 9). В большей части проб с доминированием архей pH был ниже 2,9, а температура – от 50 до 94 °C (Рисунок 10).

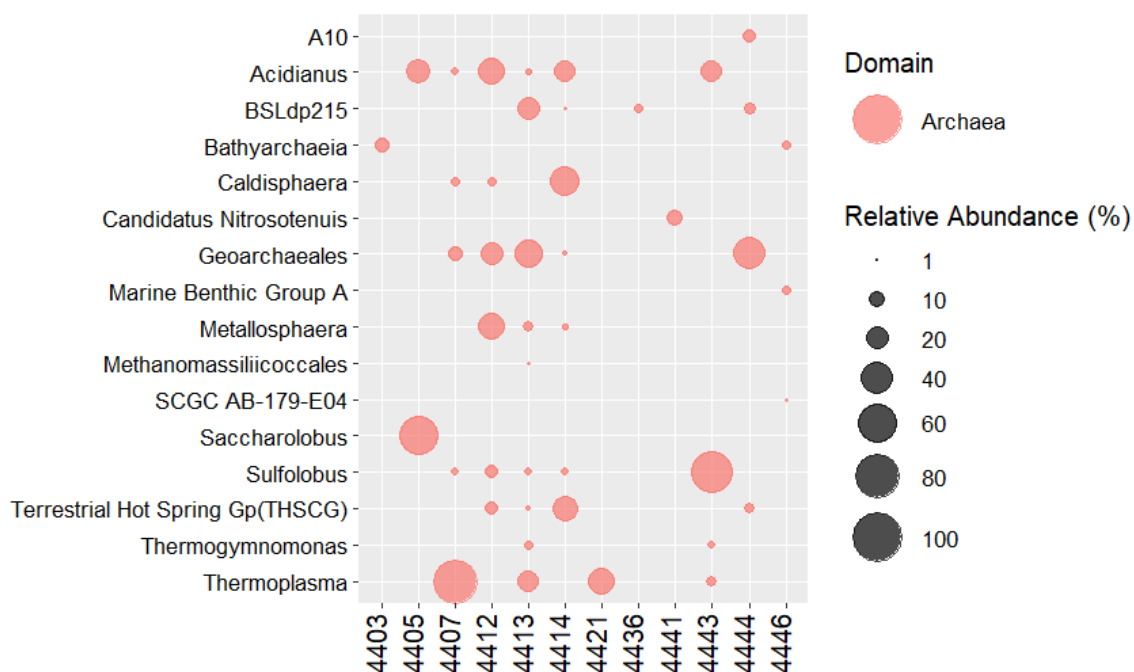


Рисунок 9 – Относительная представленность архей в горячих источниках Курильских островов (отображены OTU, имеющие численность $\geq 1\%$ хотя бы в одном образце). ‘*Ca. Geoarchaeales*’, по базе данных SILVA совпадает с ‘*Ca. Marsarchaeales*’.

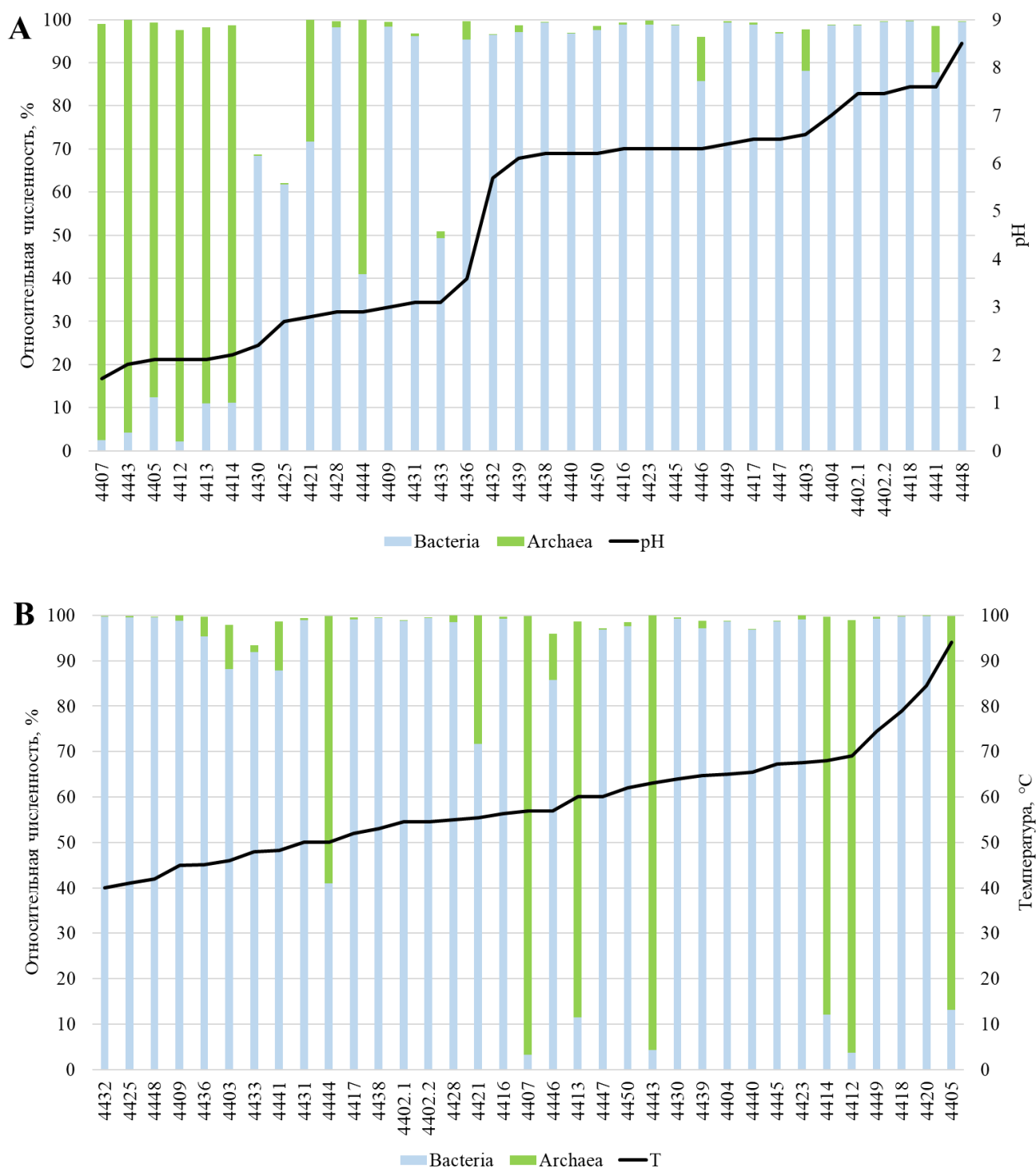


Рисунок 10 – Относительная представленность архей и бактерий в горячих источниках Курильских островов в зависимости от pH (A) и температуры (B) горячего источника.

Анализ β -разнообразия NMDS показал, что сообщества можно условно разделить на три группы, различающиеся по pH и микробному разнообразию: околонейтальную бактериальную группу (circumneutral bacterial, CNB) с диапазоном температур 40–79 °C и pH 5,7–8,5 с преобладанием бактерий; кислую

архейную группу (acidic archaeal, AA) с температурами 50–94 °С и pH 1,5–2,9 и доминированием архей; и кислую бактериальную группу (acidic bacterial, AB) с температурами 41–64 °С и pH 2,2–3,6 и преобладанием бактерий (Рисунок 11). Это подтверждалось и другими статистическими тестами: были выявлены значимые различия между группой CNB и группой AA по представленности бактерий и архей и диапазону pH. Группы AA и AB различались по содержанию бактерий, архей и диапазону температур. Группа CNB и группа AB различались по диапазону pH.

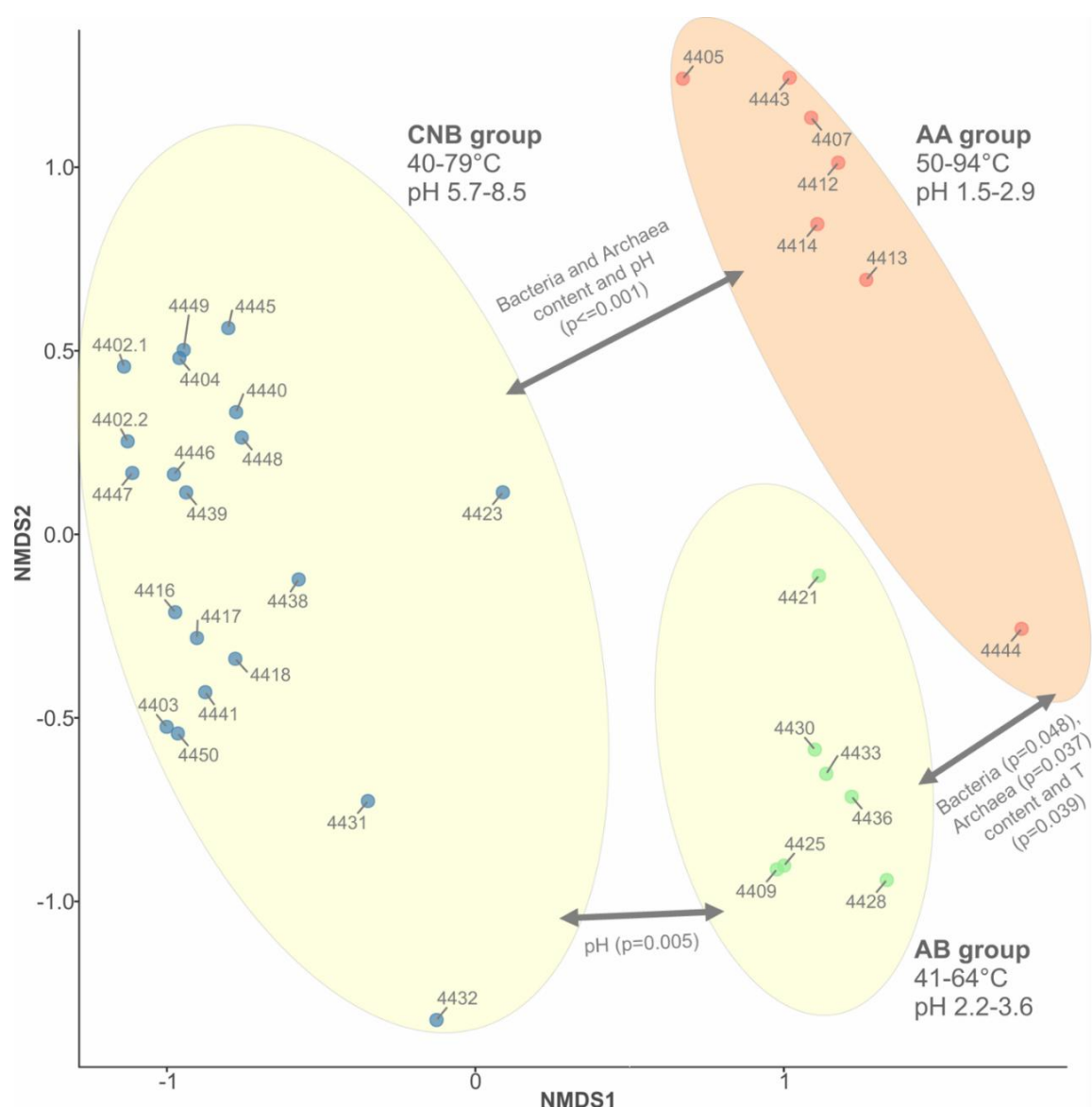


Рисунок 11 – Результаты анализа β -разнообразия прокариотических сообществ горячих источников Курильских островов. NMDS-распределение источников с использованием расстояний Брея-Кёртиса ($k=3$; stress value=0.095) и результаты статистического сравнения полученных групп. CNB – околонеутральная бактериальная группа, AA – кислая архейная группа, AB – кислая бактериальная группа. Цитируется по [Karaseva et al., 2024], с изменениями.

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 (Рисунок 12).

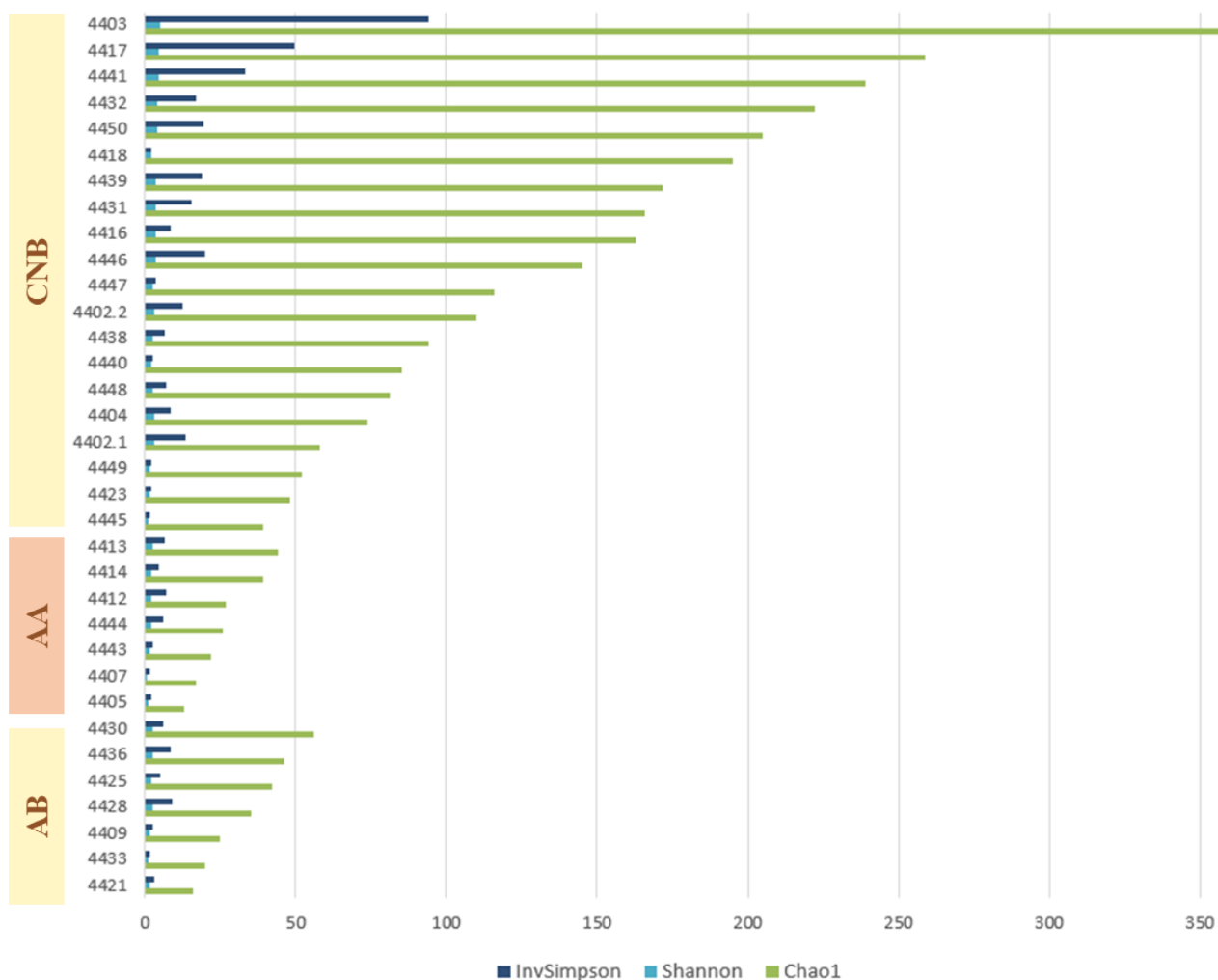


Рисунок 12 – Результаты анализа α -разнообразия прокариотических сообществ горячих источников Курильских островов. CNB – околонеутральная бактериальная группа, AA – кислая архейная группа, AB – кислая бактериальная группа.

Тест Мантела также показал, что состав микробных сообществ горячих источников Курил связан с некоторыми факторами окружающей среды. Так, микробное разнообразие имело высокую степень корреляции со значениями pH ($R=0,66$), а также умеренную степень корреляции с некоторыми химическими параметрами воды, такими как минерализация ($R=0,44$), элементный ($R=0,54$) и ионный состав воды ($R=0,47$) (Таблица 1).

Таблица 1 – Корреляции между составом микробных сообществ и экологическими факторами в Курильских горячих источниках (тест Мантела). Цитируется по [Karaseva et al., 2024], с изменениями.

Фактор	Spearman		Pearson	
	R	p-value	R	p-value
Расположение	0,1892	0,0319	0,03438	0,3549
T	0,2421	0,0121	0,2014	0,0223
pH	0,6634	1,00E-04	0,4918	1,00E-04
Минерализация	0,4399	2,00E-04	0,3189	7,00E-04
Жесткость	0,006418	0,4575	0,06006	0,2798
Fe, %	-0,1882	0,9728	-0,1944	0,9937
Элементный состав воды	0,5445	1,00E-04	0,3935	7,00E-04
Ионный состав воды	0,47	1,00E-04	0,3894	1,00E-04

Камчатка

В ходе экспедиции на Камчатку в 2025 г. были получены 29 проб горячих источников, расположенных в кальдере вулкана Узон и Долине гейзеров. Диапазон температур составил 21,5–96 °С, pH – 2,1–8,3. Минерализация в образцах составляла 183–3856 мг/л, жесткость – от 0,5 до 4 мэкв/л. Основными доминирующими анионами были Cl^- и SO_4^{2-} , катион – Na^+ . H_2S детектировался во всех пробах в количествах 1,2–2,4 mM (Приложение В).

Так как микробные сообщества Камчатки изучены достаточно хорошо, в этой работе не приводится расширенный анализ состава микробных сообществ аналогично микробным сообществам Курил, где такое количество источников было изучено впервые. Тем не менее, пробы были использованы для получения актуальных данных о физико-химических условиях, а также о текущем составе микробных сообществ, которые могли измениться из-за возникших летом 2025 года сильных землетрясений и извержений вулканов в регионе, и особенно близкого к кальдере Узон и Долине гейзеров вулкана Крашенинникова. По обновленной информации, параметры и состав сообществ в большей степени остались стабильными.

Целевые группы архей в источниках Курил и Камчатки

Поскольку в данной работе объектами исследования являются глубокие филогенетические линии архей, относящиеся к линиям *Fervidicoccales*, ‘Ca.

Marsarchaeales' и A10/ARK15, был проведен мониторинг их относительной численности в полученных экспедиционных образцах методом NGS. Так, археи порядка *Fervidicoccales* встречаются в основном в камчатских пробах с умеренно низкими pH (4,0–6,3) и температурами от 43 до 70 °C, достигая до 11% от всего сообщества; в курильских пробах они практически не детектируются. Группа 'Ca. Marsarchaeales' в камчатских источниках встречается в более широком диапазоне низких значений pH (pH 2,5–6,3) при таком же диапазоне температур (40–69 °C) и достигает 17% от всего состава сообщества, а в курильских обнаруживается до 42,5% в экстремально кислых источниках с pH 1,5–2,9 и схожими температурами (50–69 °C). Группа A10/ARK15 является одной из самых многочисленных групп прокариот (до 60%) в камчатских горячих источниках с показателями pH 2,1–6,4 и температур 30,5–79 °C. В курильских источниках эта группа встречается сильно реже, достигая 6,25% от всего состава сообщества (Рисунок 13, Рисунок 14).

Вероятно, такое распределение обусловлено физиологическими особенностями представителей этих групп, так как по нашим наблюдениям корреляции были найдены по некоторым химическим элементам, pH и минерализации источников, а также уровню Eh (Приложение С, Приложение D, Приложение E).

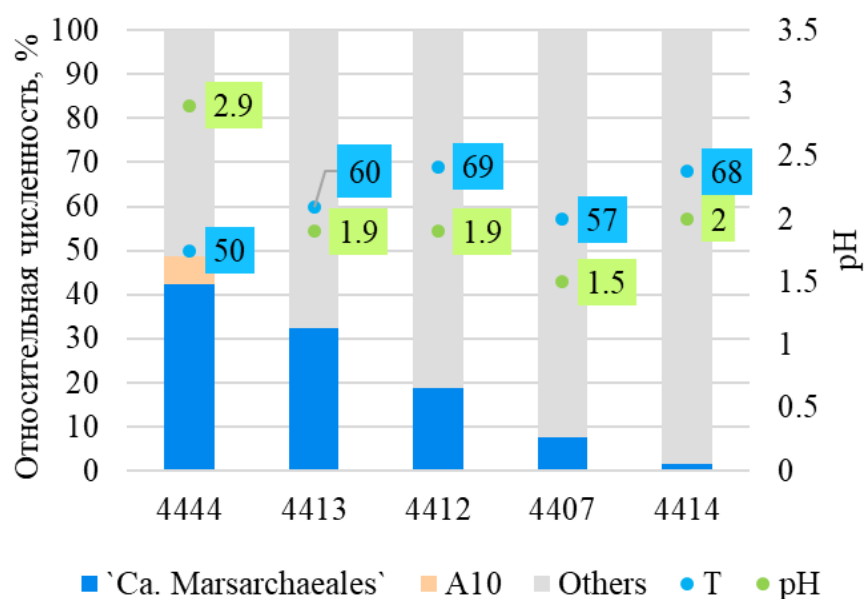


Рисунок 13 – Относительная представленность целевых групп архей в горячих источниках Курил (NGS по участку V4 гена 16S rPHK, 2023 год).

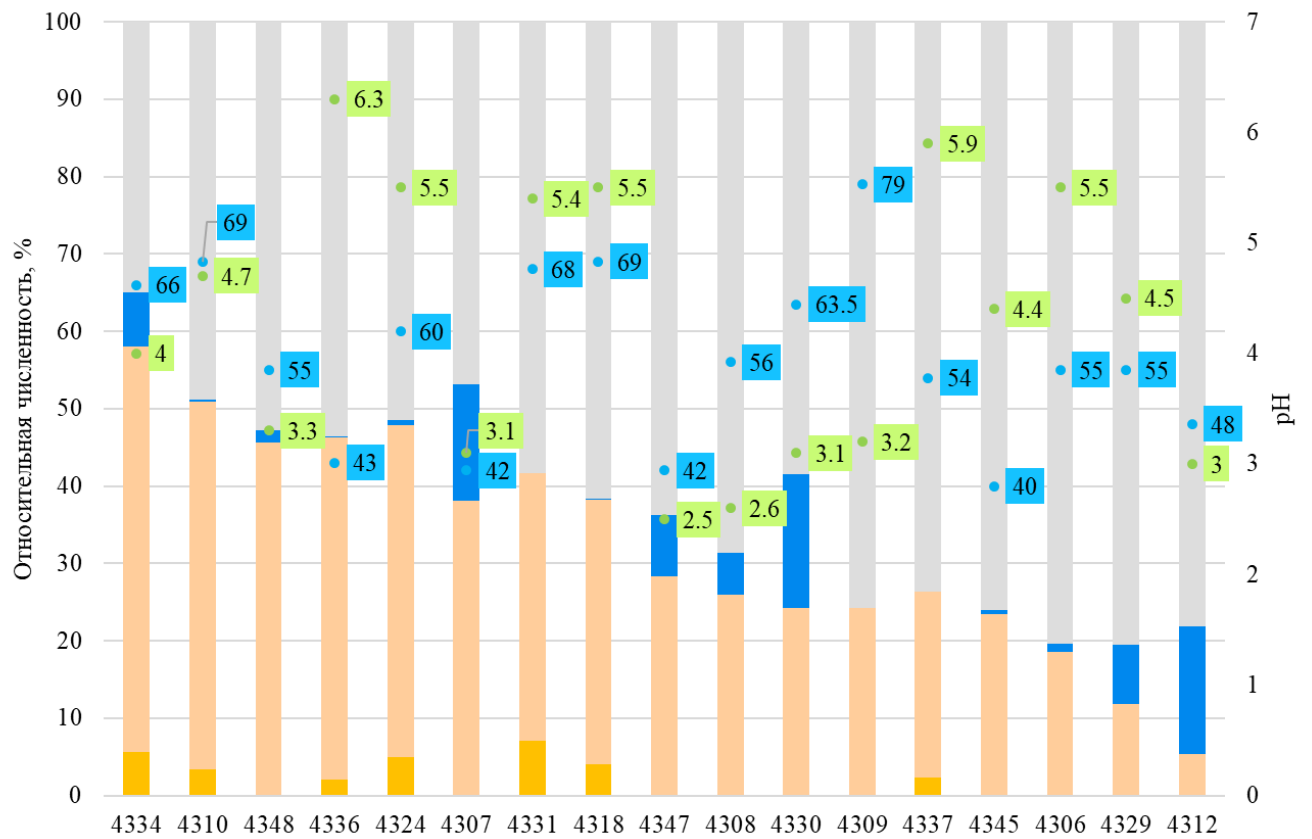
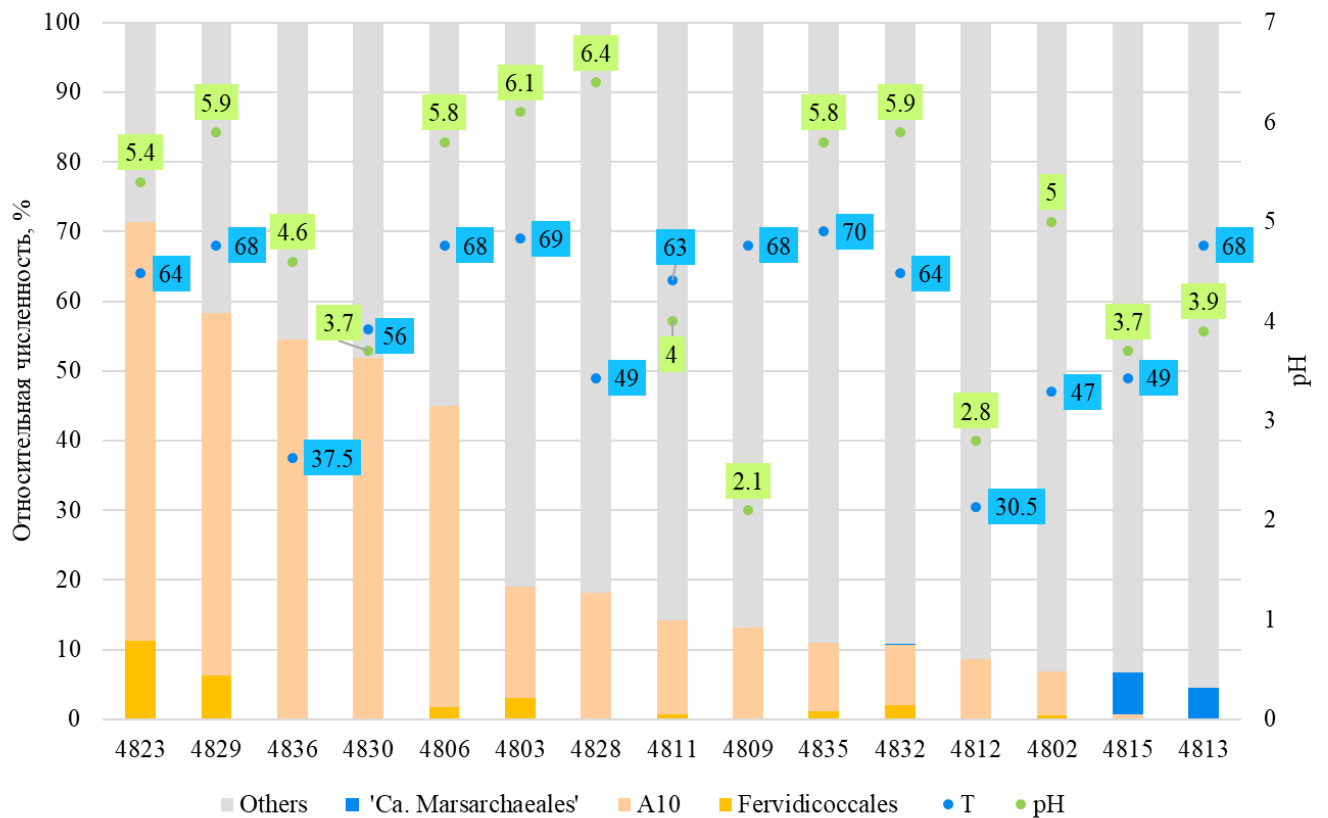
A**B**

Рисунок 14 – Относительная представленность целевых групп архей в горячих источниках Камчатки (NGS по участку V4 гена 16S rPHK). А – 2023 год, В – 2025 год.

Для подтверждения количественной представленности целевых групп архей был проведен точный учет численности с помощью метода кПЦР со специфическими праймерами для групп A10/ARK15 (*Thermolimicoccales*) и ‘*Ca. Marsarchaeales*’ (*Tardisphaerales*) на основе полученных чистых культур – ‘*T. acidophilus*’ АК-4214 и *T. saccharovorans* АК-3817 (их получение стало результатом данного диссертационного исследования, см. далее), а также *T. miroschnichenkoe* МР-3918 (первого представителя ‘*Ca. Marsarchaeales*’, выделенного Прокофьевой М.И.). Результаты показали, что NGS-данные хорошо согласуются с результатами кПЦР, а для группы A10/ARK15 было показано рекордное содержание в камчатском источнике 4836 (озеро Банное) – до 88% от всего сообщества (Рисунок 15, Рисунок 16). Последний факт также был подтвержден при помощи FISH (Рисунок 17).

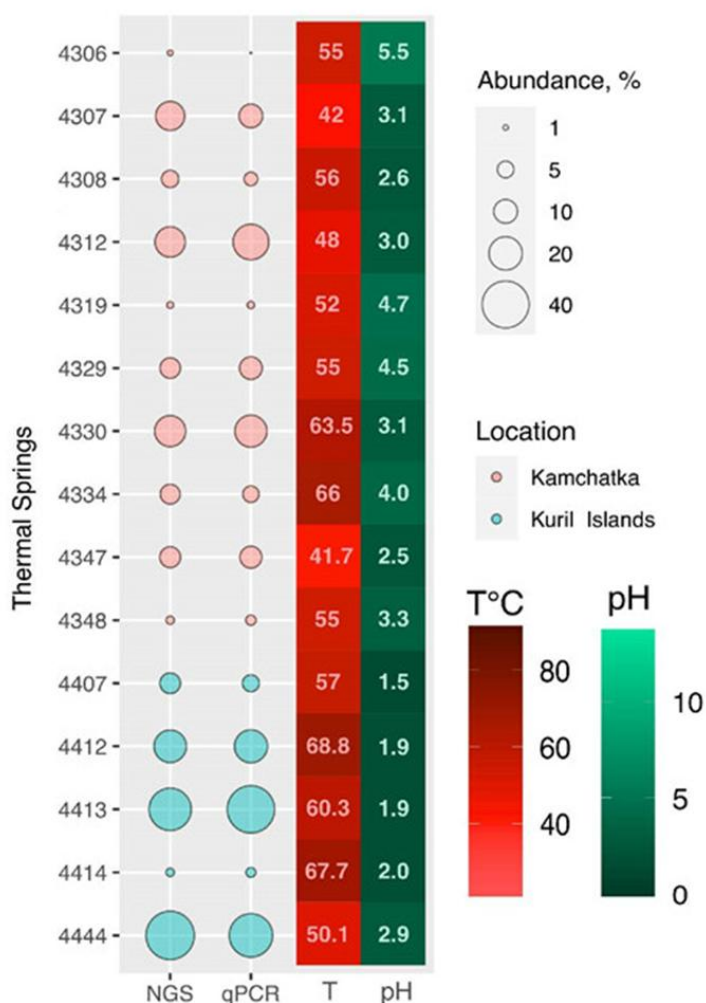


Рисунок 15 – Результаты кПЦР с праймерами на ‘*Ca. Marsarchaeales*’ в пробах с Камчатки и Курильских островов. Цитируется по [Prokofeva et al., 2025].



Рисунок 16 – Результаты кПЦР с праймерами на группу A10/ARK15 в пробах с Камчатки.

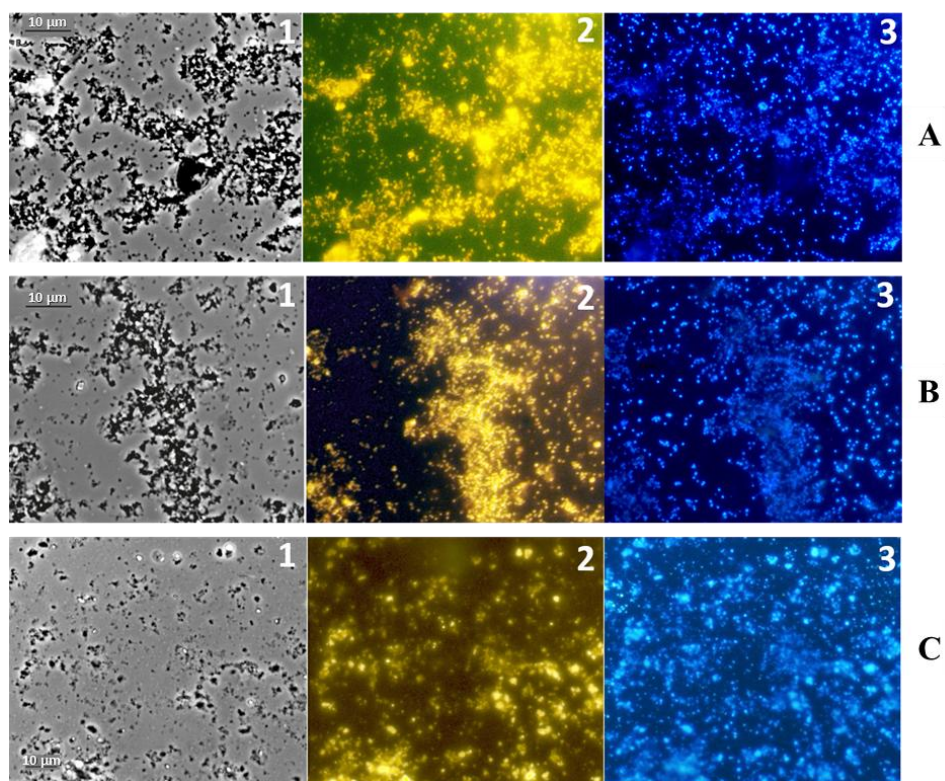


Рисунок 17 – FISH-микроскопия (А) штамма АК-4214 с универсальным зондом на архей и (В) специфическим зондом для группы A10/ARK15, а также (С) природной пробы 4836 озера Банное (Узон, Камчатка) со специфическим зондом для A10/ARK15. 1 – фазово-контрастная микроскопия подготовленного образца, 2 – гибридизация с зондом FISH, 3 – контрольное окрашивание ДАФИ. Шкала 10 мкм.

Как показали результаты данной части диссертационного исследования, на биоразнообразие горячих источников влияют комплексные физико-химические параметры, и, в наибольшей степени, уровень pH. Так, в источниках с более высокими температурами и низкими pH археи становятся доминантами (хотя и представленными меньшим, чем у бактерий, числом таксонов), что соответствует классическому представлению о том, что археи приобретают преимущество над бактериями при наличии агрессивных физико-химических факторов среды [Colman et al., 2018; Valentine, 2007].

Группы архей A10/ARK15 и ‘*Ca. Marsarchaeales*’ являются одними из наиболее многочисленных и широко представленных компонентов сообществ кислых горячих источников – до 88 и 42,5% соответственно. Это указывает на ключевые функции в природных сообществах, которые могут выполнять археи. Поэтому выделение чистых культур и описание их метаболических возможностей представляет собой важную задачу по выяснению их экологической роли в природе. В следующем подразделе диссертации будет описан процесс получения и описание чистых культур этих групп архей.

4.2 Получение чистых культур и фенотипическая характеристика архей глубоких филогенетических линий

4.2.1 ‘*Thermolimicoccus acidophilus*’ AK-4214

В экспериментах по накоплению архей группы A10/ARK15 исходили из того, что она доминирует в донных осадках источников, где доступ кислорода 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, сходных с природными, в присутствии S^0 , на длительный период инкубации (каждый пересев по 30–45 дней). Из субстратов были выбраны мальтоза, целлобиоза, крахмал, ксилан или пуллулан. По результатам микроскопии из хорошо растущих линий (предпочтение отдавали коккам, т.к. все культивируемые *Thermoplasmatota* являются кокками) выделяли ДНК для определения состава сообществ по участку V4 гена 16S рРНК, а затем корректировали условия культивирования. Так удалось

накопить целевую группу с 38% (в исходной пробе) до 98% (в V пересеве), переведя культуру 4214 с пуллулана на ксилан, снизив температуру с 60 до 50 °С и рН с 5,6 до 4,0. Изменения условий были необходимы для подавления сателлитных архей рода *Fervidicoccus*, хорошо растущих на пуллулане при 60 °С и рН 5,6. В среду также был добавлен ампициллин (10 мг/л) чтобы избавиться от бактерий рода *Desulfurella* и минорных групп бактерий. S^0 не исключали – без нее не происходило накопление кокков.

Из накопительной культуры, где доля A10/ARK15 составила 98%, провели серию предельных разведений до 10^7 раз на ксилане с S^0 , получив однородную культуру мелких ровных кокков, часто образующих скопления. Для выявления микроорганизмов-спутников клетки пересевали на богатую органикой среду (1 г/л ДЭ, глюкозы и пептона), инкубировали при различных температурах (37–47–50–60–70 °С). Результаты секвенирования подтвердили чистоту культуры – выделенный штамм был обозначен как АК-4214 (Рисунок 18).

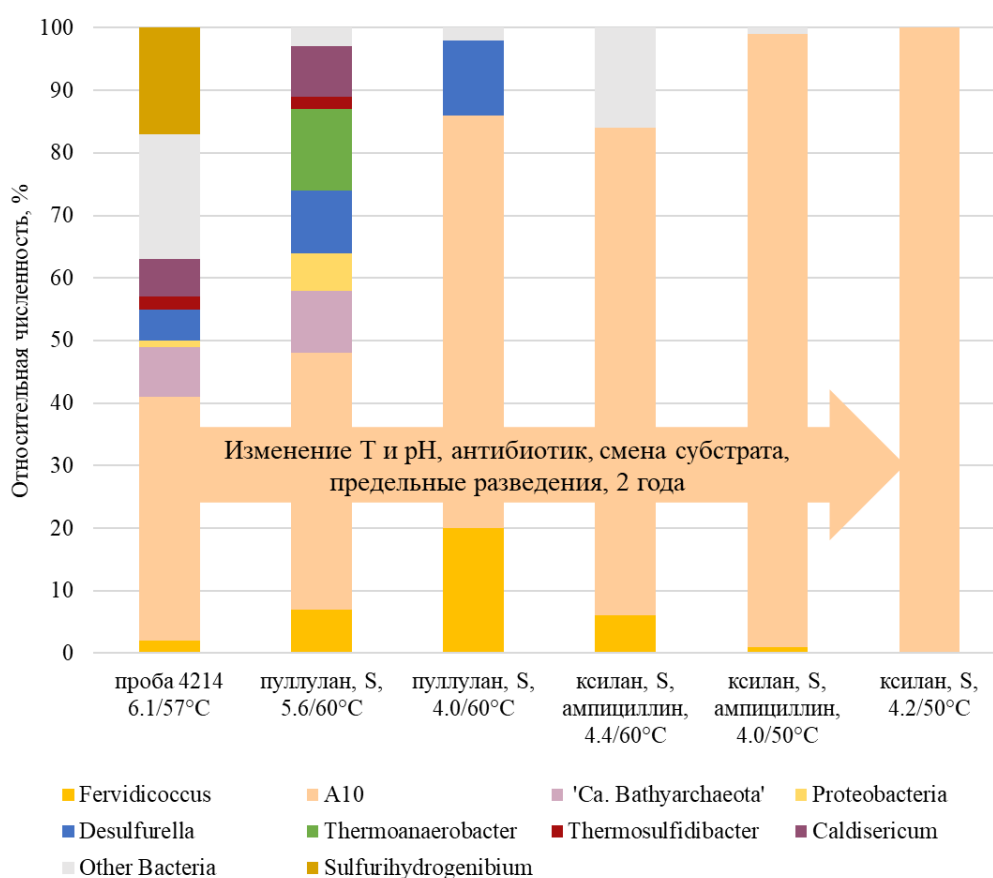


Рисунок 18 – Краткая схема получения чистой культуры A10/ARK15 штамм АК-4214 из природной пробы горячего источника Камчатки.

Клетки АК-4214 представлены ровными кокками диаметром 0,5–1 мкм, по одиночке или в агрегатах, с 1–2 протрузиями. Окружены толстой клеточной оболочкой неизвестного состава: лизоцим частично разрушает ее, но ванкомицин и пенициллин не ингибируют рост. Между этой оболочкой и мембраной наблюдается широкое периплазматическое пространство, в которое изнутри клетки выделяются везикулоподобные структуры (Рисунок 19). Найденные особенности морфологии являются необычными для архей, и их функции еще предстоит выяснить [Wolferen van et al., 2022].

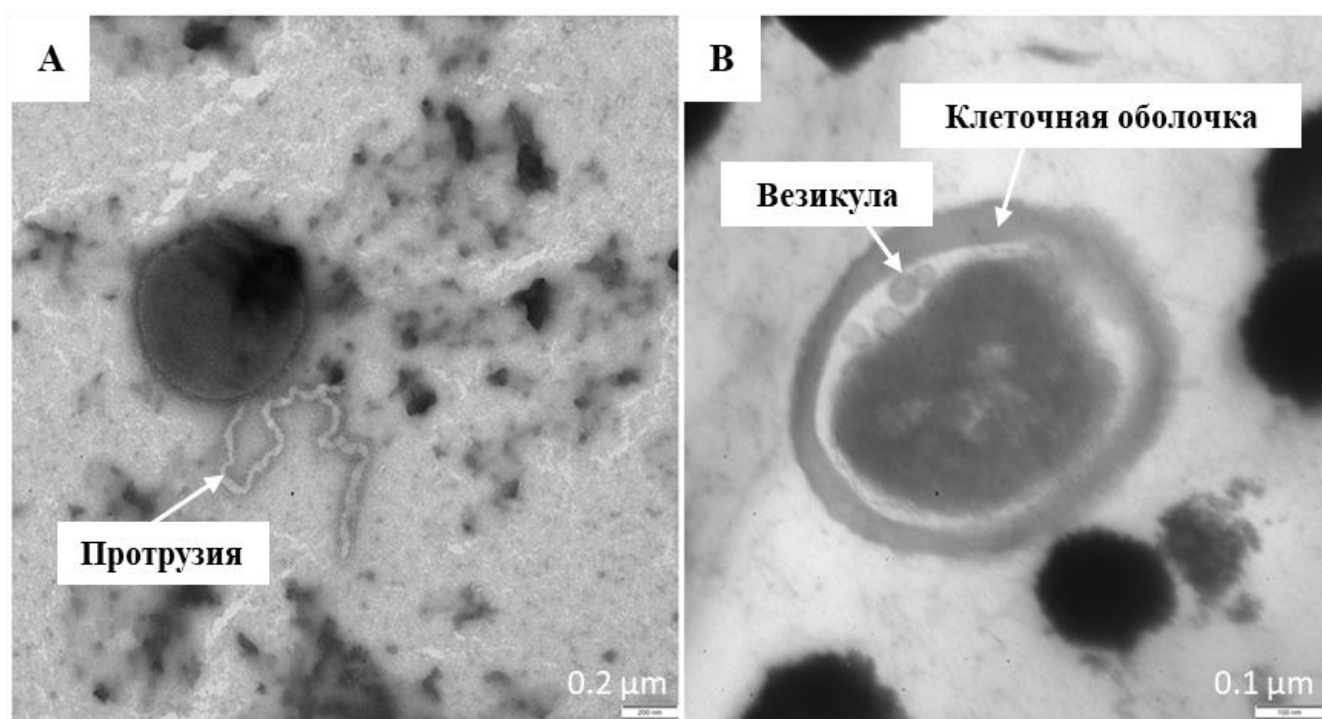


Рисунок 19 – Микрофотография клеток штамма АК-4214 (ТЭМ). А – негативное контрастирование, шкала 0,2 мкм, В – ультратонкий срез, шкала 0,1 мкм.

Анализ липидного профиля мембран штамма АК-4214 показал наличие мембрансвязывающих глицерол-диалкил-глицерол-тетраэфиров (GDGT), содержащих от 0 до 4 цикlopentanовых колец, следовых количеств археолов. Хиноны не были обнаружены.

Архея растет при 47–77 °С, оптимально при 70 °С, и pH диапазоне 3,4–6,4 с оптимумом 4,0 (Рисунок 20). Время удвоения на среде с пептоном в оптимальных условиях составляет 64 часа. По метаболизму штамм АК-4214 является

анаэробным хемоорганогетеротрофом, использующим белковые соединения (пептон, ДЭ, желатин) и некоторые углеводы (ксилоза, ксилан, трагакантовая и ксантановая камеди, карбоксиметилцеллюлоза), зависит от присутствия S^0 в среде, а также ДЭ в концентрации 0,05 г/л как добавочного фактора роста. При росте на ксилозе с S^0 образуется ацетат, изо-валерат, CO_2 , H_2S . Штамм не растет на мясном экстракте, белке пера, белке семян хлопка, альбумине, соевой муке, коже змеи, свиной щетине, казеине, пере, хитозане, МКЦ, галактоманнана, глюкозе, лигнине, камеди карайи, ламинарине, лихенане, N-ацетилглюкозамине, феруловой кислоте, маннозе, фруктозе, арабинозе, рибозе, трегалозе, лактозе, сахарозе, раффинозе.

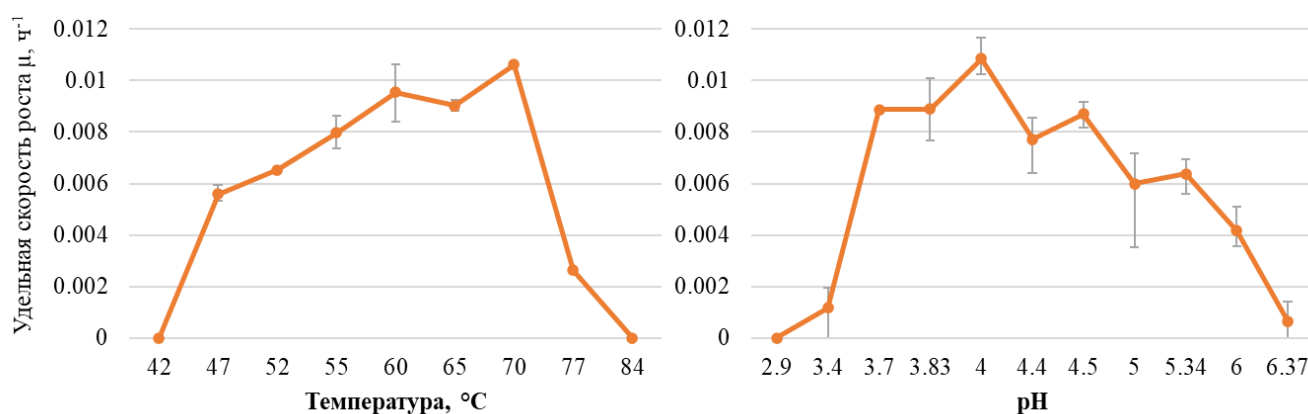


Рисунок 20 – Удельные скорости роста штамма АК-4214 при различных T и pH .

Фенотипическое описание штамма продолжается, предварительно можно предположить, что основной способ запасаения энергии для него – «облегченное» брожение со сбросом электронов на серу: при росте на пептоне с S^0 образовывалось всего 0,8 мМ сероводорода. В параллельных исследованиях генома штамма АК-4214 коллегами был найден ген КоА-зависимой НАД(Ф)-оксидоредуктазы и не обнаружено генов белков электрон-транспортной цепи, что подтверждает предположение об использовании брожения, а не дыхания.

Штамм АК-4214 является строгим анаэробом: не способен расти на аэробной среде, непродолжительное присутствие кислорода в атмосфере приводит к гибели клеток. Природные источники Камчатки, где археи этой группы встречаются в больших количествах, представляют собой крупные озера или маленькие, но

глубокие лужи, где пересыхание минимально, детектируется сероводород, и доступ кислорода в осадках, соответственно, очень мал, поэтому полученный результат является вполне закономерным (Рисунок 21).



Рисунок 21 – 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*, что указывает на принадлежность к глубокой филогенетической линии внутри филума *Thermoplasmatota*. Филогеномный анализ по набору «ar53» показал, что АК-4214 принадлежит глубокой линии архей A10/ARK15 на уровне нового порядка. Анализ по «ar122» репрезентативных MAGов архей класса *Thermoplasmata* (GTDB R226), а также MAGов хорошего качества (полнота >90%, контаминация <5%), относящихся к A10/ARK15, и полного генома АК-4214 подтвердил, что A10/ARK15 представляет собой новый порядок внутри класса *Thermoplasmata* (Рисунок 22), в который входит 3 рода и 7 видов. Первому представителю группы A10/ARK15, штамму АК-4214, было присвоено предварительное имя '*Thermolimicoccus acidophilus*' gen. nov. sp. nov., что означает «кокк из теплого кислого ила» (лат.). Соответственно, изолят относится к новому семейству '*Thermolimicoccaceae*' fam. nov. внутри нового порядка '*Thermolimicoccales*' ord. nov. филума *Thermoplasmatota*. Штамм АК-4214 является типовым, был депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номером VKM В-4012^T, а также в коллекции UNIQEM (UQM_42011).

Таким образом, был выделен и частично охарактеризован первый культивируемый представитель нового порядка архей '*Thermolimicoccales*', '*T. acidophilus*' АК-4214. Археи этого порядка являются одной из самых часто встречающихся и многочисленных групп прокариот в гидротермах Камчатки (до 88% от всего состава), Новой Зеландии и Китая [Qi et al., 2024; Sriaporn et al., 2023]. Вероятно, в этих сообществах они выполняют роли деструкторов белковых и углеводных соединений. Причины доминирования архей '*Thermolimicoccales*' пока не до конца понятны. Однако широкие температурный и pH-диапазоны роста (Рисунок 20) первого культивируемого представителя практически совпадают с параметрами источников, в которых детектируются археи нового порядка в больших долях (Рисунок 14). Это позволяют предположить высокую экологическую пластичность архей этой группы в природных условиях.

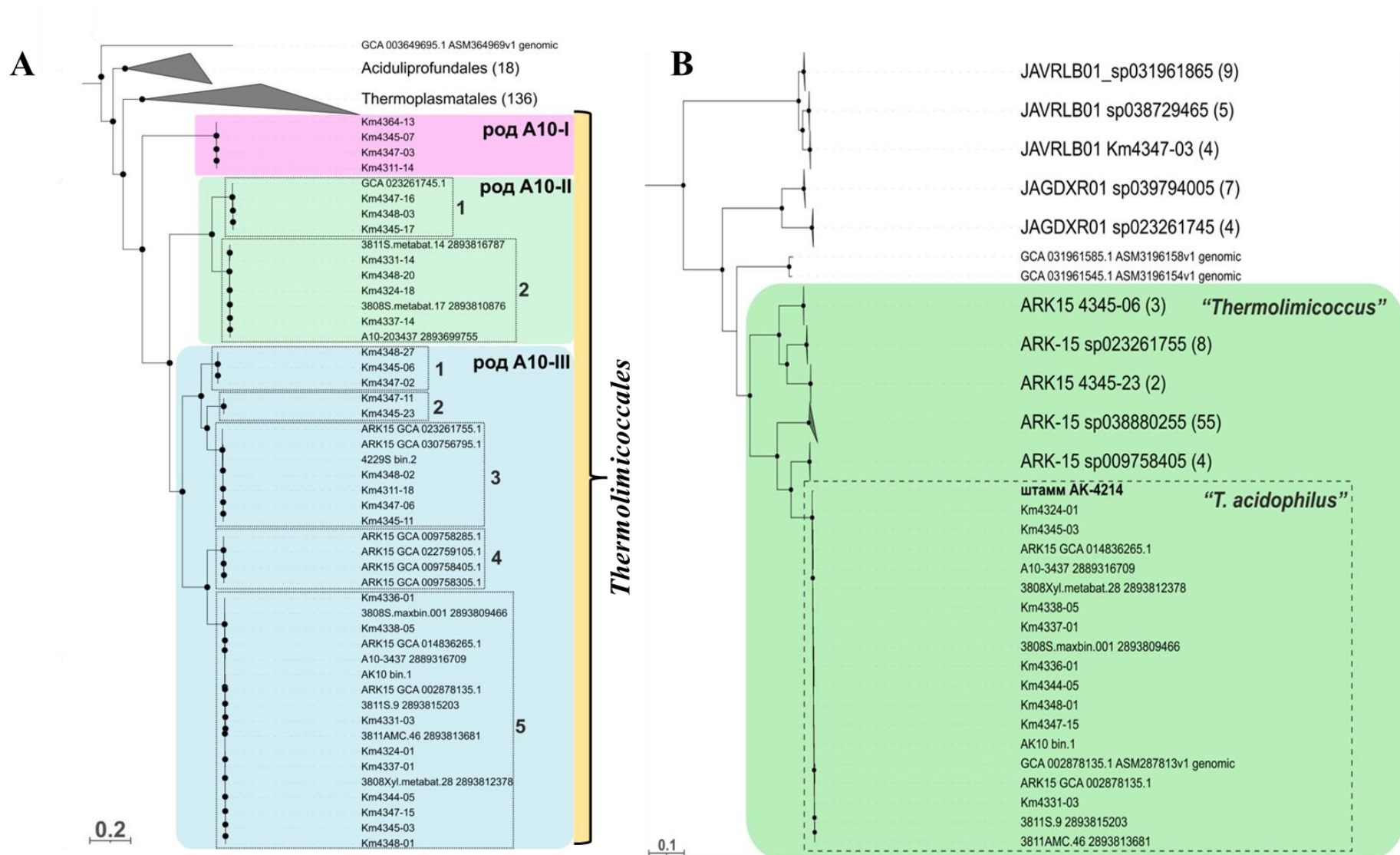


Рисунок 22 – Филогенетические деревья, основанные на сравнении белков из (А) набора «ar122» для композитных геномов архей A10/ARK15, и (В) набора «ar53», показывающее положение штамма АК-4214 внутри порядка A10/ARK15. Род, к которому относится штамм АК-4214, ограничен светло-зеленой рамкой, а вид – пунктирной линией. Метод построения – Approximately-Likelihood.

4.2.2 *Fervidicoccus fontis* 3639Fd

Результаты данного подраздела диссертации цитируются по статье автора [Карасева и др., 2021].

ДНК-ДНК-гибридизация *in silico* двух штаммов *Fervidicoccus* (типового Kam940^T и изучаемого в данной работе 3639Fd) показала сходство геномных последовательностей на 97,1%, что говорило о том, что изучаемый штамм не является самостоятельным новым видом. Однако 3639Fd был выделен на трибутирине (ТБ), ранее не известном как субстрат для представителей этого вида и рода, а также в целом для архей филума *Thermoproteota*. Поэтому были подробно исследованы его фенотипические характеристики, с акцентом на использование липидных субстратов.

Было показано, что штамм 3639Fd является умеренно ацидофильным хемоорганогетеротрофом. Диапазон температур для роста составил от 55 до 83 °С с оптимумом 70 °С, pH от 4,5 до 6,5 с оптимумом 5,6. Штамм использовал триглицериды и масла: ТБ, триолеин (ТО), моноолеин, кунжутное, хлопковое, подсолнечное масла; белковые соединения (триптон, казеин); оргкислоты (бутират, пируват, тартрат, пальмитат, стеарат) и углеводы (глюкоза, ксилоза, рамноза, мальтоза, сахароза, целлобиоза). S⁰ стимулировала рост. Штамм облигатно зависел от наличия в среде ДЭ как источника ростовых факторов – оптимальная концентрация для роста составила 0,1 г/л. Было показано, что рост штамма 3639Fd на ТБ сопровождается образованием бутирата, CO₂ и H₂ (Рисунок 23). Культура достигала максимального урожая клеток 2,1×10⁷кл/мл за 67 ч при оптимальных условиях (70 °С, pH 5,6, 0,1 г/л ДЭ). Минимальное время удвоения составляло 1,2 ч.

Типовой штамм Kam 940^T также был способен к росту на липидах (Рисунок 24). Еще один штамм 4215с, относящийся к *F. fontis*, выделенный автором на ксилане с серой при pH 5,6, 70 °С и CO₂ тоже проявил такое свойство, остальные штаммы *Fervidicoccus* sp. из лабораторной коллекции (FoA-16, 1507) не росли на липидных субстратах.

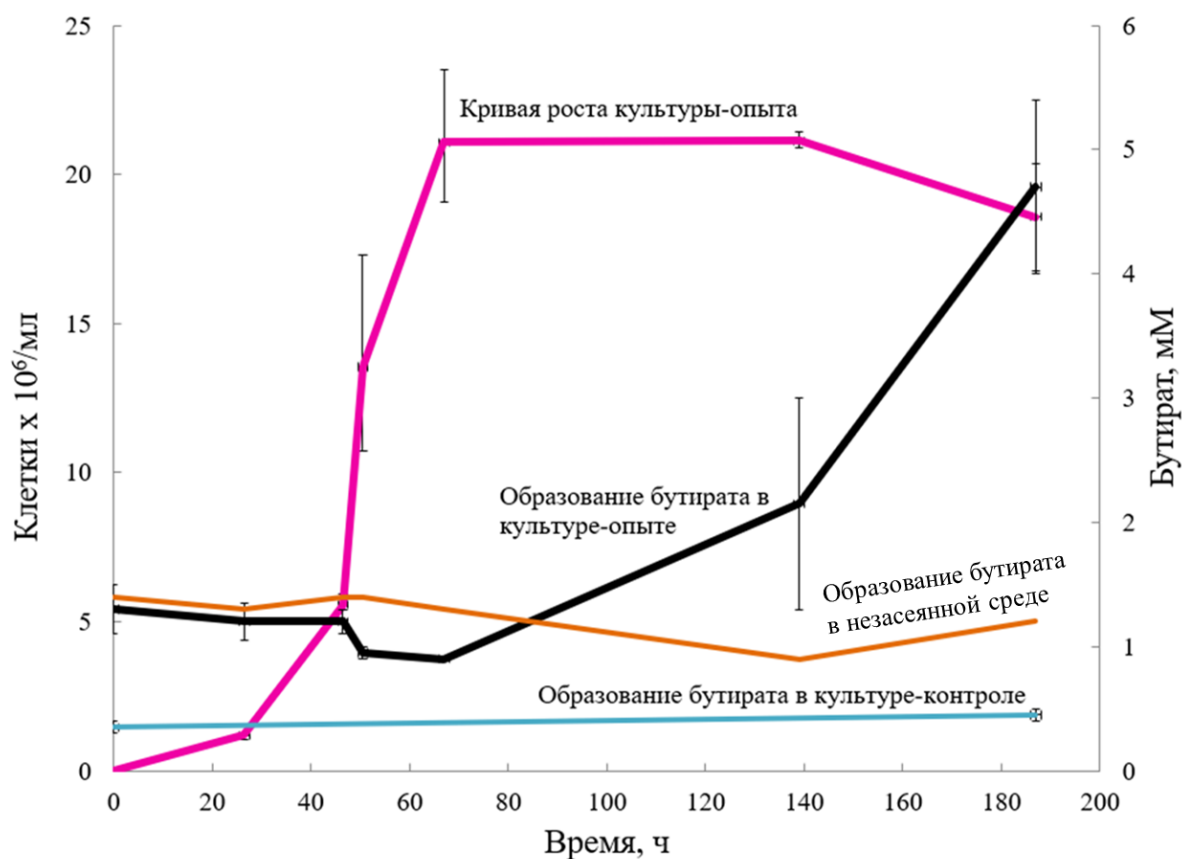


Рисунок 23 – Рост *F. fontis* 3639Fd и образование бутирата на ТБ в оптимальных условиях (рН 5,6, 70 °C). Контрольные образцы: незасеянная среда с ТБ и культура, выросшая на ДЭ (1 г/л). Цитируется по [Карасева и др., 2021] с изменениями.

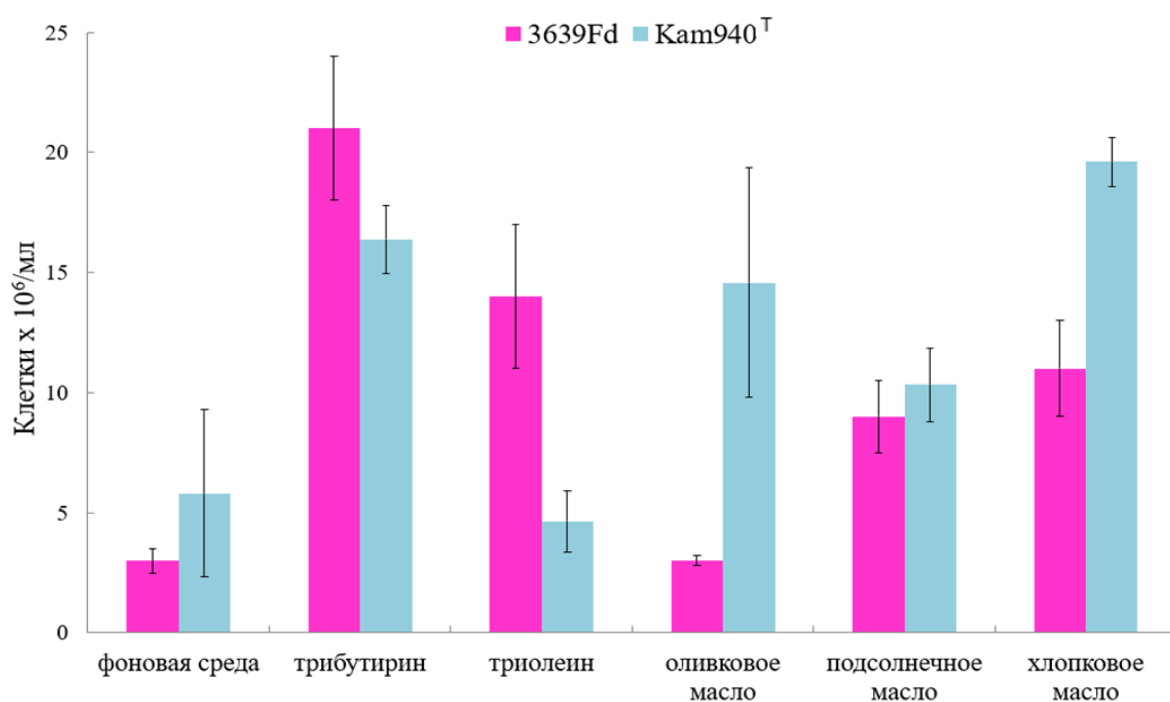


Рисунок 24 – Рост *F. fontis* Kam940^T и 3639Fd на липидных субстратах. Цитируется по [Карасева и др., 2021] с изменениями.

Таким образом, термоацидофильная архея *F. fontis*, представляющая единственный на сегодня вид порядка *Fervidicoccales* (филум *Thermoproteota*), способна гидролизовать широкий спектр липидных субстратов наряду с другими органическими соединениями. Рост на липидных субстратах ранее был показан только для *Thermococcus sibiricus* (филум *Methanobacteriota*, ранее *Euryarchaeota*) [Mardanov et al., 2009]. Таким образом, *F. fontis* является первым описанным представителем филума *Thermoproteota* (ранее *Crenarchaeota*), обладающим такой способностью. Это расширяет представления об экологической роли этого вида архей в микробных сообществах кислых горячих источников Камчатки, где они встречаются довольно часто в значительных количествах (до 10% от всего разнообразия), а также в источниках ЙНП, Исландии и Новой Зеландии [Perevalova, Lebedinsky, Bonch-Osmolovskaya, 2016].

4.2.3 *Tardisphaera saccharovorans* АК-3817

Материалы данного подраздела диссертации цитируются по статье автора [Prokofeva et al., 2025].

Образцы пробы воды и осадка из источника 3817 (кальдера Узон, Камчатка), где значительную долю сообщества занимали некультивируемые археи, инкубировали в течение 1 месяца в анаэробных условиях на среде Пфеннига с добавлением 0,05 г/л ДЭ в качестве источника ростовых факторов 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 или глюкоза) с CO_2 в газовой фазе, а также в автотрофных условиях (с H_2 и CO_2 в газовой фазе). В среду также добавляли антибиотики (ванкомицин, неомицин, канамицин, ампициллин или стрептомицин), чтобы подавить рост бактерий.

Через ряд последовательных 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 65 °C удалось получить устойчивое сообщество термофильных прокариот, где преобладали разнообразные кокки и крупные палочки. Профилирование ампликонов участка V4 гена 16S рРНК показало, что в

сообществе присутствуют 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.

Рост бактерий рода *Desulfurella* подавляли, изменяя температуру от 50 до 65 °C. Получив промежуточную культуру на глюкозе с ванкомицином при 60 °C с преобладанием кокков и небольшой примесью палочек, разделили их с помощью метода предельных разведений. Затем, для подавления роста архей рода *Thermoplasma* в культуры был добавлен новобиоцин, исключена S⁰, температура была поднята до 70 °C (поскольку археи данного рода чувствительны к этому антибиотику, нуждаются в сере и растут при более низких температурах [Seegerer, Langworthy, Stetter, 1988; Yamashiro, Yamagishi, 2005]). В качестве субстратов были использованы МКЦ, пуллулан, крахмал и глюкоза, а также поставлен контроль (без антибиотика, но с субстратом) чистой культуры *Thermoplasma* sp. штамм 3817, выделенной предельными разведениями из тех же накопительных культур. Это позволяло отследить различия в субстратных предпочтениях целевых архей со схожей морфологией. В результате, через 20 дней на пуллулане получили активный рост крупных неровных кокков (контрольная культура росла на этом субстрате слабо, и представляла собой скопления мелких ровных кокков).

После серии предельных разведений в 10⁷ раз в вышеописанных условиях в последнем разведении удалось получить активно растущую культуру кокков, вырастающих на 27 день инкубирования. Для проверки чистоты клетки были высеяны на богатую органикой среду с 1 г/л ДЭ и глюкозы и инкубированы при пониженных температурах (60 и 65 °C) для выявления *Thermoplasma*. Выросшая при 60 °C культура состояла из однородных кокков, а анализ состава сообщества подтвердил, что она является чистой. Штамм получил обозначение АК-3817 и, предварительно, был отнесен к глубокой филогенетической линии ‘*Ca. Marsarchaeales*’ (Рисунок 25). Штамм АК-3817 представлял собой неровные кокки размерами 0,4–1 мкм, покрытые S-слоем, с большим количеством нанокompартментов (НК) неизвестной функции (Рисунок 26).

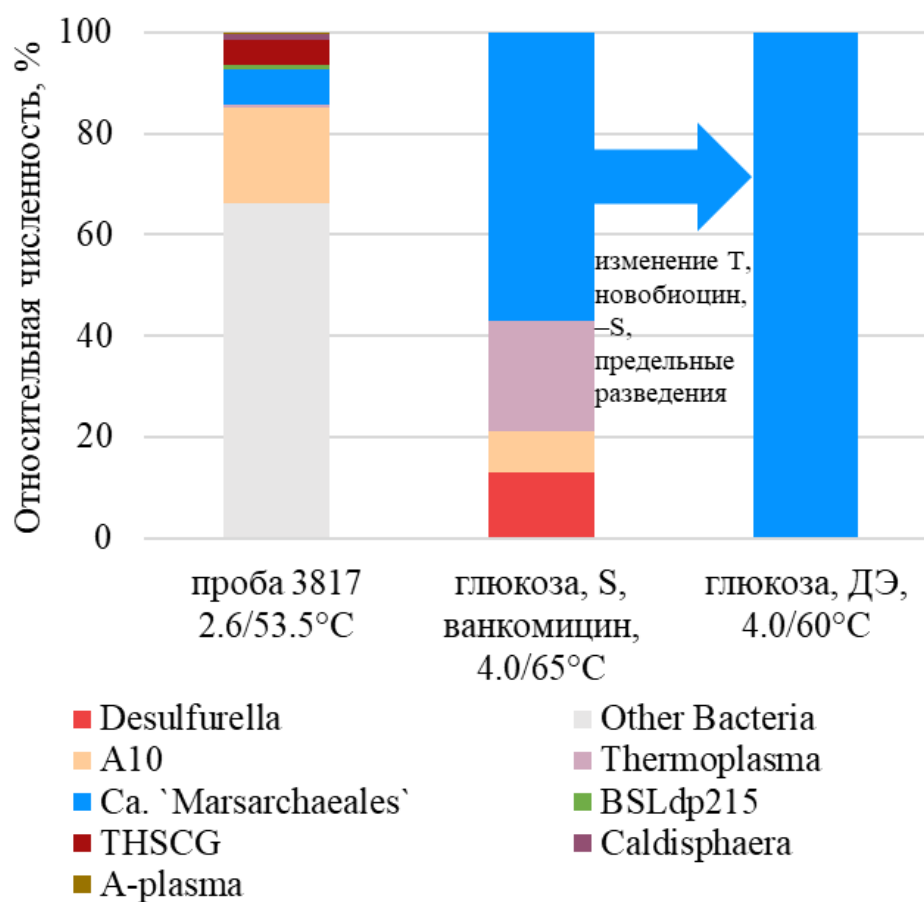


Рисунок 25 – Краткая схема получения чистой культуры штамма АК-3817 из природной пробы горячего источника Камчатки.

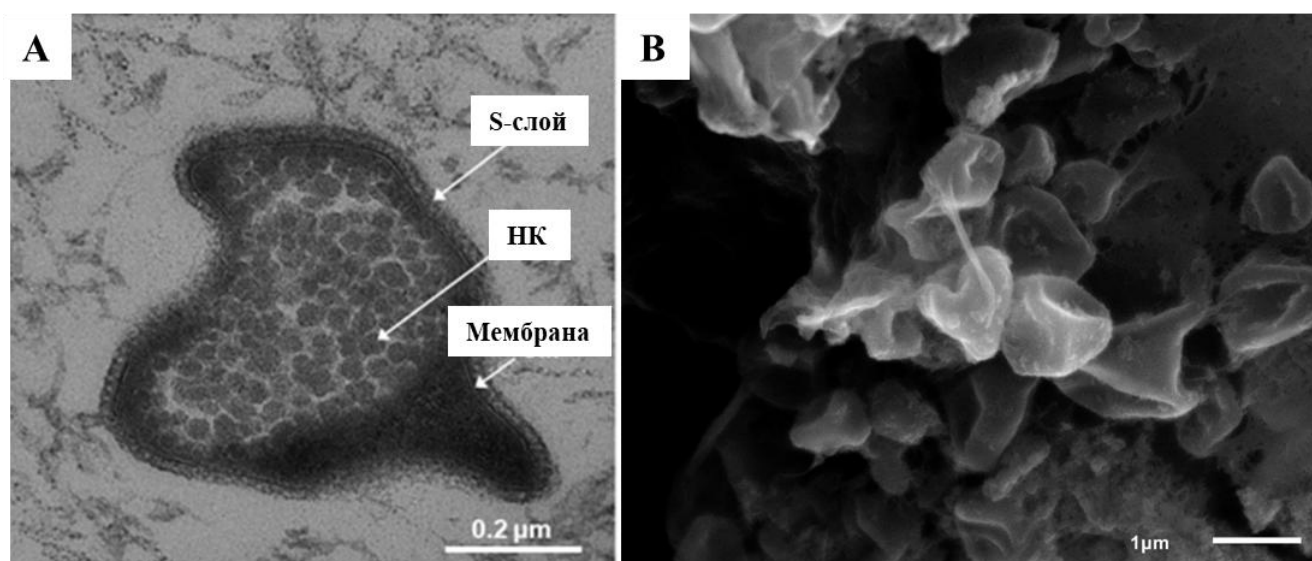


Рисунок 26 – Микроскопия клеток штамма АК-3817. А – ТЭМ, ультратонкий срез клетки, шкала 0,2 мкм, стрелками отмечены S-слой, мембрана и нанокомпартменты (НК). В – СЭМ, шкала 1 мкм. Цитируется по [Prokofeva et al., 2025], с изменениями.

Анализ липидного профиля мембран штамма АК-3817 показал наличие археолов (диэфиров дифтанил-глицерола) (около 43%) и GDGT (около 56%), содержащих от 0 до 4 цикlopентановых колец. Хиноны не были обнаружены.

В ходе фенотипического описания культуры АК-3817 было показано, что архея является строго анаэробным термоацидофильным хемоорганогетеротрофом. Диапазон температур для роста составляет 37–75 °C с оптимумом при 65 °C, диапазон pH 3,0–4,7 с оптимумом при 4,1. Минимальное время удвоения клеток составляет 52 часа при росте в оптимальных условиях на галактоманнане с S⁰ (Рисунок 27).

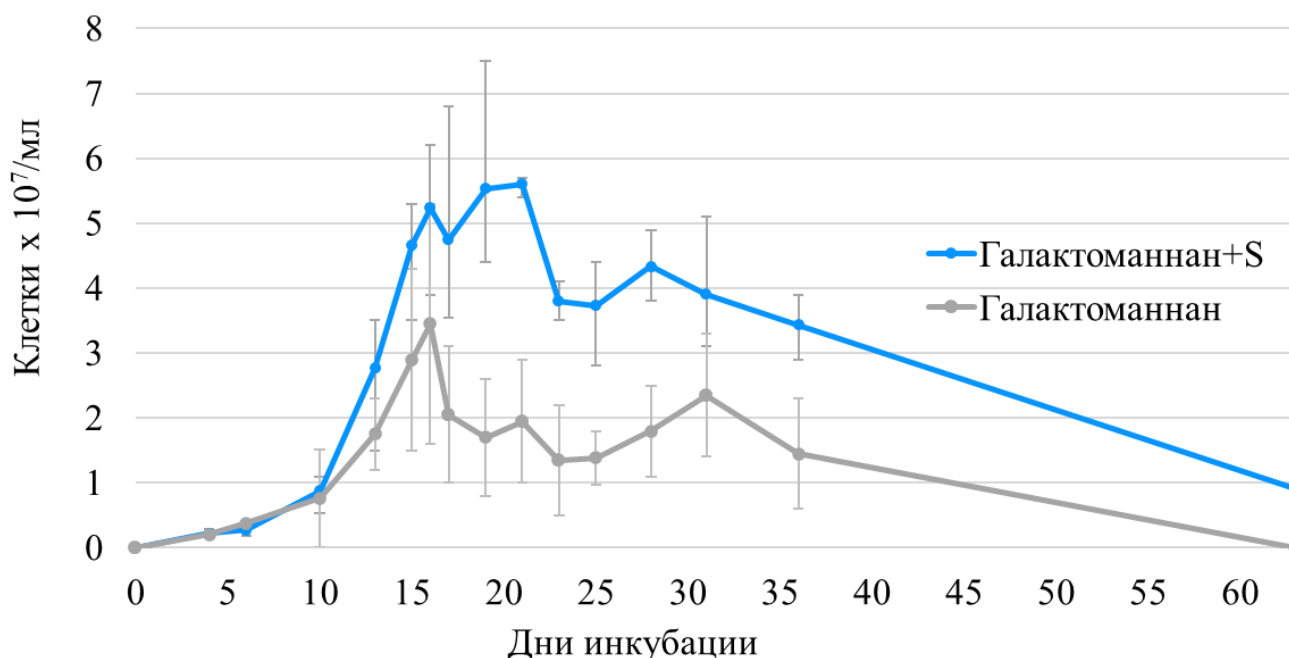


Рисунок 27 – Кривая роста штамма АК-3817 в оптимальных условиях (65 °C, pH 4,1) на галактоманнане в присутствии или отсутствии элементарной серы. Цитируется по [Prokofeva et al., 2025], с изменениями.

При росте с 1 г/л мальтозы с добавлением S⁰ основными продуктами метаболизма были ацетат, этанол и CO₂. Образование небольшого количества H₂S (1,6 мМ) говорит о возможности «облегченного» брожения (это подтверждается наличием в геноме штамма гена КоА-зависимой НАД(Ф)-оксидоредуктазы, а также отсутствием генов белков электрон-транспортной цепи).

Штамм АК-3817 не рос на среде без восстановителя (Na₂S) и не проявлял способности к использованию акцепторов электронов для анаэробного дыхания, к

автотрофному и карбоксидотрофному росту, а также к окислению соединений железа.

Несмотря на невозможность роста в условиях с пониженным содержанием кислорода (2%) в газовой фазе, уже выросшие в оптимальных (анаэробных) условиях клетки штамма были способны переживать до 7 дней инкубирования с воздухом в газовой фазе, не теряя способности к пересеву. Это согласуется с естественными условиями обитания в горячем источнике – неглубокой луже, которая периодически пересыхает (Рисунок 28). Параллельные исследования генома чистой культуры подтвердили полученный результат – были найдены гены нескольких систем защиты от кислородного стресса.

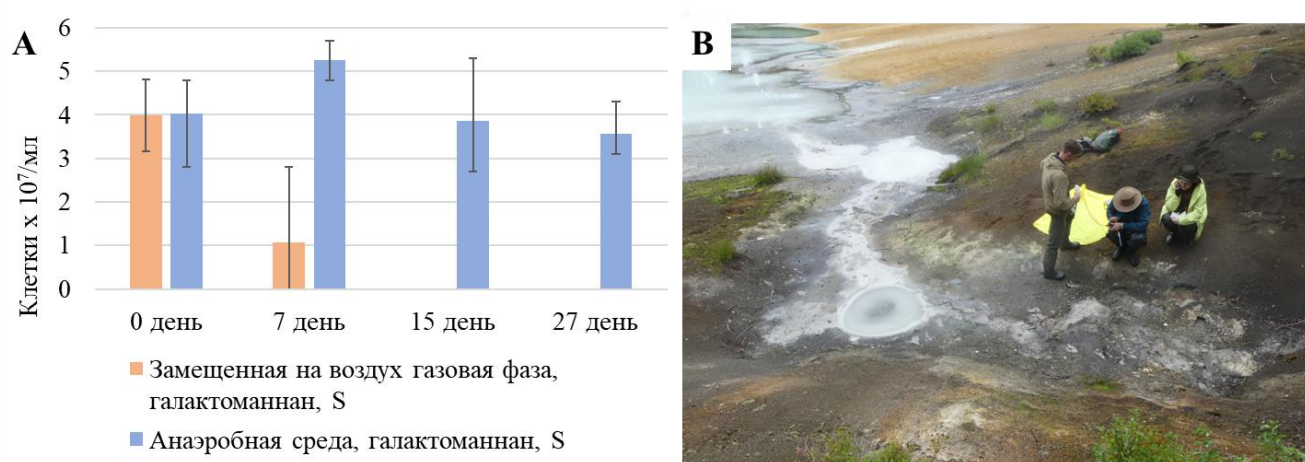


Рисунок 28 – Результаты проверки способности роста штамма АК-3817 переживать кислородные условия (А), которые могут возникать в природном источнике 3817 (В).

Штамм АК-3817 был способен сбраживать широкий спектр органических соединений: большую часть из них представляли моно-, ди- и, в особенности, полисахариды различной структуры и происхождения (Рисунок 29). Данная фенотипическая особенность подтверждалась и анализом генома, где были найдены гены сразу трех путей метаболизма сахаров (Энтнера-Дудорофа, Эмбдена-Мейергофа-Парнаса и пентозофосфатного пути) и большое количество генов гликозилгидролаз (GH). Штамм не рос на хитине, этаноле, желатине, триптоне, пептоне, соевой муке, мясном экстракте, кератине, ацетате, пирувате, формиате, рибозе, арабинозе, камеди рожкового дерева, гуаровой камеди,

трагакантовой камеди, рамногалактуронане, альгинате, пектине, пахимане, ксилоглюкане, арабиногалактане, лигнине, агарозе, карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), аморфной целлюлозе, шроте подсолнечника, сене, кукурузных и бамбуковых листьях, еловых опилках, курдлане, арабинане, нефти, ТБ и ТО.

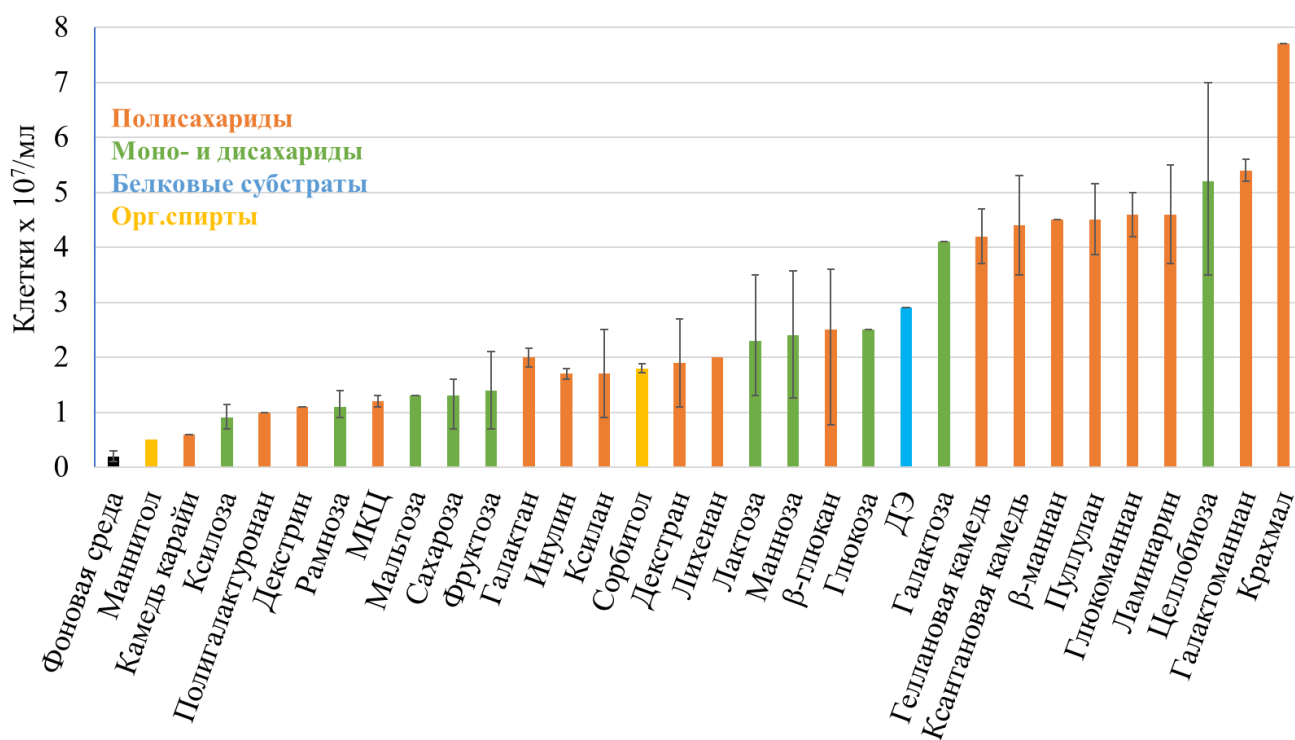


Рисунок 29 – Рост штамма AK-3817 на различных органических субстратах.

Последовательность гена 16S рРНК по BLAST составила <85% сходства с ближайшими культивируемыми видами класса *Thermoprotei*, что указывает на принадлежность штамма AK-3817 к глубокой филогенетической линии внутри филума *Thermoproteota*. Для определения точного положения провели анализ на основе набора маркеров «ar53». Установлено, что штамм относится к уровню нового класса внутри филума *Thermoproteota*. Стоит отметить, что данная клада включила в себя и архей, ранее описанных по MAG как ‘*Ca. Marsarchaeota*’ [Jay et al., 2018].

Вместе с другим представителем этой линии, штаммом MP-3918, выделенным и параллельно описываемым сотрудницей лаборатории М.И. Прокофьевой, штамм AK-3817 образует отдельный новый род, включающий два

вида. Из-за длительной фазы инкубирования и предпочтения углеводных субстратов штамм АК-3817 получил название *Tardisphaera saccharovorans* sp. nov. (от лат. – «медленный шар, поедающий сахар») и является типовым штаммом вида. Штамм АК-3817 был депонирован в ВКМ под номером VKM В-3679^T, а также в коллекциях UNIQEM (UQM_41551) и Общей коллекции микробиологических культур Китая 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 АК-3817 (Рисунок 30). Также в этот класс вошли некультивируемые археи группы ‘*Ca. Geoarchaeales*’.

Стратегия архей рода *Tardisphaera* запасать энергию через брожение на полисахаридных субстратах делает их уникальными среди термоацидофильных прокариот – все известные к этому моменту культивируемые археи и бактерии, оптимально растущие при пониженных значениях pH, используют аэробное или анаэробное дыхание, которое является более энергетически выгодным [Colman et al., 2018]. Число используемых углеводных субстратов (в особенности, полисахаридных) для роста также является рекордно высоким среди ацидофилов: на сегодняшний день известно лишь, что некоторые ацидофильные гипертермофильные археи родов *Acidilobus*, *Caldisphaera* и *Saccharolobus*, запасаящие энергию за счет аэробного/анаэробного дыхания, способны разлагать небольшое количество таких соединений, например 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].

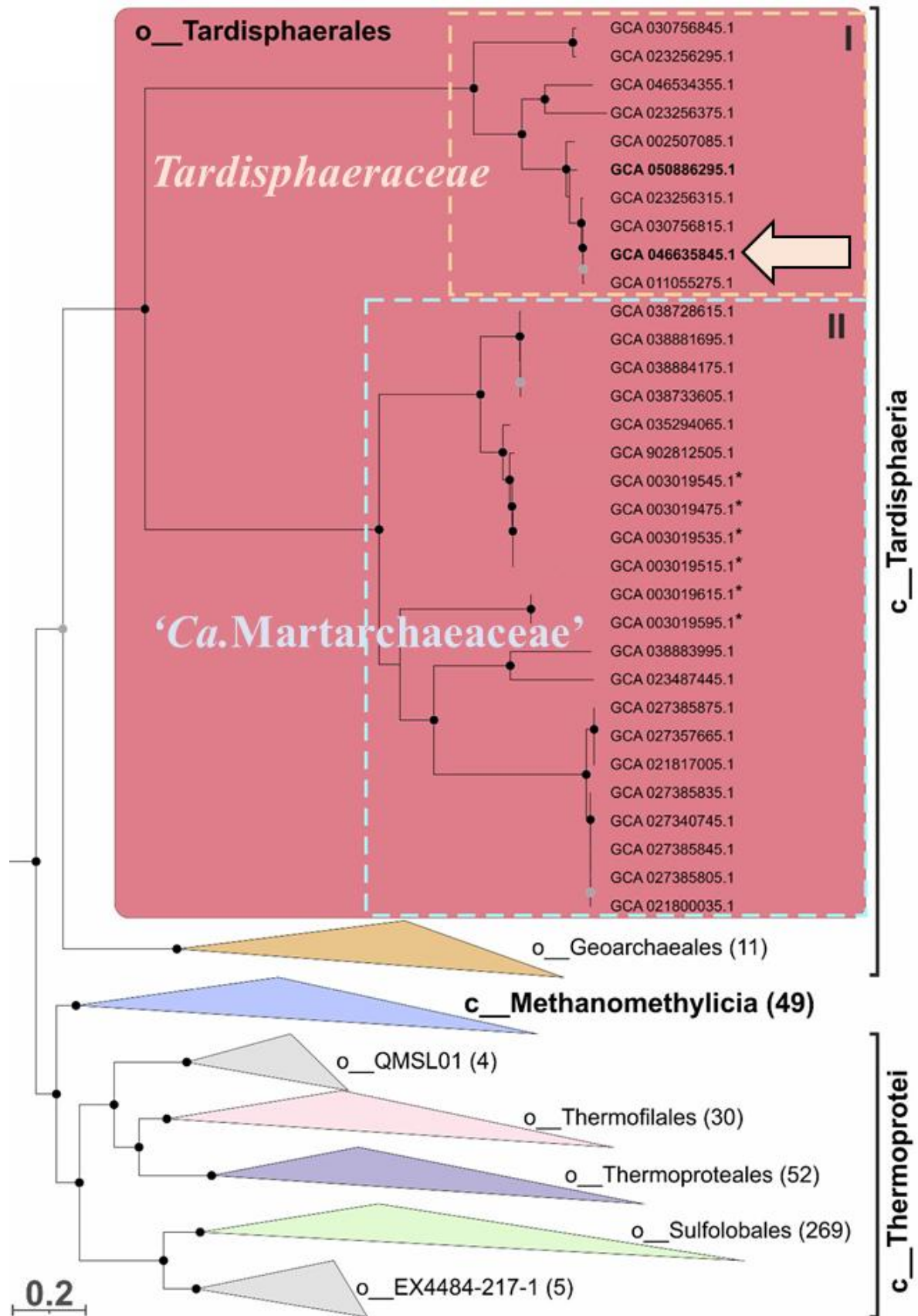


Рисунок 30 – Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия по набору «ar53» для архей рода *Tardisphaera*. Стрелкой отмечено положение штамма *T. saccharovorans* AK-3817, звездочками помечены MAG, проанализированные в работе [Jay et al., 2018]. Черные точки в узлах деревьев показывают значение бутстрап более 95%, серые – от 90 до 94%. Цитируется по [Prokofeva et al., 2025], с изменениями.

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% от всего состава) в микробных сообществах осадков кислых горячих источников Камчатки, а также гидротермах Японии, Китая, Тайваня, Новой Зеландии, Италии и ЙНП. 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 крахмальной промышленности [Girfoglio, Rossi, Cannio, 2012; Straub et al., 2018; Wang et al., 2020].

4.3 Свойства и биотехнологический потенциал исследуемых термофильных архей

4.3.1 Эстеразная и липазная активность *Fervidicoccus fontis*

В геноме штамма *F. fontis* 3639Fd (no. JADEZV000000000.1) был обнаружен ген α/β -гидролазы 6 семейства (MBE9391013.1), ближайшими охарактеризованными гомологами которой являются различные гидролазы, включая моноацилглицерол-липазы из эукариот (процент сходства аминокислотной последовательности ~30–33% при покрытии ~60%), расщепляющие сложные эфиры карбоновых кислот (КФ 3.1.1.x). При выравнивании последовательности данной α/β -гидролазы с представителями 15 семейств эстераз был определен ее каталитический мотив – GASMGG, который соответствует семействам III и V эстераз. Ближайшими гомологами являются неохарактеризованные α/β -гидролазы архей, включая и белок из типового штамма *F. fontis* Kam940^T.

С помощью онлайн-инструментов были предсказаны некоторые характеристики целевого белка: молекулярная масса 23 кДа, изоэлектрическая точка рН 6,3. В последовательности имеется гидрофобный участок длиной примерно 40 аминокислотных остатков, сигнальный пептид обнаружить не удалось.

При уточнении филогении выяснилось, что ближайшими охарактеризованными ферментами с эстеразными активностями являются белки представителей термофильных архей родов *Pyrobaculum*, *Picrophilus*, *Sulfolobus* (Рисунок 31) [Arpigny, Jendrossek, Jaeger, 1998; Hess, Katzer, Antranikian, 2008; Shao, Xu, Yan, 2014]. Согласно литературным источникам, ферменты данных архей проявляют активность только относительно субстратов с короткими цепями жирных кислот (C_2 – C_4), что говорит об их принадлежности к эстеразам, но не липазам. Ближайшими охарактеризованными липазами являются ферменты мезофильных бактерий родов *Psychrobacter* и *Moraxella* [Arpigny, Feller, Gerday, 1993; Feller et al., 1991].

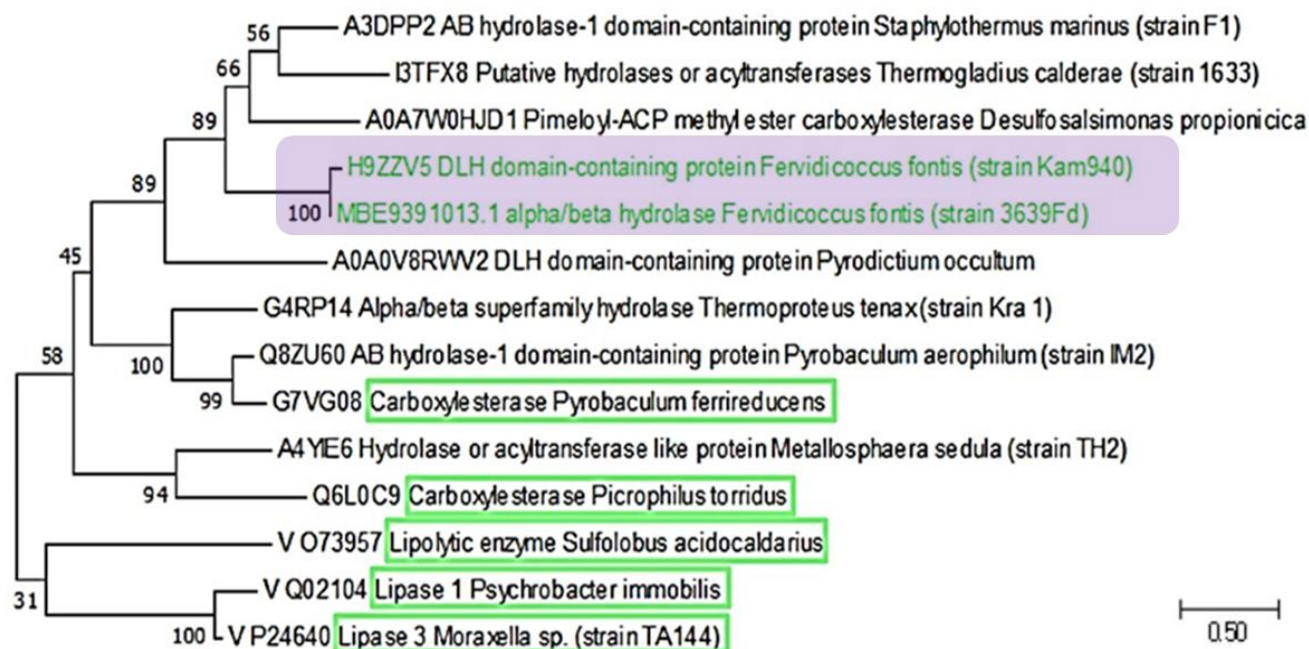


Рисунок 31 – Филогенетическое дерево предполагаемой липазы *F. fontis* (зеленый шрифт, серая рамка). Зелеными рамками выделены ближайшие охарактеризованные эстеразы архей и бактерий. Дерево построено в программе MEGA 7 с применением метода Maximum-Likelihood и модели Джонсона-Тэйлора-Торнтонна.

При определении нативной активности эстераз и липаз термофильной археи *F. fontis* 3639Fd качественным методом активность наблюдали во фракции связанных с клеткой белков (ФСКБ). Наилучшими детергентами для получения этой фракции были Triton X100 (с избавлением от детергента на центриконах), и CHAPS (он позволял визуализировать результат без дополнительных шагов).

Эстеразная активность после двух дней инкубации наблюдалась во ФСКБ с клеток, выросших на ТБ, но не на глюкозе, что говорит об индуцибельности выработки этих исследуемых карбоксилэстераз. Для проверки активности использовали чашки с ТБ (Рисунок 32, А). 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. В контрольных образцах свечения не было (Рисунок 32, В).

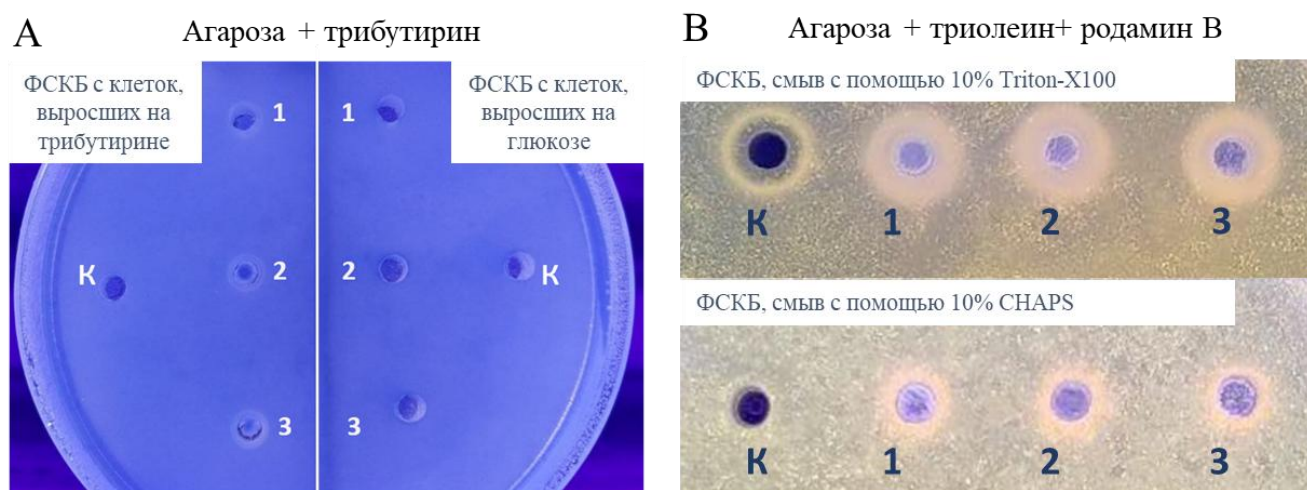


Рисунок 32 – Определение нативной эстеразной активности 3639Fd и индуцибельности/конститутивности фермента (А) и нативная липазная активность 3639Fd (В). 1, 2, 3 – ФСКБ (в трех повторностях), К – контроль (инкубированная незасеянная обработанная среда).

Нативная индуцибельная эстеразная и липазная активности фракций связанных с клеткой белков *F. fontis* 3639Fd свидетельствует об активном функционировании генов, кодирующих эти ферменты, что подтверждает способность данной археи к росту на липидных субстратах различной длины жирнокислотной цепи. Липазная активность, наблюдаемая для данного фермента, 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.

4.3.2 Активность рекомбинантных гликозидаз архей *Tardisphaera*

В геноме штаммов *T. miroshnichenkoe* MP-3918 и *T. saccharovorans* AK-3817 коллегами было найдено большое количество генов гликозидаз, что коррелировало с возможностью этих архей расти на широком спектре полисахаридов. Основное внимание в этой работе было уделено семействам GH, участвующим в гидролизе разветвленных полисахаридов. Для получения рекомбинантных ферментов были выбраны 4 гена гликозидаз (два из семейства GH12: PRZ02_06100, PRQ610_06305, два из семейства GH50: PRZ02_05685, PRQ610_06715). Выбор был обусловлен тем, что именно в этих семействах описано малое количество ферментов, выделенных из архей (GH12), или они отсутствуют совсем (GH50). Семейство белков GH12 имеет эндоглюканазную активность и 95 биохимически охарактеризованных ферментов, из которых 7 принадлежат археям. Для GH50 известны агаразная и галактозидазная активности и все 40 описанных биохимически ферментов принадлежат только бактериям (<https://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>, дата обращения 19.05.2026).

Филогенетический анализ показал, что белки архей *Tardisphaera* семейства GH12 относятся к термо- и гипертермофильным эндоглюканазам, а GH50 удалены от описанных гомологов и формируют группу вместе с предполагаемыми β -галактозидазами и охарактеризованной β -1,3-эндоглюканазой (Рисунок 33, Рисунок 34).

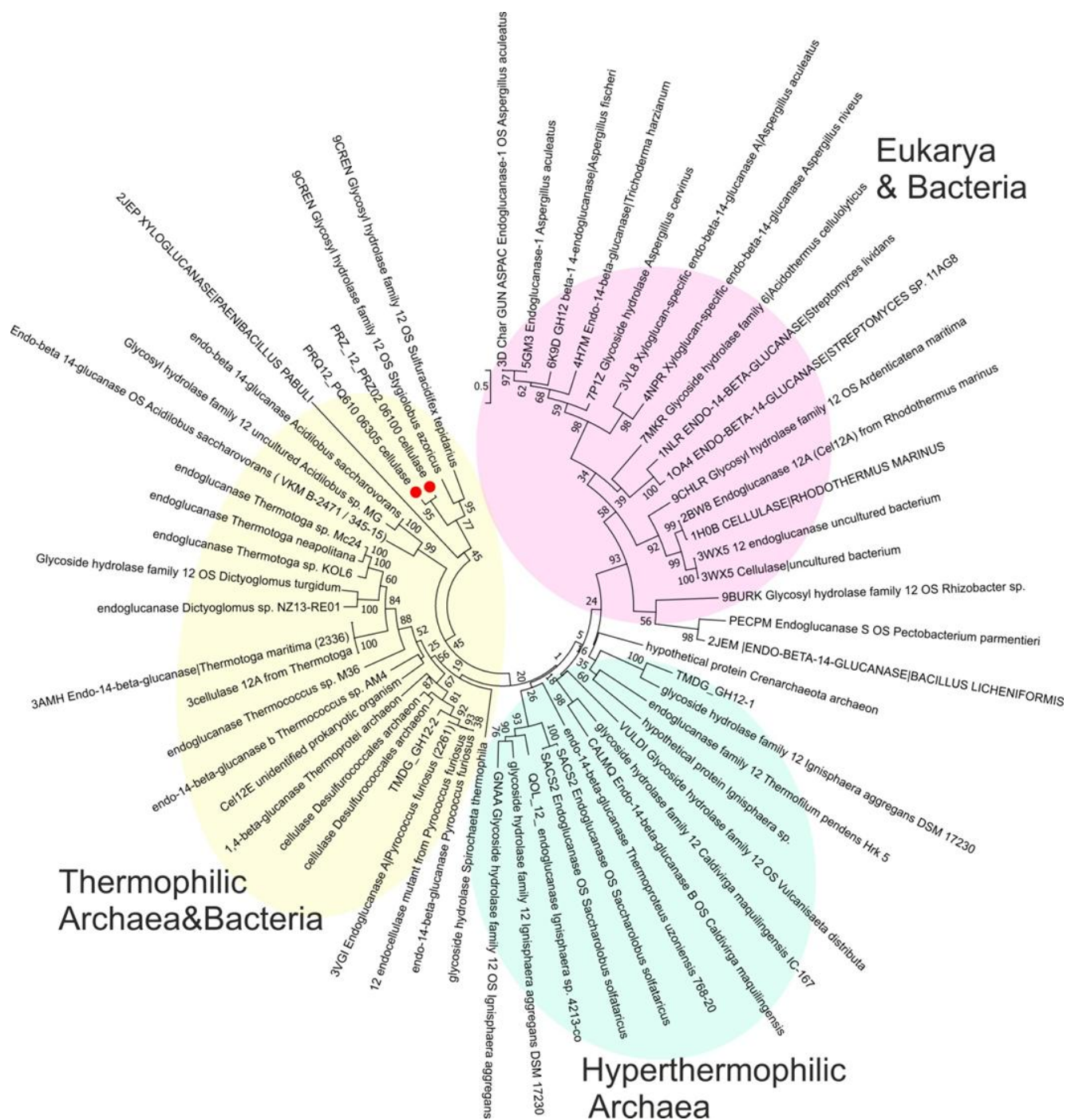


Рисунок 33 – Филогенетическое дерево семейства GH12. Красными точками отмечены белки, обнаруженные у *T. miroshnichenkoae* MP-3918 и *T. saccharovorans* AK-3817. Розовый цвет – кластер белков из эукариот и бактерий, зеленый – эндоглюканаз из гипертермофильных архей, желтый – кластер ферментов из термофильных архей и бактерий. Дерево построено в программе MEGA 10 с применением метода Maximum-Likelihood и модели Джонсона-Тэйлора-Торнтон.

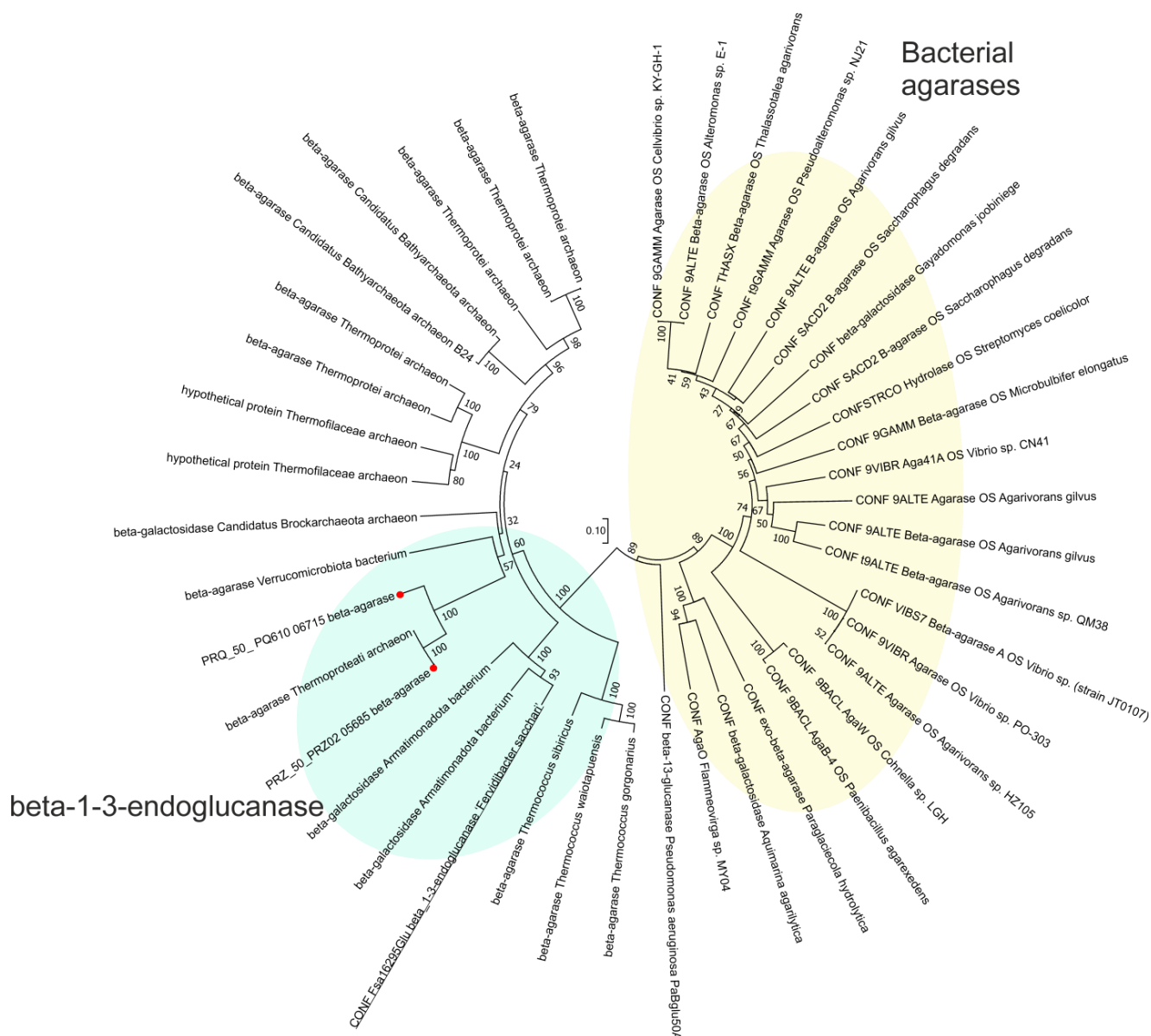


Рисунок 34 – Филогенетическое дерево семейства GH50. Красными точками отмечены белки, обнаруженные у *T. miroshnichenkoae* MP-3918 и *T. saccharovorans* AK-3817. Цветными зонами отмечены кластеры белков с разными активностями. Зеленый – кластер β -галактозидаз, желтый – агараз из морских бактерий. Дерево построено в программе MEGA 10 с применением метода Maximum-Likelihood и модели Джонсона-Тэйлора-Торнтонна.

Нам удалось получить 3 рекомбинантных белка (условно обозначенные по названию гена и номеру семейства как PRQ50, PRQ12 из *T. miroschichenkoae* и PRZ50 из *T. saccharovorans* соответственно). Качественная проверка активности на агарозных чашках с β -глюканом в качестве субстрата выявила слабые зоны гидролиза для всех фракций после очистки на Ni-агарозной самотечной колонке (клеточного осадка, бесклеточной жидкости, фракции «flow through», фракций 50-500 мМ имидазола). В реакциях с β -глюканом и лихенаном (3 мг/мл) при значениях

pH 3–6 и температурами 55 и 83 °C в течении 38 ч наибольшую ферментативную активность среди всех тестируемых белков (50 мкг/мл) показал PRQ50. Его удельная активность по отношению к лихенану составила 37–42 мкг редуцирующих сахаров/мг белка*ч в диапазоне pH от 3,5 до 6 при 83 °C. Поэтому PRQ50 был выбран для дальнейшей характеристики.

Очистка бесклеточного экстракта на FPLC AktaStart позволила получить фракцию белка с концентрацией 910 мкг/мл. Расчетное значение изоэлектрической точки белка составило 5,25, а молекулярная масса 41362,51 Да. При проведении электрофореза в денатурирующих условиях детектировали полосы целевого размера, а также яркие полосы предположительно образующегося димера белка (Рисунок 35, А, В). Образование димерных форм может быть как побочным явлением, так и свидетельством того, что белок работает в такой конформации [Dang, 2022]. Качественную активность (Рисунок 35, С) подтвердили на чашках с лихенаном (0,2% субстрата, 2% агарозы, 50 mM TrisHCl, pH 7,5, 60 °C, время инкубирования 16 ч, окраска 0,1% Конго Красным). В качестве положительного контроля была использована высокоактивная эндоглюканаза GH12 термофильной археи рода *Thermococcus* [Zayulina et al., 2025].

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. Оптимальные значения pH для PRQ50 лежат между значениями 4,5–5,5 (с рабочим диапазоном 3,0–8,0), а температуры 65 °C (рабочий диапазон 37–100 °C) (Рисунок 36, А, В). Добавление к реакционной смеси ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} увеличивало активность PRQ50. Добавление детергентов в концентрации 1 mM не меняло работы фермента. Препарат PRQ50 гидролизировал лихенан, β -глюкан, ламинарин (Рисунок 36, С, D).

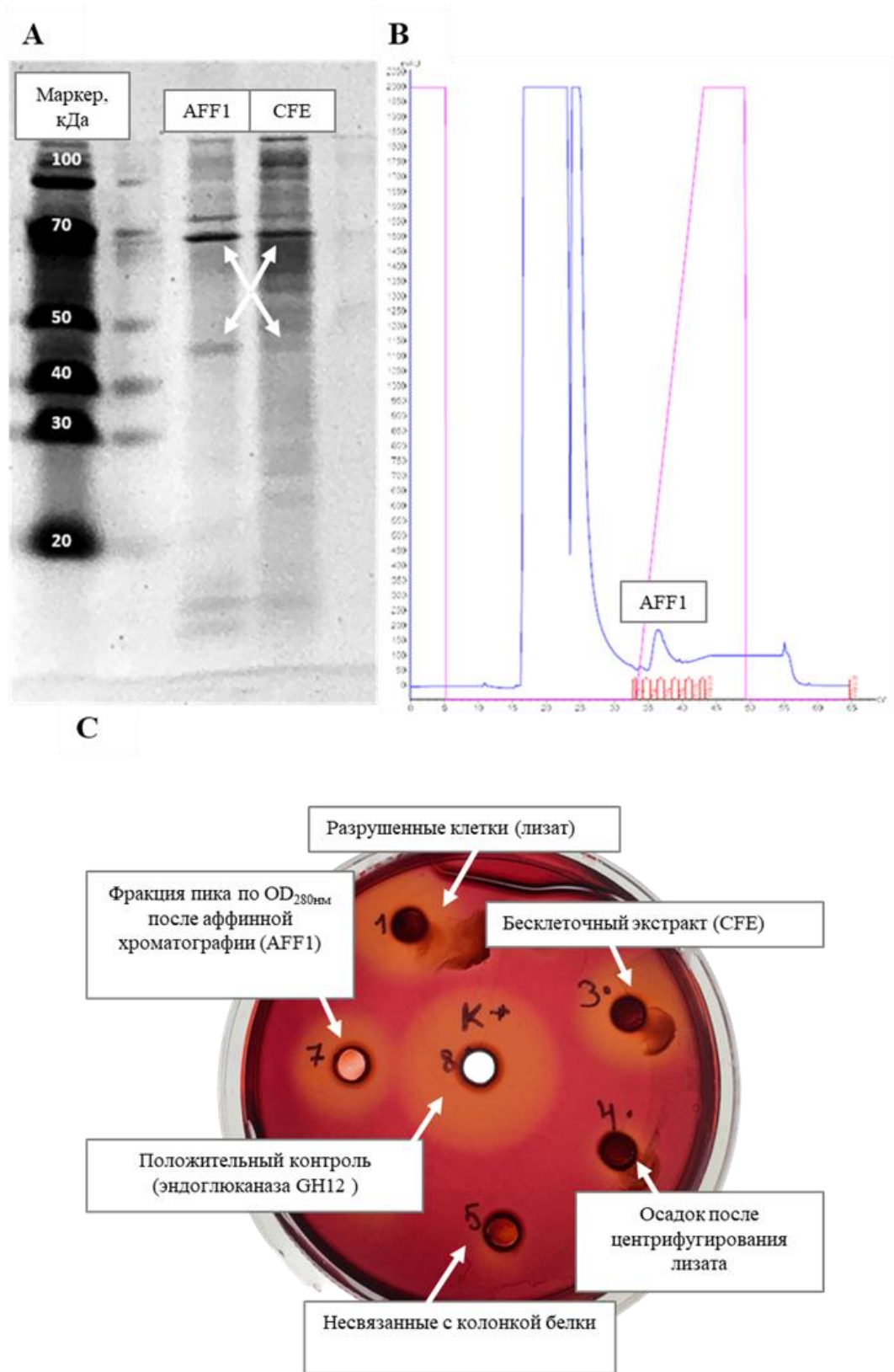


Рисунок 35 – Очистка и проверка качественной активности белка PRQ50. А – электрофорез фракции, полученной после FPLC (AFF1) и бесклеточного экстракта до очистки (CFE). В – пик фракции AFF1 с оптической плотностью (OD) 280 нм, содержащей PRQ50, при очистке на хроматографе низкого давления. С – гидролитическая активность фракций PRQ50 на чашках с лишенином.

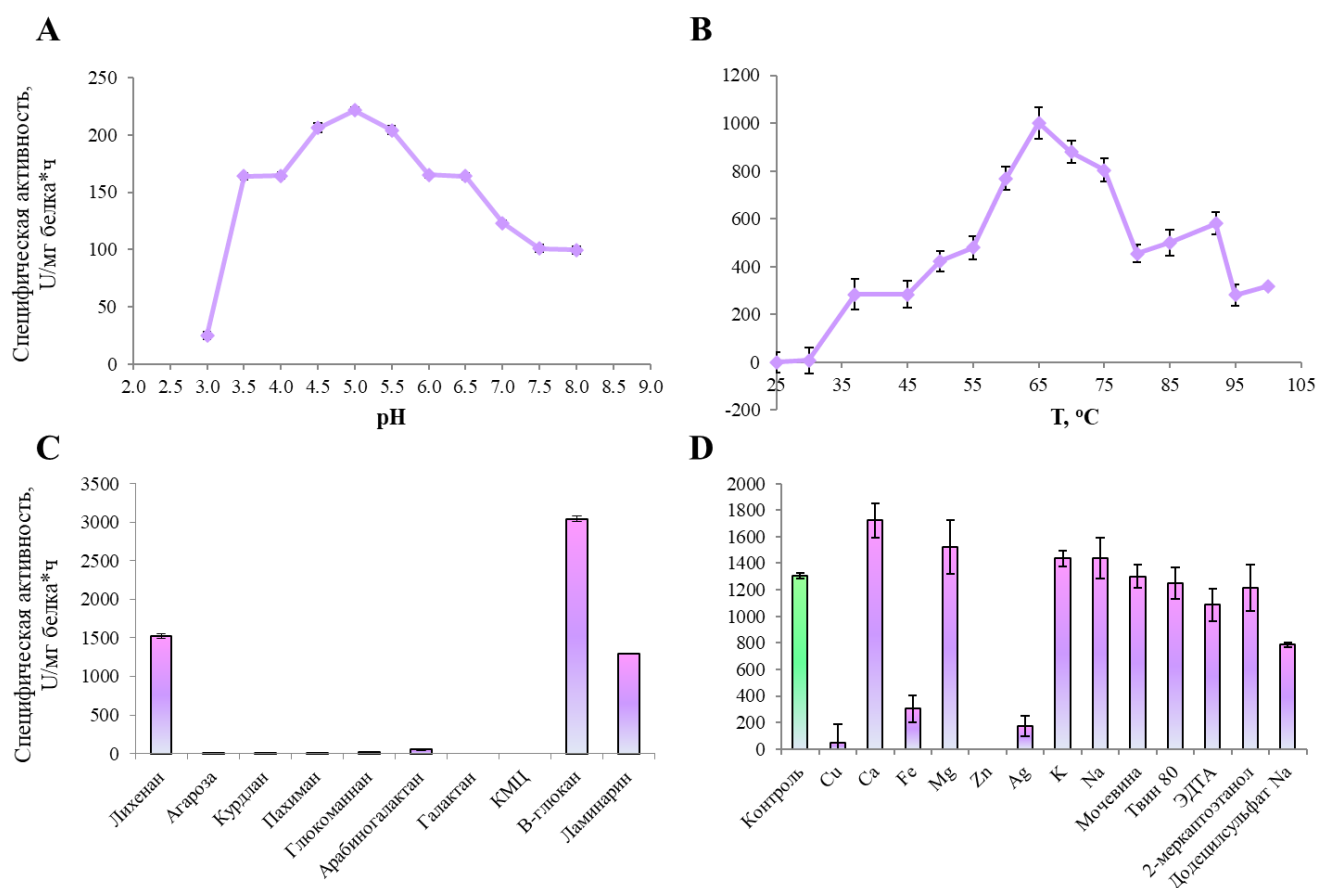


Рисунок 36 – Начальная биохимическая характеристика белка PRQ50. А – зависимость активности на лихенане от значений pH при 83 °С. В – зависимость активности на лихенане от температуры при оптимальном pH. С – субстратная специфичность в оптимальных pH и температуре. D – активность на лихенане в присутствии различных ионов и детергентов, оптимальные температура и pH.

Таким образом, начально охарактеризована первая гликозидаза архей рода *Tardisphaera*. Фермент 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 архейным белком. Она активна в отношении β -(1-3) и β -(1-4) связей между остатками глюкозы в субстратах, устойчива к воздействию детергентов. β -(1-4)-эндоглюканазная (целлюлазная) активность впервые показана для белков семейства GH50. Активность фермента (как, вероятно, и многих других гликозидаз у *Tardisphaera*), позволяет археям использовать широкий спектр полисахаридов и занимать доминирующие положения в анаэробных сообществах осадков кислых горячих источников; быть привлекательными для биотехнологии.

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Археи представляют собой отдельный домен жизни, изученный, в отличие от бактерий и эукариот, крайне слабо. Уникальное строение и метаболизм, большое разнообразие некультивируемых таксонов, а также значимость архей в эволюционных процессах делают эту группу привлекательной для микробиологов со всего мира. Археи глубоких филогенетических линий встречаются повсеместно и культивирование этих микроорганизмов является нетривиальной задачей, требует комбинирования ряда методологических приемов, и, в особенности, понимания закономерностей их распространения в природе. Получение чистой культуры является значимым как с точки зрения фундаментального понимания метаболизма и экологической роли архей, так и их применения в различных отраслях производства.

Фокус данного исследования был обращен на термофильных архей, встречающихся в горячих источниках Курильских островов и Камчатки. Микробное разнообразие гидротерм Курил до настоящего времени было изучено фрагментарно, в основном с помощью культурально-зависимых методов. Лишь в последние годы стали появляться работы по изучению состава сообществ с использованием молекулярно-биологических подходов в единичных источниках [Kizilova et al., 2014; Malygina et al., 2023; Rozanov et al., 2020; Rozanov et al., 2021]. Гидротермы Камчатки исследованы гораздо лучше за счет десятков лет исследований российских и зарубежных микробиологов [Kochetkova et al., 2022]. Однако сведений о метаболизме и роли глубоких филогенетических линий архей в этих источниках практически не было. Требовалось провести исследование, максимально широко описывающее состав микробных сообществ с учетом физико-химических параметров. Это было необходимо для разработки стратегии накопления и получения чистых культур архей глубоких групп, до сих пор «некультивируемых».

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.

Впервые мы провели широкомасштабное исследование микробных сообществ более 30 наземных горячих источников Курильских островов. По выявленному составу они были разделены на три группы: околонейтральная бактериальная, кислая бактериальная и кислая архейная. Показано, что pH является наиболее значимым фактором, влияющим на микробные сообщества. Археи доминировали в источниках с $\text{pH} < 3$ [Karaseva et al., 2024]. На Камчатке археи преобладали в источниках с pH ниже нейтральных значений.

Среди основных групп архей курильских и камчатских кислых горячих источников были глубокие филогенетические линии, изучение которых стало целью диссертации. К ним относились: 1) некультивируемая линия A10/ARK15, обнаруживаемая в гидротермах разных стран на протяжении более 30 лет, но так и не получившая подробного описания, не говоря о лабораторных культурах; 2) глубокая линия порядка *Fervidicoccales*, представленная только одним культивируемым видом; и 3) археи филума ‘*Ca. Marsarchaeota*’ – группы, метаболизм и экологическая роль которой были лишь предсказаны [Jay et al., 2018; Kochetkova et al., 2022; Perevalova et al., 2008; Qi et al., 2024; Sriaporn et al., 2023].

Мы показали, что *Fervidicoccales* встречаются в основном в камчатских источниках с умеренно низкими pH (4,0–6,5) и температурами от 40 до 70 °C, достигая до 10% от всего сообщества. Археи ‘*Ca. Marsarchaeota*’ на Камчатке встречаются при таких же температурах, но в более широком диапазоне pH со сдвигом в кислую зону (2,5–6,5), и достигают 17%. На Курилах эта группа встречается в экстремально кислых источниках с pH 1,5–3,0 и может составлять до 42%. Группа A10/ARK15 является одной из самых многочисленных и распространенных групп прокариот камчатских гидротерм (до 60% по данным NGS) и обнаруживается в источниках с более широким диапазоном температур (от 30 до 80 °C) и pH от 2 до 6,5. В курильских источниках эта группа встречается реже [Karaseva et al., 2024].

Поскольку группы ‘*Ca. Marsarchaeota*’ и A10/ARK15 доминируют в донных осадках кислых источников [Karaseva et al., 2024; Maltseva et al., 2023], мы предположили, что они являются анаэробными деструкторами и, вероятно, могут использовать сложногидролизуемые субстраты (например, полисахариды). Такие соединения редко или не используются известными культивируемыми термоацидофилами. Практически все они относятся к быстрорастущим организмам. Поэтому еще одним селективным фактором при накоплении новых групп было длительное культивирование.

Результатом такого подхода стало выделение первого представителя линии A10/ARK15 – термоацидофильной археи ‘*Thermolimicoccus acidophilus*’ AK-4214. Штамм является медленно растущим (минимальное время удвоения 64 ч) анаэробным хемоорганогетеротрофом, разлагающим белковые соединения и некоторые углеводы. С получением чистой культуры было уточнено, что археи этой группы могут составлять до 88% микробного сообщества осадков умеренно горячих кислых источников (по данным кПЦР и FISH). В данный момент продолжается работа по изучению метаболизма культуры, но по предварительным результатам можно предположить, что такая большая численность этой группы обусловлена широкой экологической пластичностью в отношении pH и температур. На основании фенотипических и филогенетических данных предложены новое семейство и порядок внутри класса *Thermoplasmata*, ‘*Thermolimicoccaceae*’ fam. nov. и ‘*Thermolimicoccales*’ ord. nov. соответственно.

Другая глубокая линия архей порядка *Fervidicoccales*, имеющая только один культивируемый вид *F. fontis*, была исследована как возможный деструктор липидных соединений в осадках кислых горячих источников. Ранее способность к росту на липидных субстратах была показана лишь на одной термофильной архее (*Thermococcus sibiricus*). Было показано, что *F. fontis* штамм 3639Fd сбраживает трибутирин, триолеин, моноолеин, кунжутное, хлопковое и подсолнечное масла. Способность к росту на липидах была проверена и для других штаммов этого вида. Таким образом, *F. fontis* стал первым описанным представителем филума *Thermoproteota*, обладающим таким свойством. В геноме 3639Fd был найден ген

предполагаемой эстеразы [Карасева и др., 2021], а для чистой культуры показана нативная индуцибельная эстеразная и липазная активности. Полученные данные расширяют представления об экологической и биотехнологической роли архей *Fervidicoccales*.

Длительным культивированием на полисахаридных субстратах удалось выделить из осадков кислого горячего источника архею *Tardisphaera saccharovorans* АК-3817, ранее относящуюся к группе ‘*Ca. Marsarchaeota*’. Организм является медленно растущим (минимальное время удвоения 52 ч) анаэробным бродильщиком и растет на большом спектре полисахаридов различного происхождения и типов химической связи между остатками мономеров. Стоит отметить, что ранее, согласно метагеномным данным [Jay et al., 2018], архей этой группы относили к аэробным гетеротрофам, участвующим в цикле соединений железа, что не было показано для нашего изолята. На основании фенотипических и филогенетических данных были предложены *Tardisphaeraceae* fam. nov., *Tardisphaerales* ord. nov. и *Tardisphaeria* class. nov. внутри филума *Thermoproteota*. Разработанная методика длительного накопительного инкубирования при ступенчатом подборе температуры, pH и субстрата может быть применена для выделения и других труднокультивируемых архей.

Выделение чистой культуры позволило подтвердить, что археи порядка *Tardisphaerales* могут составлять до 40% от всего сообщества (по кПЦР). *Tardisphaera* – единственные культивируемые термоацидофильные прокариоты, растущие на таком разнообразии полисахаридов. Кроме этого, запасание энергии идет за счёт брожения, тогда как все остальные культивируемые термоацидофилы используют дыхание. Эта стратегия, вероятно, позволяет доминировать: археи выступают в роли деструкторов сложных органических субстратов, редко- или неиспользуемых другими микроорганизмами в анаэробных осадках. Обилие найденных у этих архей генов гликозидаз различных семейств открывает перспективы для исследования потенциала этих ферментов [Prokofeva et al., 2025]. Нами была предварительно охарактеризована первая гликозидаза из семейства GH50, выделенная из архей. По результатам первичной биохимической

характеристики рекомбинантно полученного белка PRQ50 показано, что он работает в широком диапазоне pH (3,0–8,0) и температур (37–100 °C), активен в отношении β -(1,3) и β -(1,4) связей между остатками глюкозы в субстратах и устойчив к воздействию детергентов. β -(1,4)-эндоглюканазная (целлюлазная) активность впервые была показана для белков GH50 семейства. Продолжение исследований имеет ценность для биотехнологии в области применения термо- и кислотоустойчивых углеводов-гидролизующих ферментов.

Несмотря на развитие молекулярно-биологических методов, позволяющих изучать микробные сообщества в обход культивированию, многие ключевые вопросы физиологии, экологии и эволюции микроорганизмов остаются без ответа до тех пор, пока не получена чистая культура. В этой работе такой подход стал основным: от молекулярно-экологического скрининга горячих источников до выделения и всесторонней характеристики чистых культур первых представителей архей трех глубоких филогенетических линий. Мы описали их биотехнологический потенциал и предположили экологическую роль в сообществах как деструкторов сложных органических соединений – углеводов, белков и липидов. Это указывает на значительный вклад термоацидофильных архей в цикл углерода в природных экосистемах.

6 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 – медленно растущий 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 – медленно растущий 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 сокращений и условных обозначений

АТИ – атмосфера техническая избыточная

ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ – газовая хроматография

ДАФИ – флуоресцентный краситель 4',6'-диамидино-2-фенилиндол

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНСК – 3,5-динитросалициловая кислота

ДЭ – дрожжевой экстракт

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЙНП – Йеллоустонский национальный парк

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НК – нанокompартменты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТБ – трибутирин

ТО – триолеин

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ФСКБ – фракции связанных с клеткой белков

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

АА, АВ, CNB – группы микробных сообществ (Acidic Archaeal (кислая архейная), Acidic Bacterial (кислая бактериальная), Circumneutral Bacterial (околонеутральная бактериальная))

ANOVA – Analysis of Variance (дисперсионный анализ)

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (алгоритм поиска сходства биологических последовательностей)

CAZy – Carbohydrate-Active EnZymes (база данных углеводов-активных ферментов)

CGMCC – China General Microbiological Culture Collection (Общая коллекция микробиологических культур Китая)

CHAPS – Cholanidopropyl-Amidopropyldimethylammonio-Propane-Sulfonate (3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат)

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)

DPANN – *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Nanohaloarchaeota* (суперфилюм, назван по первым буквам входящих филюмов)

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Германская коллекция микроорганизмов)

Eh – окислительно-восстановительный потенциал

FISH – Fluorescence in situ hybridization (флуоресцентная *in situ* гибридизация)

FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography (хроматография белков низкого давления)

GDGT – Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraethers (глицерол-диалкил-глицерол-тетраэфиры)

GH – Glycoside Hydrolases (гликозилгидролазы)

GTDB – Genome Taxonomy Database (База данных геномной таксономии)

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота)

ICSP – International Committee on Systematics of Prokaryotes (Международный комитет систематики прокариот)

LIC – Ligation Independent Cloning (безлигазное клонирование)

MAG – Metagenome-Assembled Genomes (геномы, собранные из метагеномов)

MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis (пакет программ для эволюционного анализа)

MES – 2-morpholine ethanesulfonic acid (2-морфолино-этансульфоновая кислота)

mwco – molecular weight cut-off (порог отсечения по молекулярной массе)

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Национальный центр биотехнологической информации)

NGS – Next Generation Sequencing (секвенирование нового поколения)

NMDS – Non-metric Multidimensional Scaling (неметрическое многомерное шкалирование)

OD – Optical Density (оптическая плотность)

OTU – Operational Taxonomic Units (операционные таксономические единицы)

PBS – Phosphate-Buffered Saline (фосфатно-солевой буфер)

SAG – Single-cell Amplified Genomes (одиочные амплифицированные геномы)

TACK – *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota* (суперфилум архей, назван по первым буквам филумов)

UHPLC-HRMS – Ultra-High Performance Liquid Chromatography with High-Resolution Mass Spectrometry (сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией высокого разрешения)

UniProtKB – UniProt Knowledgebase (база данных белковых последовательностей)

Список литературы

1. Воробьева Л.И. Археи. – Москва: ИКЦ Академкнига, 2007. – 447 с.
2. 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.
3. Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацетатной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология. – 1992. – Т. 67. – № 5. – С. 812–817.
4. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза Капель. – СПб: Издательство Веда, 2006. – 212 с.
5. Кузнецов С.И. Микроорганизмы горячих ключей Камчатки // Труды Института микробиологии АН СССР. – 1955. – Т. 4. – С. 130–154.
6. Логинова Л.Г., Головачева Р.С., Егорова Л.А. Жизнь микроорганизмов при высоких температурах. – Москва: Наука, 1966. – 295 с.
7. Пиневиц А.В. Микробиология, Биология прокариотов. – СПб: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2006. – 331 с.
8. Савенко В.С. Введение в ионометрию природных вод. – Ленинград: Гидрометеиздат, 1986. – 77 с.
9. Albers S.-V., Meyer B.H. The archaeal cell envelope // Nat. Rev. Microbiol. – 2011. – V. 9. – № 6. – P. 414–426.
10. Anda V. De, Appler K.E., Aguilar-Pine E., Aitolo G.L., Halverson G.P., Baker B.J. The archaeal roots of eukaryotic life // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2026. – V. 123. – № 13. – P. e2516062123.
11. Ansell T.B., Berrios L., Peay K.G., Dahlberg P.D. Cryogenic electron tomography by the numbers: Charting underexplored lineages in structural cell biology // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2026. – V. 123. – № 8. – P. e2518350123.
12. Arpigny J.L., Feller G., Gerday C. Cloning, sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10 //

- Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr. – 1993. – V. 1171. – № 3. – P. 331–333.
13. Arpigny J.L., Jendrossek D., Jaeger K.-E. A novel heat-stable lipolytic enzyme from *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 displaying similarity to polyhydroxyalkanoate depolymerases // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – V. 167. – № 1. – P. 69–73.
 14. Ashelford K.E. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database // Nucleic Acids Res. – 2002. – V. 30. – № 15. – P. 3481–3489.
 15. Auch A.F., Jan M. von, Klenk H.-P., Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison // Stand. Genomic Sci. – 2010. – V. 2. – № 1. – P. 117–134.
 16. Bairoch A. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000 // Nucleic Acids Res. – 2000. – V. 28. – № 1. – P. 45–48.
 17. Baker B.J., Anda V. De, Seitz K.W., Dombrowski N., Santoro A.E., Lloyd K.G. Diversity, ecology and evolution of Archaea // Nat. Microbiol. – 2020. – V. 5. – № 7. – P. 887–900.
 18. Barns S.M., Fundyga R.E., Jeffries M.W., Pace N.R. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1994. – V. 91. – № 5. – P. 1609–1613.
 19. Beam J.P., Jay Z.J., Kozubal M.A., Inskeep W.P. Niche specialization of novel *Thaumarchaeota* to oxic and hypoxic acidic geothermal springs of Yellowstone National Park // ISME J. – 2014. – V. 8. – № 4. – P. 938–951.
 20. Bolhuis H., Palm P., Wende A., Falb M., Rampp M., Rodriguez-Valera F., Pfeiffer F., Oesterhelt D. The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity // BMC Genomics. – 2006. – V. 7. – № 1. – P. 169.
 21. Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota* // Nat. Rev. Microbiol. – 2008. – V. 6. – № 3. – P. 245–252.

22. Brock T.D. Life at High Temperatures // Science. – 1967. – V. 158. – № 3804. – P. 1012–1019.
23. Brock T.D. Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures. – New York: Springer, 1978. – 465 p.
24. Buessecker S., Palmer M., Lai D., Dimapilis J., Mayali X., Mosier D., Jiao J.-Y., Colman D.R., Keller L.M., St. John E., Miranda M., Gonzalez C., Gonzalez L., Sam C., Villa C., Zhuo M., Bodman N., Robles F., Boyd E.S., Cox A.D., St. Clair B., Hua Z.-S., Li W.-J., Reysenbach A.-L., Stott M.B., Weber P.K., Pett-Ridge J., Dekas A.E., Hedlund B.P., Dodsworth J.A. An essential role for tungsten in the ecology and evolution of a previously uncultivated lineage of anaerobic, thermophilic Archaea // Nat. Commun. – 2022. – V. 13. – № 1. – P. 3773.
25. Burkhardt C., Baruth L., Meyer-Heydecke N., Klippel B., Margaryan A., Paloyan A., Panosyan H.H., Antranikian G. Mining thermophiles for biotechnologically relevant enzymes: evaluating the potential of European and Caucasian hot springs // Extremophiles. – 2024. – V. 28. – № 1. – P. 5.
26. Burns D.G., Janssen P.H., Itoh T., Kamekura M., Li Z., Jensen G., Rodríguez-Valera F., Bolhuis H., Dyall-Smith M.L. *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – V. 57. – № 2. – P. 387–392.
27. Cabrera Ma.Á., Blamey J.M. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments // Biol. Res. – 2018. – V. 51. – № 1. – P. 37.
28. Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics // Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37. – P. D233–D238.
29. Capella-Gutiérrez S., Silla-Martínez J.M., Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses // Bioinformatics. – 2009. – V. 25. – № 15. – P. 1972–1973.
30. Chaban B., Ng S.Y.M., Jarrell K.F. Archaeal habitats – from the extreme to the ordinary // Can. J. Microbiol. – 2006. – V. 52. – № 2. – P. 73–116.

31. Chandra P., Enespa, Singh R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review // *Microb. Cell Fact.* – 2020. – V. 19. – № 1. – P. 169.
32. Charles-Orszag A., Albers S.-V. Subcellular organization of the archaeal cell // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2025. – V. 88. – P. 102679.
33. Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database // *Bioinformatics.* – 2022. – V. 38. – № 23. – P. 5315–5316.
34. Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus* // *J. Bacteriol.* – 1976. – V. 127. – № 3. – P. 1550–1557.
35. Chudaev O., Chudaeva V., Sugimori K., Kuno A., Matsuo M. Geochemistry of recent hydrothermal systems of Mendeleev Volcano, Kuril Islands, Russia // *J. Geochem. Explor.* – 2006. – V. 88. – № 1–3. – P. 95–100.
36. Chudaev O.V. Composition and origin of the recent hydrothermal systems of the Far East, Russia. – Vladivostok: Dalnauka, 2003. – 216 p.
37. Chung K.-T., Bryant M.P. Robert E. Hungate: Pioneer of Anaerobic Microbial Ecology // *Anaerobe.* – 1997. – V. 3. – № 4. – P. 213–217.
38. Cicicopol C., Peters J., Kellermann J., Baumeister W. Primary structure of a multimeric protein, homologous to the PEP-utilizing enzyme family and isolated from a hyperthermophilic archaebacterium // *FEBS Lett.* – 1994. – V. 356. – № 2–3. – P. 345–350.
39. Coker J.A. Recent advances in understanding extremophiles // *F1000Res.* – 2019. – V. 8. – P. 1917.
40. Colman D.R., Poudel S., Hamilton T.L., Havig J.R., Selensky M.J., Shock E.L., Boyd E.S. Geobiological feedbacks and the evolution of thermoacidophiles // *ISME J.* – 2018. – V. 12. – № 1. – P. 225–236.
41. Corliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., Herzen R.P. von, Ballard R.D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K., Andel T.H. van. Submarine

- Thermal Springs on the Galápagos Rift // *Science*. – 1979. – V. 203. – № 4385. – P. 1073–1083.
42. Counts J.A., Zeldes B.M., Lee L.L., Straub C.T., Adams M.W.W., Kelly R.M. Physiological, metabolic and biotechnological features of extremely thermophilic microorganisms // *WIREs Syst. Biol. Med.* – 2017. – V. 9. – № 3. – P. wsbm.1377.
 43. Dang D.T. Molecular Approaches to Protein Dimerization: Opportunities for Supramolecular Chemistry // *Front. Chem.* – 2022. – V. 10. – P. 829312.
 44. Donati E.R., Castro C., Urbietta M.S. Thermophilic microorganisms in biomining // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – V. 32. – № 11. – P. 179.
 45. Eichler J. Biotechnological uses of archaeal extremozymes // *Biotechnol. Adv.* – 2001. – V. 19. – № 4. – P. 261–278.
 46. Elkins J.G., Podar M., Graham D.E., Makarova K.S., Wolf Y., Randau L., Hedlund B.P., Brochier-Armanet C., Kunin V., Anderson I., Lapidus A., Goltsman E., Barry K., Koonin E.V., Hugenholtz P., Kyrpides N., Wanner G., Richardson P., Keller M., Stetter K.O. A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – V. 105. – № 23. – P. 8102–8107.
 47. Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. – 2014. – V. 2. – № 1. – P. 6.
 48. Feller G., Thiry M., Arpigny J.L., Gerday C. Cloning and expression in *Escherichia coli* of three lipase-encoding genes from the psychrotrophic antarctic strain *Moraxella* TA144 // *Gene*. – 1991. – V. 102. – № 1. – P. 111–115.
 49. Feller G. Protein folding at extreme temperatures: Current issues // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2018. – V. 84. – P. 129–137.
 50. Finn R.D., Clements J., Eddy S.R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – P. W29–W37.
 51. Fischer M. The Lipase Engineering Database: a navigation and analysis tool for protein families // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – № 1. – P. 319–321.

52. Galeva A.V., Zhao D., Syutkin A.S., Topilina M.Y., Shchyogolev S.Y., Pavlova E.Y., Selivanova O.M., Kireev I.I., Surin A.K., Burygin G.L., Liu J., Xiang H., Pyatibratov M.G. Tat-fimbriae (“tafi”): An unusual type of haloarchaeal surface structure depending on the twin-arginine translocation pathway // *iScience*. – 2025. – V. 28. – № 2. – P. 111793.
53. Gasteiger E. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – № 13. – P. 3784–3788.
54. Gavrilov S.N., Korzhenkov A.A., Kublanov I.V., Bargiela R., Zamana L.V., Popova A.A., Toshchakov S.V., Golyshin P.N., Golyshina O.V. Microbial Communities of Polymetallic Deposits’ Acidic Ecosystems of Continental Climatic Zone With High Temperature Contrasts // *Front. Microbiol.* – 2019. – V. 10. – P. 1573.
55. Gfellner S.V., Groninga J., Colas C., Gabant G., Lorek A., Garland S., Baqué M. Assessing cell survival and biosignature preservation of the extremely thermoacidophilic archaeon *Acidianus manzaensis* after exposure to Mars-like conditions // *FEMS Microbes*. – 2026. – V. 7. – P. xtag043.
56. Girfoglio M., Rossi M., Cannio R. Cellulose Degradation by *Sulfolobus solfataricus* Requires a Cell-Anchored Endo- β -1-4-Glucanase // *J. Bacteriol.* – 2012. – V. 194. – № 18. – P. 5091–5100.
57. Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // *Protoc. Exch.* – 2016. – doi: 10.1038/protex.2016.030.
58. Göker M., Oren A. Valid publication of names of two domains and seven kingdoms of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2024. – V. 74. – № 1. – P. e006242.
59. Golyshina O.V., Lünsdorf H., Kublanov I.V., Goldenstein N.I., Hinrichs K.-U., Golyshin P.N. The novel extremely acidophilic, cell-wall-deficient archaeon *Cuniculiplasma divulgatum* gen. nov., sp. nov. represents a new family, *Cuniculiplasmataceae* fam. nov., of the order *Thermoplasmatales* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2016. – V. 66. – № 1. – P. 332–340.

60. Hamana K., Tanaka T., Hosoya R., Niitsu M., Itoh T. Cellular polyamines of the acidophilic, thermophilic and thermoacidophilic archaeobacteria, *Acidilobus*, *Ferroplasma*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Staphylothermus*, *Thermococcus*, *Thermoplasma* and *Vulcanisaeta* // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2003. – V. 49. – № 5. – P. 287–293.
61. Hedlund B.P., Chuvochina M., Hugenholtz P., Konstantinidis K.T., Murray A.E., Palmer M., Parks D.H., Probst A.J., Reysenbach A.-L., Rodriguez-R L.M., Rossello-Mora R., Sutcliffe I.C., Venter S.N., Whitman W.B. SeqCode: a nomenclatural code for prokaryotes described from sequence data // Nat. Microbiol. – 2022. – V. 7. – P. 1702–1708.
62. Hess M., Katzer M., Antranikian G. Extremely thermostable esterases from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* // Extremophiles. – 2008. – V. 12. – № 3. – P. 351–364.
63. Homma A., Tsukahara H. Chemical Characteristics of Hot Spring Water and Geological Environment in the Northernmost Area of the Itoigawa Shizuoka Tectonic Line // Bull. Earthq. Res. Inst. Univ. Tokyo. – 2008. – V. 83. – P. 217–225.
64. Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., Stetter K.O. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont // Nature. – 2002. – V. 417. – № 6884. – P. 63–67.
65. Huber H., Küper U., Daxer S., Rachel R. The unusual cell biology of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis* // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2012. – V. 102. – № 2. – P. 203–219.
66. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a Program for Degenerate Primer Design for Broad-Taxonomic-Range PCR in Microbial Ecology Studies // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V. 80. – № 16. – P. 5116–5123.
67. Imachi H., Nobu M.K., Nakahara N., Morono Y., Ogawara M., Takaki Y., Takano Y., Uematsu K., Ikuta T., Ito M., Matsui Y., Miyazaki M., Murata K., Saito Y., Sakai S., Song C., Tasumi E., Yamanaka Y., Yamaguchi T., Kamagata Y., Tamaki

- H., Takai K. Isolation of an archaeon at the prokaryote–eukaryote interface // *Nature*. – 2020. – V. 577. – № 7791. – P. 519–525.
68. Imachi H., Nobu M.K., Kato S., Takaki Y., Miyazaki M., Miyata M., Ogawara M., Saito Y., Sakai S., Tahara Y.O., Takano Y., Tasumi E., Uematsu K., Yoshimura T., Itoh T., Ohkuma M., Takai K. *Promethearchaeum syntrophicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, obligately syntrophic archaeon, the first isolate of the lineage ‘*Asgard*’ archaea, and proposal of the new archaeal phylum *Promethearchaeota* phyl. nov. and kingdom *Promethearchaeati* regn. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2024. – V. 74. – № 7. – P. 006435.
 69. Imachi H., Nobu M.K., Ishii S., Hirakata Y., Ikuta T., Isaji Y., Miyata M., Miyazaki M., Morono Y., Murata K., Nakagawa S., Ogawara M., Okada S., Saito Y., Sakai S., Shimamura S., Tahara Y.O., Takaki Y., Takano Y., Tasumi E., Uematsu K., Yoshimura T., Takai K. Eukaryotes’ closest relatives are internally simple syntrophic archaea // *bioRxiv*. – 2025. – doi: 10.1101/2025.02.26.640444.
 70. Ithurbide S., Gribaldo S., Albers S.-V., Pende N. Spotlight on FtsZ-based cell division in Archaea // *Trends Microbiol.* – 2022. – V. 30. – № 7. – P. 665–678.
 71. Itoh T., Suzuki K., Sanchez P.C., Nakase T. *Caldisphaera lagunensis* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic crenarchaeote isolated from a hot spring at Mt Maquiling, Philippines // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53. – № 4. – P. 1149–1154.
 72. Jannasch H.W., Mottl M.J. Geomicrobiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents // *Science*. – 1985. – V. 229. – № 4715. – P. 717–725.
 73. Jarrell K., Ding Y., Nair D., Siu S. Surface Appendages of Archaea: Structure, Function, Genetics and Assembly // *Life*. – 2013. – V. 3. – № 1. – P. 86–117.
 74. Jay Z.J., Beam J.P., Dlakić M., Rusch D.B., Kozubal M.A., Inskeep W.P. *Marsarchaeota* are an aerobic archaeal lineage abundant in geothermal iron oxide microbial mats // *Nat. Microbiol.* – 2018. – V. 3. – № 6. – P. 732–740.
 75. Kalacheva E.G., Taran Y.A., Kotenko T.A., Inguaggiato S., Voloshina E.V. The hydrothermal system of Mendeleev Volcano, Kunashir Island, Kuril Islands: The

- geochemistry and the transport of magmatic components // J. Volcanol. Seismol. – 2017. – V. 11. – № 5. – P. 335–352.
76. Kalacheva E.G., Taran Y.A., Kotenko T.A., Voloshina E.V., Erdnieva D.M. Ultra Acid Sulfate Chloride Waters of Baransky Volcano on Iturup Island, Kurils. The Composition and Output of Magmatic and Rock-Forming Components // J. Volcanol. Seismol. – 2022. – V. 16. – № 5. – P. 349–364.
 77. Kalacheva E.G., Taran Y.A., Voloshina E.V., Tarasov K.V., Melnikov D.V., Kotenko T.A., Erdnieva D.Y. Crater Lake Kipyashchee in the Caldera of Golovnin Volcano: Water and Gas Geochemistry, Output of Magmatic Volatiles (Kunashir Island) // J. Volcanol. Seismol. – 2023. – V. 17. – № 1. – P. 1–16.
 78. Kalacheva E.G., Taran Y.A. Processes responsible for variations in the isotopic composition (ΔD and $\Delta^{18}O$) of thermal waters of the Kuril Islands arc // J. Volcanol. Seismol. – 2019. – № 4. – P. 3–17.
 79. Käll L., Krogh A., Sonnhammer E.L.L. A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method // J. Mol. Biol. – 2004. – V. 338. – № 5. – P. 1027–1036.
 80. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., Haeseler A. von, Jermiin L.S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // Nat. Methods. – 2017. – V. 14. – № 6. – P. 587–589.
 81. 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 Microbiol. – 2024. – V. 24. – № 1. – P. 547.
 82. Kato S., Ohnishi M., Nagamori M., Yuki M., Takashina T., Ohkuma M., Itoh T. *Conexivisphaera calida* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur- and iron-reducing archaeon, and proposal of *Conexivisphaeraceae* fam. nov., *Conexivisphaerales* ord. nov., and *Conexivisphaeria* class. nov. in the phylum *Thaumarchaeota* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2021. – V. 71. – № 1. – P. 4595.
 83. Kato S., Ogasawara A., Itoh T., Sakai H.D., Shimizu M., Yuki M., Kaneko M., Takashina T., Ohkuma M. *Nanobdella aerobiophila* gen. nov., sp. nov., a

- thermoacidophilic, obligate ectosymbiotic archaeon, and proposal of *Nanobdellaceae* fam. nov., *Nanobdellales* ord. nov. and *Nanobdellia* class. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2022. – V. 72. – № 8. – P. 005489.
84. Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Mamiy D.D., Klyukina A.A., Slobodkin A.I. Phenotypic and genomic characterization of *Bathyarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., a cultivated representative of the archaeal class *Bathyarchaeia* // Front. Microbiol. – 2023. – V. 14. – P. 1214631.
 85. Kil Y., Pichkur E.B., Sergeev V.R., Zabrodsкая Y., Myasnikov A., Konevega A.L., Shtam T., Samygina V.R., Rychkov G.N. The archaeal highly thermostable GH35 family β -galactosidase *Da β Gal* has a unique seven domain protein fold // FEBS J. – 2024. – V. 291. – № 16. – P. 3686–3705.
 86. Kizilova A.K., Sukhacheva M.V., Pimenov N.V., Yurkov A.M., Kravchenko I.K. Methane oxidation activity and diversity of aerobic methanotrophs in pH-neutral and semi-neutral thermal springs of the Kunashir Island, Russian Far East // Extremophiles. – 2014. – V. 18. – № 2. – P. 207–218.
 87. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 41. – № 1. – P. e1.
 88. Kochetkova T.V., Toshchakov S.V., Zayulina K.S., Elcheninov A.G., Zavarzina D.G., Lavrushin V.Yu., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Hot in Cold: Microbial Life in the Hottest Springs in Permafrost // Microorganisms. – 2020. – V. 8. – № 9. – P. 1308.
 89. Kochetkova T.V., Podosokorskaya O.A., Elcheninov A.G., Kublanov I.V. Diversity of Thermophilic Prokaryotes Inhabiting Russian Natural Hot Springs // Microbiology. – 2022. – V. 91. – № 1. – P. 1–27.
 90. Kompanichenko V.N. Exploring the Kamchatka Geothermal Region in the Context of Life's Beginning // Life. – 2019. – V. 9. – № 2. – P. 41.

91. Könneke M., Bernhard A.E., Torre J.R. de la, Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon // *Nature*. – 2005. – V. 437. – № 7058. – P. 543–546.
92. Kozubal M.A., Romine M., Jennings R.D., Jay Z.J., Tringe S.G., Rusch D.B., Beam J.P., McCue L.A., Inskeep W.P. *Geoarchaeota*: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park // *ISME J.* – 2013. – V. 7. – № 3. – P. 622–634.
93. Kuehnast T., Kumpitsch C., Mohammadzadeh R., Weichhart T., Moissl-Eichinger C., Heine H. Exploring the human archaeome: its relevance for health and disease, and its complex interplay with the human immune system // *FEBS J.* – 2025. – V. 292. – № 6. – P. 1316–1329.
94. Lander E.S. The Heroes of CRISPR // *Cell*. – 2016. – V. 164. – № 1–2. – P. 18–28.
95. Letunic I., Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool // *Nucleic Acids Res.* – 2024. – V. 52. – № W1. – P. W78–W82.
96. Lewis A.M., Recalde A., Bräsen C., Counts J.A., Nussbaum P., Bost J., Schocke L., Shen L., Willard D.J., Quax T.E.F., Peeters E., Siebers B., Albers S.-V., Kelly R.M. The biology of thermoacidophilic archaea from the order *Sulfolobales* // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2021. – V. 45. – № 4. – P. fuaa063.
97. Lewis W.H., Tahon G., Geesink P., Sousa D.Z., Ettema T.J.G. Innovations to culturing the uncultured microbial majority // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2021. – V. 19. – № 4. – P. 225–240.
98. Lieph R., Veloso F.A., Holmes D.S. Thermophiles like hot T // *Trends Microbiol.* – 2006. – V. 14. – № 10. – P. 423–426.
99. 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. – V. 108. – № 1. – P. 1–6.
100. MacLeod F.I., Kügelgen A. von, Lechowska M.K., Parham J., Richard I.A., Aguilar-Pine E.J., Burns B.P., Baker B.J., Bharat T.A.M., Baum B.

- An *Asgard* archaeon with internal membrane compartments // bioRxiv. – 2025. – doi: 10.1101/2025.11.06.686947.
101. Madigan M.T., Bender K.S., Buckley D.H., Sattley W.M., Stahl D.A., Brock T.D. Brock biology of microorganisms. – Harlow: Pearson Education, 2022. – 1124 p.
 102. Makarova K.S., Tobiasson V., Wolf Y.I., Lu Z., Liu Y., Zhang S., Krupovic M., Li M., Koonin E.V. Diversity, origin, and evolution of the ESCRT systems // mBio. – 2024. – V. 15. – № 3. – P. e00335–24.
 103. Maltseva A.I., Klyukina A.A., Elcheninov A.G., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Kublanov I.V., Kochetkova T.V., Frolov E.N. Water and Sediments of an Acidic Hot Spring–Distinct Differentiation with Regard to the Microbial Community Composition and Functions // Water (Basel). – 2023. – V. 15. – № 19. – P. 3415.
 104. Maltseva A.I., Elcheninov A.G., Klyukina A.A., Gololobova A.V., Lavrentyeva E.V., Banzaraktsaeva T.G., Dambaev V.B., Barkhutova D.D., Zavarzina D.G., Frolov E.N. Microbial Diversity of the Baikal Rift Zone Freshwater Alkaline Hot Springs and the Ecology of Polyextremophilic Dissimilatory Iron-Reducing Bacteria // Biology (Basel). – 2025. – V. 14. – № 12. – P. 1716.
 105. Malygina A., Balkin A., Polyakova E., Stefanov S., Potekhin A., Gogoleva N. Taxonomic Diversity of the Microbial Biofilms Collected along the Thermal Streams on Kunashir Island // Ecologies. – 2023. – V. 4. – № 1. – P. 106–123.
 106. Mardanov A.V., Ravin N.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G. Metabolic Versatility and Indigenous Origin of the Archaeon *Thermococcus sibiricus*, Isolated from a Siberian Oil Reservoir, as Revealed by Genome Analysis // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75. – № 13. – P. 4580–4588.
 107. Mardanov A.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V., Prokofeva M.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N.V., Skryabin K.G. The Genome Sequence of the Crenarchaeon *Acidilobus saccharovorans* Supports a New Order, *Acidilobales*, and Suggests an Important Ecological Role in Terrestrial Acidic Hot Springs // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – V. 76. – № 16. – P. 5652–5657.

108. Markhinin E.K., Stratula D.S. Hydrothermal Systems of Kuril Islands. – Moscow: Nauka, 1977. – 212 p.
109. Matsumoto G.I., Shimizu R., Nagura M. Geochemical Characteristics of Kuroyu Hot Springs in the Ohtaku Area of Tokyo // J. Hot Spring Sci. Jpn. – 2020. – V. 70. – № 3. – P. 150–169.
110. McMurdie P.J., Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data // PLoS One. – 2013. – V. 8. – № 4. – P. e61217.
111. Medina-Sánchez J.M., Felip M., Casamayor E.O. Catalyzed Reported Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization Protocol To Evaluate Phagotrophy in Mixotrophic Protists // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – № 11. – P. 7321–7326.
112. Meghwanshi G.K., Verma S., Srivastava V., Kumar R. Archaeal lipolytic enzymes: Current developments and further prospects // Biotechnol. Adv. – 2022. – V. 61. – P. 108054.
113. Merkel A.Yu., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Tarnovetskii I.Yu., Frolov E.N., Dubin A.V., Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs // Extremophiles. – 2017. – V. 21. – № 2. – P. 307–317.
114. Merkel A.Yu., Tarnovetskii I.Yu., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA Primer Systems for Profiling of Thermophilic Microbial Communities // Microbiology. – 2019. – V. 88. – № 6. – P. 671–680.
115. Miguel Bouzas T. de, Barros-Velazquez J., Gonzalez Villa T. Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review // Protein Pept. Lett. – 2006. – V. 13. – № 7. – P. 645–651.
116. Moissl-Eichinger C., Pausan M., Taffner J., Berg G., Bang C., Schmitz R.A. Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes // Trends Microbiol. – 2018. – V. 26. – № 1. – P. 70–85.

117. Mojica F.J.M., Juez G., Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *Pst*I sites // Mol. Microbiol. – 1993. – V. 9. – № 3. – P. 613–621.
118. Morrison L.E., Tanner F.W. STUDIES ON THERMOPHILIC BACTERIA I. AEROBIC THERMOPHILIC BACTERIA FROM WATER // J. Bacteriol. – 1922. – V. 7. – № 3. – P. 343–366.
119. Ng S.Y.M., Chaban B., Jarrell K.F. Archaeal Flagella, Bacterial Flagella and Type IV Pili: A Comparison of Genes and Posttranslational Modifications // Microb. Physiol. – 2006. – V. 11. – № 3–5. – P. 167–191.
120. O'Donnell M., Langston L., Stillman B. Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2013. – V. 5. – № 7. – P. a010108.
121. Oksanen J., Simpson G.L., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O'Hara R.B., Solymos P., Stevens M.H.H., Szoecs E., Wagner H., Barbour M., Bedward M., Bolker B., Borcard D., Borman T., Carvalho G., Chirico M., Caceres M. De, Durand S., Evangelista H.B.A., FitzJohn R., Friendly M., Furneaux B., Hannigan G., Hill M.O., Lahti L., Martino C., McGlinn D., Ouellette M.-H., Ribeiro Cunha E., Smith T., Stier A., Braak C.J.F. Ter, Weedon J. vegan: Community Ecology Package // CRAN: Contributed Packages. – 2001.
122. Panagiotou K., Geesink P., Köstlbacher S., Zwaan G.H. de, Ettema T.J.G. Diversity, ecology, cell biology and evolution of the *Asgard* archaea // Nat. Rev. Microbiol. – 2026. – V. 24. – № 6. – P. 377–391.
123. Pandey A., Dhakar K. Extreme thermal environments: reservoirs of industrially important thermozymes // Front. Microbiol. – 2026. – V. 16. – P. 1739143.
124. Parks D.H., Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Rinke C., Chuvochina M., Hugenholtz P. GTDB release 10: a complete and systematic taxonomy for 715 230 bacterial and 17 245 archaeal genomes // Nucleic Acids Res. – 2026. – V. 54. – № D1. – P. D743–D754.

125. Peeters E., Driessen R.P.C., Werner F., Dame R.T. The interplay between nucleoid organization and transcription in archaeal genomes // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2015. – V. 13. – № 6. – P. 333–341.
126. Pende N., Sogues A., Megrian D., Sartori-Rupp A., England P., Palabikyan H., Rittmann S.K.-M.R., Graña M., Wehenkel A.M., Alzari P.M., Gribaldo S. SepF is the FtsZ anchor in archaea, with features of an ancestral cell division system // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 3214.
127. Perevalova A.A., Kolganova T.V., Birkeland N.-K., Schleper C., Bonch-Osmolovskaya E.A., Lebedinsky A.V. Distribution of *Crenarchaeota* Representatives in Terrestrial Hot Springs of Russia and Iceland // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – № 24. – P. 7620–7628.
128. Perevalova A.A., Bidzhieva S.Kh., Kublanov I.V., Hinrichs K.-U., Liu X.L., Mardanov A.V., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Fervidicoccus fontis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic crenarchaeote from terrestrial hot springs, and proposal of *Fervidicoccaceae* fam. nov. and *Fervidicoccales* ord. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – V. 60. – № 9. – P. 2082–2088.
129. Perevalova A.A., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Fervidicoccales* // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* – New York: Wiley, 2016. – P. 1–3.
130. Pester M., Schleper C., Wagner M. The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2011. – V. 14. – № 3. – P. 300–306.
131. Peters J., LoRicco J.G., Saracco M., Calìo A., Oger P. Stability and Adaptation of Proteins, Membranes and Cells to Extreme Temperature and Pressure // *J. Mol. Biol.* – 2026. – V. 438. – № 4. – P. 169477.
132. Pineda De Castro L.F., Dopson M., Friedman R. Biological Membranes in Extreme Conditions: Simulations of Anionic Archaeal Tetraether Lipid Membranes // *PLoS One.* – 2016. – V. 11. – № 5. – P. e0155287.
133. Ponamoreva O.N., Kamanina O.A., Alferov V.A., Machulin A.V., Rogova T.V., Arlyapov V.A., Alferov S.V., Suzina N.E., Ivanova E.P. Yeast-based self-

- organized hybrid bio-silica sol-gels for the design of biosensors // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – V. 67. – P. 321–326.
134. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments // *PLoS One.* – 2010. – V. 5. – № 3. – P. e9490.
 135. Prokofeva M.I., Kostrikina N.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Lysenko A.M., Lebedinsky A.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. Isolation of the anaerobic thermoacidophilic crenarchaeote *Acidilobus saccharovorans* sp. nov. and proposal of *Acidilobales* ord. nov., including *Acidilobaceae* fam. nov. and *Caldisphaeraceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – V. 59. – № 12. – P. 3116–3122.
 136. 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. – P. e00710-25.
 137. Qi Y.-L., Chen Y.-T., Xie Y.-G., Li Y.-X., Rao Y.-Z., Li M.-M., Xie Q.-J., Cao X.-R., Chen L., Qu Y.-N., Yuan Z.-X., Xiao Z.-C., Lu L., Jiao J.-Y., Shu W.-S., Li W.-J., Hedlund B.P., Hua Z.-S. Analysis of nearly 3000 archaeal genomes from terrestrial geothermal springs sheds light on interconnected biogeochemical processes // *Nat. Commun.* – 2024. – V. 15. – № 1. – P. 4066.
 138. Qi Y.-L., Zhang H.-T., Li M., Li W.-J., Hua Z.-S. Recovery of nearly 3,000 archaeal genomes from 152 terrestrial geothermal spring metagenomes // *Sci. Data.* – 2025. – V. 12. – № 1. – P. 151.
 139. Raddadi N., Cherif A., Daffonchio D., Neifar M., Fava F. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – V. 99. – № 19. – P. 7907–7913.
 140. Rafiq M., Hassan N., Rehman M., Hayat M., Nadeem G., Hassan F., Iqbal N., Ali H., Zada S., Kang Y., Sajjad W., Jamal M. Challenges and Approaches of Culturing the Unculturable Archaea // *Biology (Basel).* – 2023. – V. 12. – № 12. – P. 1499.

141. Rekadwad B.N., Li W.-J., Gonzalez J.M., Punchappady Devasya R., Ananthapadmanabha Bhagwath A., Urana R., Parwez K. Extremophiles: the species that evolve and survive under hostile conditions // 3 Biotech. – 2023. – V. 13. – № 9. – P. 316.
142. Robinson D., Hayes A., Couch S., Hvitfeldt E. broom: Convert Statistical Objects into Tidy Tibbles // CRAN: Contributed Packages. – 2014.
143. Rodrigues-Oliveira T., Wollweber F., Ponce-Toledo R.I., Xu J., Rittmann S.K.-M.R., Klingl A., Pilhofer M., Schleper C. Actin cytoskeleton and complex cell architecture in an *Asgard* archaeon // Nature. – 2023. – V. 613. – № 7943. – P. 332–339.
144. Rowe L., Dowd S.E., Davidson K., Kovarik C., VanAken M., Jarabek A., Taylor C. Comparing microbial populations from diverse hydrothermal features in Yellowstone National Park: hot springs and mud volcanoes // Front. Microbiol. – 2024. – V. 15. – P. 1409664.
145. Rozanov A.S., Korzhuk A.V., Shlyakhtun V.N., Shipova A.A., Peltek S.E. Metagenomic data on prokaryotic diversity of Kunashir island geothermal spring // Data Brief. – 2020. – V. 32. – P. 106244.
146. Rozanov A.S., Korzhuk A.V., Shekhovtsov S.V., Vasiliev G.V., Peltek S.E. Microorganisms of two thermal pools on Kunashir island, Russia // Biology (Basel). – 2021. – V. 10. – № 9. – P. 924.
147. Sakai H.D., Nur N., Kato S., Yuki M., Shimizu M., Itoh T., Ohkuma M., Suwanto A., Kurosawa N. Insight into the symbiotic lifestyle of *DPANN* archaea revealed by cultivation and genome analyses // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2022. – V. 119. – № 3. – P. e2115449119.
148. Sakai H.D., Kurosawa N. *Saccharolobus caldissimus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic iron-reducing hyperthermophilic archaeon isolated from an acidic terrestrial hot spring, and reclassification of *Sulfolobus solfataricus* as *Saccharolobus solfataricus* comb. nov. and *Sulfolobus shibatae* as *Saccharolobus shibatae* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2018. – V. 68. – № 4. – P. 1271–1278.

149. Sasaki K., Morita J., Iwaki C., Ueda A. Geochemical evaluation of geothermal resources in Toyama Prefecture, Japan, based on the chemical and isotopic characteristics of hot spring waters // *Geothermics*. – 2021. – V. 93. – P. 102071.
150. Sasaki M. Classification of water types of acid hot-spring waters in Japan // *J. Geotherm. Res. Soc. Japan*. – 2018. – V. 235. – P. 235–243.
151. Satyanarayana T., Littlechild J., Kawarabayasi Y. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. – 974 p.
152. Schleper C., Puehler G., Holz I., Gambacorta A., Janekovic D., Santarius U., Klenk H.P., Zillig W. *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0 // *J. Bacteriol.* – 1995. – V. 177. – № 24. – P. 7050–7059.
153. Schleper C., Rodrigues-Oliveira T. *Asgard* archaea: have we found our microbial ancestors? // *EMBO J.* – 2026. – V. 45. – № 6. – P. 1836–1851.
154. Schmitt E., Coureux P.-D., Kazan R., Bourgeois G., Lazennec-Schurdevin C., Mechulam Y. Recent Advances in Archaeal Translation Initiation // *Front. Microbiol.* – 2020. – V. 11. – P. 584152.
155. Segerer A., Langworthy T.A., Stetter K.O. *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from Solfatara Fields // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1988. – V. 10. – № 2. – P. 161–171.
156. 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. Mol. Sci.* – 2014. – V. 15. – № 9. – P. 16885–16910.
157. Simon S.A., Aschmann V., Behrendt A., Hügler M., Engl L.M., Pohlner M., Rolfes S., Brinkhoff T., Engelen B., Könneke M., Rodriguez-R L.M., Bornemann T.L.V., Nuy J.K., Rothe L., Stach T.L., Beblo-Vranesevic K., Leuko S., Runzheimer K., Möller R., Conrady M., Huth M., Trabold T., Herkendell K., Probst A.J. Earth's most needed uncultivated aquatic prokaryotes // *Water Res.* – 2025. – V. 273. – P. 122928.

158. Sleutel M., Sonani R.R., Miller J.G., Wang F., Gonzalez Socorro A., Chen Y., Martin R., Demeler B., Rudolph M.J., Alva V., Remaut H., Egelman E.H., Conticello V.P. Donor strand complementation and calcium ion coordination drive the chaperone-free polymerization of archaeal cannulae // Nat. Commun. – 2025. – V. 16. – № 1. – P. 9082.
159. Spang A., Caceres E.F., Ettema T.J.G. Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life // Science. – 2017. – V. 357. – № 6351. – P. eaaf3883.
160. Sriaporn C., Campbell K.A., Kranendonk M.J. Van, Handley K.M. Bacterial and archaeal community distributions and cosmopolitanism across physicochemically diverse hot springs // ISME Commun. – 2023. – V. 3. – № 1. – P. 80.
161. Stahl D.A., Armann R. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. – New York: Wiley, 1991. – P. 205–248.
162. Stetter K.O. History of discovery of the first hyperthermophiles // Extremophiles. – 2006. – V. 10. – № 5. – P. 357–362.
163. Straub C.T., Counts J.A., Nguyen D.M.N., Wu C.-H., Zeldes B.M., Crosby J.R., Conway J.M., Otten J.K., Lipscomb G.L., Schut G.J., Adams M.W.W., Kelly R.M. Biotechnology of extremely thermophilic archaea // FEMS Microbiol. Rev. – 2018. – V. 42. – № 5. – P. 543–578.
164. Sun Y., Liu Y., Pan J., Wang F., Li M. Perspectives on Cultivation Strategies of Archaea // Microb. Ecol. – 2020. – V. 79. – № 3. – P. 770–784.
165. Suzina N.E., Machulin A.V., Sorokin V.V., Polivtseva V.N., Esikova T.Z., Shorokhova A.P., Delean Y.A., Abashina T.N. Capture of Essential Trace Elements and Phosphate Accumulation as a Basis for the Antimicrobial Activity of a New Ultramicrobacterium – *Microbacterium lacticum* Str. F2E // Microorganisms. – 2022. – V. 10. – № 1. – P. 128.
166. Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M. Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing // PLoS One. – 2014. – V. 9. – № 8. – P. e105592.

167. Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama H., Nakagawa S., Nunoura T., Horikoshi K. Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – V. 105. – № 31. – P. 10949–10954.
168. Taran Y., Ryabinin G., Pokrovsky B., Malik N., Cienfuegos E. Methane-rich thermal and mineral waters of the Avachinsky Depression, Kamchatka // *Appl. Geochem.* – 2022. – V. 145. – P. 105414.
169. Terpe K. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – V. 97. – № 24. – P. 10243–10254.
170. Tobiasson V., Luo J., Wolf Y.I., Koonin E.V. Dominant contribution of *Asgard* archaea to eukaryogenesis // *Nature*. – 2026. – V. 650. – № 8100. – P. 141–149.
171. Toshchakov S.V., Izotova A.O., Vinogradova E.N., Kachmazov G.S., Tuaeva A.Y., Abaev V.T., Evteeva M.A., Gunitseva N.M., Korzhenkov A.A., Elcheninov A.G., Patrushev M.V., Kublanov I.V. Culture-Independent Survey of Thermophilic Microbial Communities of the North Caucasus // *Biology (Basel)*. – 2021. – V. 10. – № 12. – P. 1352.
172. Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae* I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 1964. – V. 30. – № 1. – P. 225–238.
173. Turner P., Mamo G., Karlsson E.N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining // *Microb. Cell Fact.* – 2007. – V. 6. – № 1. – P. 9.
174. Valenti A., Perugini G., Rossi M., Ciaramella M. Positive supercoiling in thermophiles and mesophiles: of the good and evil // *Biochem. Soc. Trans.* – 2011. – V. 39. – № 1. – P. 58–63.

175. Valentine D.L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea // Nat. Rev. Microbiol. – 2007. – V. 5. – № 4. – P. 316–323.
176. Vilhelmsson O., Sigurbjornsdottir M.A., Thorsteinsdottir G.V., Cascone M., Corso D., Tonietti L., Migliaccio F., Nappi N., Ricciardelli A., Selci M., Montemagno F., Barosa B., Bastoni D., Bastianoni A., Cordone A., Giovannelli D. Diversity of Thermophilic Prokaryotes. – Cham: Springer, 2023. – P. 21–90.
177. Vosseberg J., Hooff J.J.E. van, Köstlbacher S., Panagiotou K., Tamarit D., Ettema T.J.G. The emerging view on the origin and early evolution of eukaryotic cells // Nature. – 2024. – V. 633. – № 8029. – P. 295–305.
178. Wang J., Liu Y., Yang Y., Bao C., Cao Y. High-level expression of an acidic thermostable xylanase in *Pichia pastoris* and its application in weaned piglets // J. Anim. Sci. – 2020. – V. 98. – № 1. – P. skz364.
179. Wickham H. ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis. – Cham: Springer International Publishing, 2016. – 260 p.
180. Williams T.A., Cox C.J., Foster P.G., Szöllősi G.J., Embley T.M. Phylogenomics provides robust support for a two-domains tree of life // Nat. Ecol. Evol. – 2019. – V. 4. – № 1. – P. 138–147.
181. Wirajana I.N., Vaghamshi N., Ariantari N.P., Sawur A.B., Ratnayani K., Antaliya K., Atara S., Ghelani A., Dudhagara D., Dudhagara P. Hot Springs as Reservoirs of Valuable Microbes, Metabolites, and Minerals with Ecological, Biotechnological and Bioeconomic Perspectives // Bacteria. – 2026. – V. 5. – № 1. – P. 12.
182. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1990. – V. 87. – № 12. – P. 4576–4579.
183. Wolferen M. van, Pulschen A.A., Baum B., Gribaldo S., Albers S.-V. The cell biology of archaea // Nat. Microbiol. – 2022. – V. 7. – № 11. – P. 1744–1755.
184. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of Methane by Bacterial Extracts // J. Biol. Chem. – 1963. – V. 238. – № 8. – P. 2882–2886.

185. Wollweber F., Xu J., Ponce-Toledo R.I., Marxer F., Rodrigues-Oliveira T., Pössnecker A., Luo Z.-H., Malit J.J.L., Kokhanovska A., Wieczorek M., Schleper C., Pilhofer M. Microtubules in *Asgard* archaea // *Cell*. – 2025. – V. 188. – № 9. – P. 2451–2464.e26.
186. Wong T.K.F., Ly-Trong N., Ren H., Demotte P., Baños H., Roger A.J., Susko E., Bielow C., Maio N. De, Goldman N., Hahn M.W., Reis M. dos, Vinh L.S., Huttley G., Lanfear R., Minh B.Q. IQ-TREE 3: phylogenomic inference software using complex evolutionary models // *Mol. Biol. Evol.* – 2026. – V. 43. – № 5. – P. msag117.
187. Yamashiro K., Yamagishi A. Characterization of the DNA Gyrase from the Thermoacidophilic Archaeon *Thermoplasma acidophilum* // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187. – № 24. – P. 8531–8536.
188. Yamori Y., Hamakawa M., Hidese R., Fukuda M., Atomi H., Fukuda W., Fujiwara S. Branched-chain polyamine stabilizes RNA polymerase at elevated temperatures in hyperthermophiles // *Amino Acids*. – 2020. – V. 52. – № 2. – P. 275–285.
189. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. – 2012. – V. 13. – № 1. – P. 134.
190. Yoshitake K., Mori K., Ishibashi J.-I., Yanagawa K. Ecological distribution and environmental preference of the deep-branching archaeal lineage in high-temperature hot springs of Central Kyushu, Japan // *Extremophiles*. – 2026. – V. 30. – № 1. – P. 3.
191. Zaremba-Niedzwiedzka K., Caceres E.F., Saw J.H., Bäckström D., Juzokaite L., Vancaester E., Seitz K.W., Anantharaman K., Starnawski P., Kjeldsen K.U., Stott M.B., Nunoura T., Banfield J.F., Schramm A., Baker B.J., Spang A., Ettema T.J.G. *Asgard* archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity // *Nature*. – 2017. – V. 541. – № 7637. – P. 353–358.
192. Zayulina K.S., Frolov E.N., Stracke C., Klyukina A.A., Khusnutdinova A.N., Stogios P., Skarina T., Yakunin A.F., Golyshin P.N., Siebers B., Shugaeva T.E., Kublanov I.V. Structural and functional insights into extreme thermal stability and

- activity of two GH 12 domains of a multidomain glycosidase from a hyperthermophilic euryarchaeon // FEBS J. – 2025. – V. 292. – № 14. – P. 3771–3794.
193. Zeldes B.M., Keller M.W., Loder A.J., Straub C.T., Adams M.W.W., Kelly R.M. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – P. 1209.
 194. Zeng X., Birrien J.-L., Fouquet Y., Cherkashov G., Jebbar M., Querellou J., Oger P., Cambon-Bonavita M.-A., Xiao X., Prieur D. *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life // ISME J. – 2009. – V. 3. – № 7. – P. 873–876.
 195. Zharkov R.V. Thermal springs of the South Kuril Islands: monograph. – Vladivostok: Dalnauka, 2014. – 378 p.
 196. Zharkov R.V. Active Volcanoes and Thermal Springs of Kunashir Island (Russia) // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – Bristol: Institute of Physics Publishing. – 2020. – V. 459. – № 2. – P. 022039.
 197. Zhu C., Guo G., Ma Q., Zhang F., Ma F., Liu J., Xiao D., Yang X., Sun M. Diversity in S-layers // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 2017. – V. 123. – P. 1–15.
 198. Zou D., Qi Y., Zhou J., Liu Y., Li M. Unveiling the life of archaea in sediments: Diversity, metabolic potentials, and ecological roles // iMetaOmics. – 2025. – V. 2. – № 1. – P. e56.

Приложения

Приложение А (обязательное)

физико-химические параметры и химический состав проб горячих источников Курил, 2023 год. Цитируется по [Karaseva et al., 2024], с изменениями.

Проба	Т, °С	рН	Мин-я, мг/л	Ж-ть, мЭКВ/л	Ионы, мг/л											Еh, мВ	H ₂ S, мм	Fe, % в осадках	
					CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻				PO ₄ ³⁻
4402.1	54.5	7.46	3049	12.5	0	317	567	1093	235.7	8.8	780	47.5	0.83	0	0	0.13	70	0	0.14
4402.2	54.5	7.46	3049	12.5	0	317	567	1093	235.7	8.8	780	47.5	0.83	0	0	0.13	70	0	0.14
4403	46	6.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
4404	65	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	180	-	-
4405	94	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4407	57	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	190	-	-
4409	45	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-
4412	69	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-
4413	60	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	240	-	-
4414	68	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
4416	56.4	6.3	1453	4.7	0	49	171	739	72.9	12.6	378	30.2	0.65	0	0.86	0.35	40	0	8.31
4417	52	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-
4418	79	7.6	2916	4.9	9.6	39	65	1750	96.2	0.7	900	65.2	0.32	0	0	0.35	30	0	9.21
4421	55.4	2.8	747	2.5	0	0	449	148	43.4	4.3	79.7	10.6	3.5	0	0	0.31	200	0.19	2.22
4423	67.5	6.3	860	7.5	0	317	270	35.8	111.3	24.1	91.4	10.5	0.22	0	0	0.28	-50	3.89	1.02
4425	41	2.7	268	0.4	0	0	224	18	5	1.9	8.5	3.7	14.5	0	0.21	0.15	30	0	6.69
4428	55	2.9	174	0.6	0	0	136	13	8.5	2.5	9.2	0.8	0.43	0.03	0.17	0.14	180	0.95	3.35
4430	64	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-60	-	-
4431	50	3.1	777	4.8	0	0	360	170	84.8	6.8	142	8.8	0.43	0	0	0	50	0	-
4432	40	5.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70	-	-
4433	48	3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-
4436	45.1	3.6	588	4.1	0	0	300	102	72.7	5.8	97.7	7	0.44	0	0	0	0	0.16	14.8
4438	53	6.2	870	7	0	59	400	132	131.3	5	133	9.8	0.15	0	0	0.05	100	0	40.1
4439	64.7	6.1	1717	2.2	0	49	28	966	40.1	2	572	60	0.28	0	0	0.16	30	0	4.97

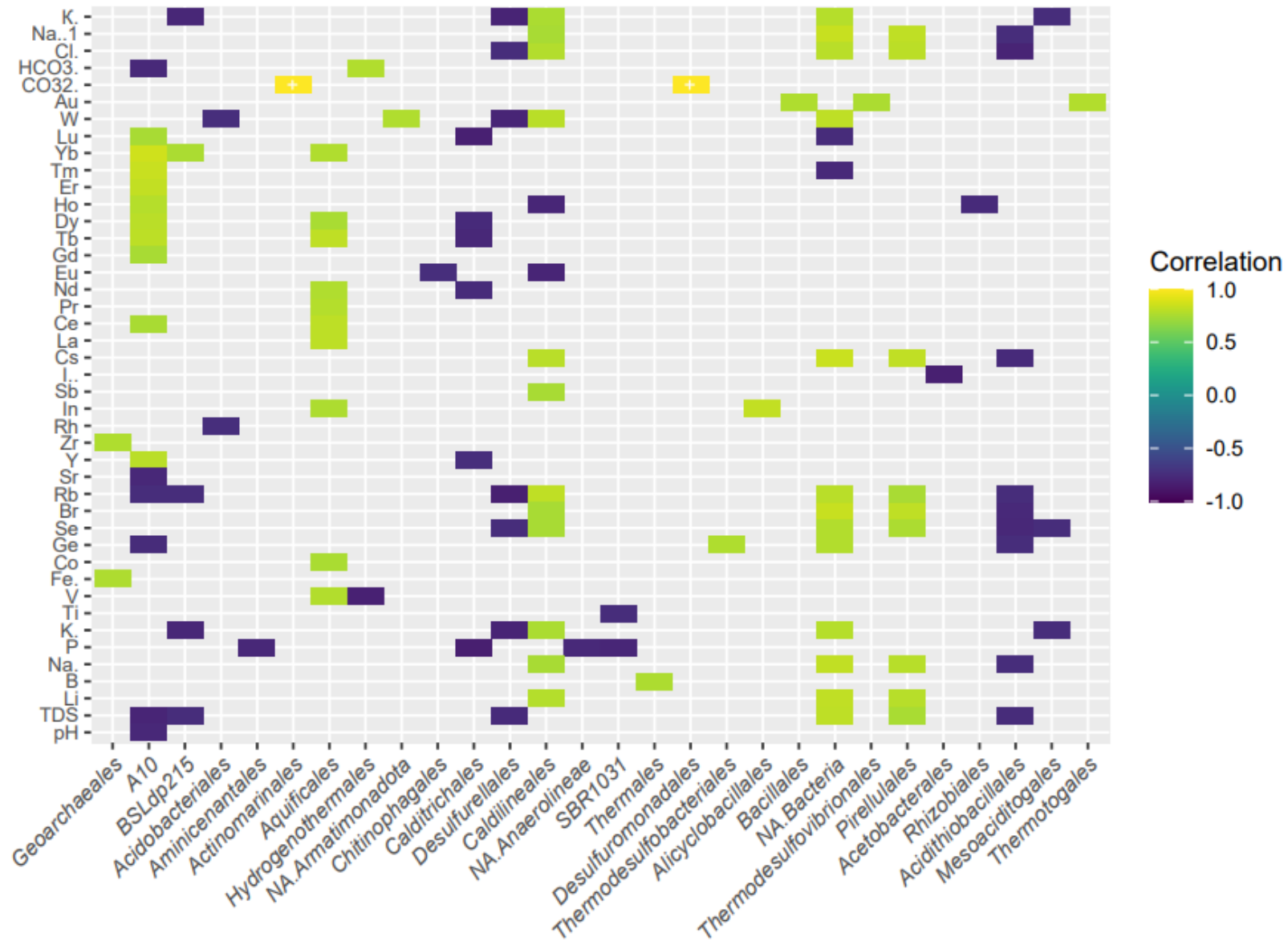
4440	65.4	6.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-
4441	48.2	7.6	2035	1.5	0	78	19	1138	27.5	1.1	690	81.8	0.03	0.16	2.17	0.16	40	0	2.89
4443	63	1.8	-	-													40	-	-
4444	50	2.9	633	4.2	0	0	406	103	55.1	17.6	25.8	3.2	0.15	0	0.1	0.44	-30	3.96	5.25
4445	67.3	6.3	1778	5.2	0	73	350	700	90.7	7.9	520	36.5	0.56	0.08	0	0.06	50	0	2.82
4446	57	6.3	1843	4.5	0	312	237	656	78.8	7	520	32.5	0.8	0	0	0.07	-40	0	3.07
4447	60	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-
4448	42	8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70	-	-
4449	74.5	6.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-
4450	62	6.2	1133	2.8	0	190	142	409	48	4.7	320	19	1.73	0.02	0.23	0	-	0	3.79

Приложение В (обязательное)
физико-химические параметры и химический состав проб горячих источников Камчатки, 2025 год.

Проба	Т, °С	рН	Мин-я, мг/л	Ж-ть, мэкв/л	Ионы, мг/л										Еh, мВ	H ₂ S, мМ	Fe+Al
					CO ₃ ²⁻ (титр-е)	HCO ₃ ⁻ (титр-е)	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺			
4801	60.0	6.1	943	2.7	0	553.0	468.5	70.6	135.9	28.6	15.2	208.3	13.7	1.8	-130	1.2	-
4802	47.0	5	522	1.0	0	90.0	0.0	259	98.7	15.5	2.2	120.7	10.0	15.3	-250	2.4	-
4803	69.0	6.1	492	2.3	0	129.0	73.8	123	129.1	40.9	3.4	107.5	8.15	6.2	-275	1.3	-
4805	70.0	4.3	1077	2.7	0	39.0	0.0	289	400.7	47.8	3.6	310.6	8.02	17.3	-192	1.6	-
4806	68.0	5.8	496	1.6	0	126.0	1.8	189	131.3	28.1	2.9	133.0	5.79	4.0	-250	1.3	-
4807	93.8	5.4	897	1.4	-	-	1.2	601	59.5	18.1	6.6	73.4	5.58	131.2	-248	1.3	-
4809	68.0	2.1	1812	1.7	-	-	0.0	927	295.6	29.8	2.4	252.4	6.44	17.2	-175	1.4	281.3
4810	74.0	5.1	714	1.4	0	55.0	0.0	144	303.3	25.4	1.0	225.8	3.67	10.3	-264	1.2	-
4811	63.0	4	183	0.9	0	43.0	0.0	130	5.4	14.7	2.2	8.0	4.16	18.2	-130	1.4	-
4812	30.5	2.8	567	0.6	-	-	0.0	381	14.2	7.3	3.3	41.5	2.35	7.7	-115	1.3	109.6
4813	68.0	3.9	302	2.1	-	-	0.0	226	0.0	32.4	6.1	7.2	3.03	27.0	-133	1.3	-
4815	49.0	3.7	189	1.8	-	-	0.0	131	0.6	30.9	2.8	7.8	3.96	11.1	9	1.2	-
4816	92.0	3.8	877	2.1	-	-	0.0	657	11.1	24.9	10.6	34.3	7.78	131.4	-80	1.2	-
4817	86.0	5.1	692	0.5	0	72.0	0.0	159	274.0	6.7	2.0	225.0	12.6	12.4	-220	1.2	-
4818	96.0	7.7	1687	1.6	25.8	87.0	43.9	207	810.5	26.7	3.7	575.8	19.1	0.2	-363	1.2	-
4819	70.0	5.1	684	0.6	0	75.0	0.0	162	283.6	9.7	1.4	207.4	10.9	8.8	-300	1.2	-
4821	94.0	8	1066	0.7	36	106.0	68.3	123	498.0	10.7	2.0	350.5	13.3	0.2	-380	1.2	-
4822	55.0	8.3	1140	0.8	28.2	92.0	74.4	131	529.2	12.8	2.2	377.7	13.1	0.0	-150	1.4	-
4823	64.0	5.4	3856	1.6	0	52.0	0.0	87.9	2251.9	17.2	8.5	1445.2	45.2	0.0	-196	1.4	-
4824	51.0	4.2	3192	2.1	0	57.0	0.0	110	1824.7	26.0	9.6	1184.2	37.3	0.0	-130	1.5	-
4825	60.0	3.6	3646	2.0	0	0.0	0.0	134	2108.4	26.6	8.2	1332.1	37.3	0.0	-110	1.4	-
4826	68.0	5.7	1170	1.3	0	88.0	0.0	510	313.9	20.2	3.2	210.1	9.54	102.4	-270	1.6	-
4828	49.0	6.4	320	2.1	0	232.0	67.1	150	12.7	27.7	8.3	39.7	5.07	9.8	-360	1.7	-
4829	68.0	5.9	444	1.7	0	140.0	0.0	308	8.9	30.6	2.1	40.5	9.92	43.6	-320	1.5	-
4830	56.0	3.7	321	2.0	0	0.0	0.0	230	1.2	33.5	3.9	10.9	3.54	16.8	-135	1.9	21.8
4832	64.0	5.9	1094	2.2	0	115.0	0.0	195	486.7	36.0	4.9	346.3	16.3	8.9	-277	1.8	-
4834	21.5	6	853	4.0	-	-	468.5	148	24.1	26.8	33.0	143.3	8.56	0.2	-15	1.4	-
4835	70.0	5.8	260	1.2	-	-	92.7	70.9	22.4	15.5	5.2	39.4	8.49	5.4	-328	2.2	-
4836	37.5	4.6	256	2.3	-	-	1.8	164	9.3	39.0	4.6	27.3	5.85	3.3	-140	1.4	-

Приложение С (обязательное)

Ранговые корреляции Спирмена между относительной численностью порядков прокариот и параметрами источников. Показаны значимые парные корреляции (р-значение < 0,05); «+» указывает на р-значение < 0,01. Цитируется по [Karaseva et al., 2024], с изменениями.



Приложение D (обязательное)

элементный состав проб горячих источников Курил, 2023 год. Цитируется по [Karaseva et al., 2024], с изменениями. Знак «<» обозначает показатель, находящийся ниже количественного предела обнаружения.

Источники №№4402 – 4431								
Эл-т, мкг/л	4402	4416	4418	4421	4423	4425	4428	4431
Li	796.58	318.62	907.46	30.38	32.55	0.69	0.58	143.79
Be	0.36	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.31
B	8593.93	8391.77	8739.04	4882.95	622.72	13.34	-0.70	807.36
Na	657432.50	343717.80	789759.63	79708.74	91351.09	8508.03	9195.62	142243.09
Mg	8789.91	12636.91	723.78	4255.66	24061.42	1891.89	2495.92	6762.46
Al	2.91	8.44	21.97	5289.50	116.51	4026.20	2068.23	3731.76
Si	42756.57	47584.26	61611.75	91032.88	79674.49	24024.26	25781.44	25254.93
P	19.85	7.80	10.21	17.87	93.10	18.23	30.17	15.01
K	47519.65	30215.58	65154.04	10591.83	10451.56	3660.24	798.48	8756.03
Ca	235719.45	72900.72	96248.25	43379.07	111268.45	5010.79	8474.27	84793.27
Sc	1.85	2.46	2.57	6.83	3.89	2.35	2.05	2.35
Ti	2.86	1.69	2.31	18.21	2.05	3.20	2.59	1.24
V	1.19	1.75	2.90	21.42	1.01	31.27	8.92	6.15
Cr	4.17	0.62	0.17	0.35	7.33	6.30	1.33	0.62
Mn	462.82	1541.21	23.39	268.00	1204.89	93.39	68.76	703.00
Fe	346.26	1406.59	162.70	3625.85	150.26	17048.18	2494.80	875.08
Co	0.06	0.15	0.02	0.49	0.04	3.78	0.51	0.38
Ni	0.57	0.77	1.56	1.51	0.49	4.26	0.35	1.48
Cu	0.31	0.32	0.45	0.73	0.10	7.27	0.83	0.31
Zn	1.18	2.60	<	32.29	0.68	17.80	87.60	69.02
Ga	0.05	0.08	0.95	0.26	0.15	0.32	0.11	0.16
Ge	16.60	4.73	7.60	3.89	4.33	0.13	0.11	5.36
As	314.57	386.64	862.83	179.26	89.75	7.74	3.55	30.72
Se	10.78	4.43	12.43	2.52	1.24	0.67	1.43	2.19
Br	3419.42	1494.41	4744.37	219.80	96.24	55.59	71.85	457.45
Rb	244.03	128.05	232.10	26.55	25.75	1.36	1.04	24.59
Sr	2697.27	516.80	1005.65	190.20	364.58	22.21	28.01	222.16
Y	0.06	0.03	0.03	6.18	0.12	1.12	0.67	3.10
Zr	0.04	0.02	0.01	0.11	0.00	0.10	0.08	0.00

Nb	<	<	<	<	0.00	0.00	0.00	0.00
Mo	0.02	1.11	5.09	0.01	0.19	0.06	0.03	0.01
Ru	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rh	0.07	0.01	0.03	0.01	0.01	<	<	0.00
Pd	<	0.01	0.01	0.01	<	<	<	<
Ag	<	0.00	0.13	0.00	0.00	0.09	0.01	0.01
Cd	<	0.00	<	0.08	0.00	0.06	0.00	0.06
In	<	<	<	0.04	<	0.01	0.00	0.01
Sn	<	0.00	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
Sb	0.79	0.31	26.76	0.58	0.14	0.06	0.06	0.05
Te	0.02	0.01	0.01	0.07	<	<	0.07	0.05
I	195.44	4977.07	1400.30	514.01	79.65	<	<	1459.57
Cs	204.54	53.32	93.28	7.77	3.87	0.22	0.56	19.96
Ba	58.19	82.50	5.89	56.11	103.77	42.58	11.77	35.00
La	0.02	0.00	0.01	0.35	0.01	0.06	0.04	0.07
Ce	0.03	0.01	0.01	1.25	0.03	0.17	0.16	0.22
Pr	0.01	0.00	0.00	0.25	0.00	0.04	0.03	0.05
Nd	0.02	0.01	0.00	1.38	0.01	0.23	0.17	0.24
Sm	0.02	0.00	<	0.73	0.01	0.12	0.05	0.14
Eu	0.01	0.01	<	0.27	0.02	0.03	0.02	0.07
Gd	0.01	0.00	0.00	0.99	0.01	0.16	0.08	0.36
Tb	0.00	<	0.00	0.19	0.00	0.03	0.01	0.08
Dy	0.00	0.00	0.00	1.07	0.02	0.21	0.12	0.58
Ho	<	0.00	0.00	0.22	0.00	0.05	0.02	0.13
Er	0.00	0.00	0.00	0.66	0.01	0.13	0.07	0.31
Tm	<	<	<	0.08	0.00	0.02	0.01	0.05
Yb	0.00	0.00	0.00	0.55	0.00	0.13	0.06	0.26
Lu	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.03	0.01	0.05
Hf	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ta	0.01	<	<	<	0.02	0.00	0.00	0.00
W	6.19	0.79	3.87	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00
Re	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Os	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ir	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pt	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Au	0.00	0.01	0.00	<	0.01	<	<	<

Hg	0.28	0.21	0.27	0.21	<	1.13	0.71	0.10
Tl	0.05	0.03	2.14	0.15	<	<	<	0.05
Pb	0.18	0.26	0.46	4.84	<	1.09	0.07	0.31
Bi	-0.01	<	<	<	<	0.01	0.00	0.00
Th	0.00	<	<	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00
U	<	<	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01

Источники №№ 4436 – 4450

Эл-т, мкг/л	4436	4438	4439	4441	4444	4445	4446	4450
Li	117.05	102.47	407.10	449.18	10.84	282.14	257.47	154.27
Be	0.08	0.16	0.00	0.08	0.08	0.00	0.08	0.00
B	589.23	697.93	630.93	631.63	46.60	591.57	900.32	543.58
Na	97694.52	133084.99	571599.05	605505.70	25810.77	519741.86	467289.83	285233.78
Mg	5760.13	5007.18	1955.75	1060.85	17583.36	7933.08	7004.99	4655.70
Al	2028.41	1.01	33.24	2.38	16827.35	5.33	5.37	1.99
Si	20700.91	18540.31	45347.02	54600.23	53609.46	36183.70	30177.48	22136.14
P	21.78	16.78	12.59	10.65	126.51	13.88	3.58	0.14
K	7030.69	9823.44	59975.94	81799.57	3223.59	36502.94	32477.34	19017.38
Ca	72743.89	131261.05	40102.25	27484.35	55073.39	90685.79	78824.54	48040.81
Sc	1.91	0.87	1.90	2.52	6.62	1.63	1.30	0.91
Ti	2.16	1.24	2.05	1.51	2.43	1.47	1.48	0.81
V	7.53	0.56	4.72	4.15	26.65	2.49	3.10	2.06
Cr	1.50	0.84	1.43	0.98	3.81	5.29	4.10	3.00
Mn	652.84	602.94	101.33	66.00	564.34	424.28	384.63	4.89
Fe	2144.59	171.42	163.34	54.91	2622.39	117.09	96.76	59.23
Co	0.27	0.03	0.10	0.01	0.27	0.01	0.01	<
Ni	1.02	0.39	1.20	2.39	1.44	2.22	1.58	1.49
Cu	0.19	<	0.25	0.06	0.11	0.13	0.07	0.05
Zn	21.42	<	1.09	<	11.92	<	<	<
Ga	0.04	0.02	0.06	0.09	2.46	0.02	0.04	0.00
Ge	3.01	3.18	7.16	6.93	1.19	8.78	7.48	5.17
As	47.23	33.10	154.97	195.35	1.48	5.98	1.71	2.62
Se	1.05	1.52	9.52	9.90	0.95	5.81	5.00	3.14
Br	306.08	373.12	2845.65	3292.16	96.86	1934.17	1968.07	1271.47
Rb	17.25	21.20	217.55	298.71	7.39	102.72	82.02	49.84

[illegible]

Ir	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Pt	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Au	<	<	0.00	0.00	0.00	<	<	<
Hg	0.11	0.04	0.31	0.14	<	<	0.57	0.16
Tl	<	<	0.18	0.33	<	0.05	<	0.00
Pb	0.29	<	0.22	0.19	0.07	0.09	0.09	0.16
Bi	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Th	<	<	-0.01	0.00	0.06	<	0.00	0.00
U	0.01	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00

Приложение Е (обязательное)

элементный состав проб горячих источников Камчатки, 2025 год. Знак «<» обозначает показатель, находящийся ниже количественного предела обнаружения.

Источники №№ 4801 – 4818														
Эл-т, мкг/л	4801	4802	4803	4805	4806	4807	4809	4810	4811	4812	4813	4815	4816	4818
Li	294.73	80.59	60.33	748.70	90.83	94.20	49.39	73.71	1.42	3.21	7.41	11.13	64.57	2111.16
B	3334.42	2523.64	3806.97	11298.73	4472.75	10849.86	9320.82	9001.03	20.28	781.54	5.18	25.10	277.59	11951.63
P	97.31	78.11	91.25	27.73	71.69	23.74	66.22	36.43	24.75	82.18	38.08	25.36	31.31	29.99
V	0.88	1.26	1.26	2.78	0.85	2.09	30.29	2.82	2.16	31.46	1.21	0.42	5.10	6.57
Fe	1310.28	274.41	<	<	<	203.08	9361.87	99.41	10920.38	10754.96	144.12	723.64	8118.88	<
Co	0.24	0.06	0.02	0.03	0.01	0.06	2.22	0.02	0.05	1.26	0.02	0.56	0.30	0.03
Ni	1.01	0.42	0.35	0.48	0.32	1.19	0.95	0.21	0.25	0.68	0.32	0.35	0.44	0.37
Cu	0.53	0.45	0.35	0.33	0.36	0.46	1.60	0.36	0.35	0.51	0.45	1.89	0.58	0.44
Zn	16.53	5.09	3.46	11.23	9.46	39.18	108.76	5.61	4.14	54.32	17.19	35.70	202.07	1.91
Ga	<	0.03	0.03	0.03	0.01	0.07	1.86	0.07	<	0.75	0.01	0.01	0.05	1.32
As	50.22	1.34	63.76	222.29	39.93	11.79	196.00	548.02	7.26	14.24	1.92	0.74	15.83	947.72
Rb	39.40	20.57	26.14	49.49	18.58	19.72	18.20	22.20	3.60	6.44	11.06	11.97	33.45	232.04
Sr	196.84	39.78	58.71	83.96	34.81	46.11	65.52	30.66	28.40	36.24	82.36	75.50	189.85	117.80
Y	0.01	0.08	0.04	0.25	0.04	0.22	4.10	0.11	0.40	3.03	0.73	0.28	10.89	<
Mo	0.18	<	0.08	0.29	0.02	0.02	0.04	1.13	0.13	0.02	0.04	0.02	0.15	32.85
Sb	0.69	0.21	0.50	0.21	0.50	2.30	0.05	13.23	0.38	0.13	0.05	0.03	0.45	60.88
Cs	14.19	6.92	7.48	13.05	3.78	7.65	5.71	26.33	0.58	1.96	3.05	4.82	31.85	223.09
Ba	158.47	55.48	51.05	28.59	59.36	26.07	55.17	27.23	53.53	42.74	153.14	109.73	17.99	3.77
La	<	<	<	0.02	<	0.01	1.30	<	0.05	0.61	0.04	0.07	0.52	<
Ce	<	<	<	0.08	<	<	3.40	<	0.15	1.94	0.14	0.23	2.14	<
Pr	<	<	<	0.01	<	<	0.52	<	0.03	0.30	0.03	0.04	0.46	<
Nd	<	0.02	<	0.08	<	0.03	2.58	0.02	0.16	1.57	0.22	0.19	2.93	<
Sm	<	<	<	0.02	<	0.01	0.65	0.01	0.04	0.46	0.10	0.05	1.18	<
Eu	0.02	0.01	<	0.01	<	<	0.18	0.01	0.02	0.14	0.05	0.03	0.37	<
Gd	<	0.01	<	0.04	<	0.02	0.75	0.01	0.06	0.54	0.15	0.07	1.64	<
Tb	<	<	<	0.01	<	<	0.13	<	0.01	0.10	0.03	0.01	0.32	<
Dy	<	0.01	0.01	0.04	<	0.02	0.79	0.02	0.07	0.62	0.20	0.06	2.03	<

Ho	<	<	<	0.01	<	<	0.18	<	0.02	0.14	0.05	0.01	0.45	<
Er	<	0.01	<	0.02	0.00	0.01	0.50	0.01	0.05	0.38	0.15	0.03	1.18	<
Tm	<	<	<	<	<	<	0.07	<	0.01	0.06	0.03	<	0.18	<
Yb	<	0.01	<	0.02	0.01	0.01	0.48	0.01	0.05	0.38	0.24	0.03	1.07	<
Lu	<	<	<	<	<	<	0.08	<	0.01	0.06	0.04	<	0.17	<
Pb	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.93	0.01	0.03	0.26	0.01	0.16	0.04	0.02
Th	<	<	<	<	<	<	0.19	<	<	<	<	<	<	<
U	<	<	<	<	<	<	0.08	<	0.01	0.04	0.01	0.04	0.15	<
Источники №№ 4819 – 4836														
Эл-т, мкг/л	4819	4817	4821	4823	4824	4825	4826	4828	4829	4830	4832	4834	4835	4836
Li	823.28	865.10	1727.58	8466.73	7200.55	9579.67	1025.42	49.17	43.19	3.99	1721.02	110.12	43.84	30.87
B	5114.20	4755.50	8758.30	63165.69	57939.11	83083.25	12251.79	548.84	429.09	25.74	18477.54	681.36	939.14	560.66
P	393.24	83.15	29.19	28.19	23.82	145.61	41.46	93.27	25.06	35.72	44.12	260.05	152.34	96.74
V	2.72	2.78	3.26	15.02	13.33	20.18	2.53	0.19	0.30	9.75	4.09	2.83	0.26	0.98
Fe	418.85	404.74	<	<	<	545.02	<	<	<	650.41	207.10	<	<	412.65
Co	0.14	0.03	0.02	0.04	0.04	0.22	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05	0.01	0.02
Ni	0.43	0.26	0.31	0.52	0.51	0.92	0.39	0.41	0.47	0.27	0.42	1.10	0.32	0.36
Cu	0.46	0.46	0.28	0.11	0.07	1.15	<	0.22	1.26	6.99	<	0.74	0.37	0.34
Zn	59.93	34.88	5.28	18.12	42.08	81.66	4.11	3.15	3.57	45.13	4.66	7.77	2.30	7.59
Ga	0.03	0.04	1.80	0.13	<	0.08	0.05	0.09	0.03	0.02	0.19	<	0.03	0.01
As	234.41	190.02	675.08	6260.07	1965.86	6876.34	66.58	2.65	0.74	0.42	68.67	11.29	0.09	17.85
Rb	82.95	79.03	131.56	500.50	370.50	500.77	49.30	8.27	19.04	8.06	80.60	10.71	21.31	14.28
Sr	40.44	78.13	125.26	179.66	154.44	266.32	120.02	104.84	155.49	24.35	123.03	128.80	55.52	83.67
Y	0.29	0.68	<	<	0.18	0.28	0.10	<	0.02	1.31	0.04	0.42	0.02	0.61
Mo	2.82	5.31	27.06	1.77	0.45	3.42	0.02	0.02	<	<	0.06	0.08	0.01	0.02
Sb	5.38	11.86	31.45	158.09	0.09	260.49	0.10	0.01	0.05	0.01	0.25	0.07	<	0.01
Cs	68.60	65.47	140.70	426.59	336.23	443.62	60.42	2.46	6.61	1.90	100.21	0.99	1.60	3.76
Ba	13.28	10.48	4.52	149.40	100.05	451.80	69.15	107.78	137.05	59.78	78.01	60.47	74.24	50.60
La	0.04	<	<	<	0.05	0.08	0.03	<	<	0.29	<	0.05	<	0.08
Ce	0.13	0.03	<	<	0.14	0.24	0.05	<	<	0.76	<	<	<	0.24
Pr	0.02	0.01	<	<	0.02	0.03	<	<	<	0.12	<	0.02	<	0.04
Nd	0.14	0.11	<	<	0.10	0.26	0.02	<	<	0.62	<	0.08	<	0.24

Sm	0.04	0.06	<	<	0.02	0.05	<	<	<	0.19	<	0.02	<	0.07
Eu	0.01	0.02	<	0.01	0.01	0.06	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	0.03
Gd	0.05	0.10	<	<	0.02	0.08	0.01	<	<	0.24	<	0.03	<	0.10
Tb	0.01	0.02	<	<	<	0.01	<	<	<	0.04	<	0.01	<	0.02
Dy	0.06	0.11	<	0.01	0.04	0.05	0.01	<	<	0.25	<	0.04	<	0.10
Ho	0.01	0.02	<	<	0.01	0.01	<	<	<	0.06	<	0.01	<	0.02
Er	0.03	0.07	<	<	0.02	0.02	0.01	<	<	0.16	<	0.03	<	0.07
Tm	0.00	0.01	<	<	<	<	<	<	<	0.02	<	<	<	0.01
Yb	0.03	0.05	<	0.01	0.04	0.04	0.00	<	<	0.14	0.01	0.03	<	0.06
Lu	<	0.01	<	<	<	<	<	<	<	0.02	<	0.00	<	0.01
Pb	0.04	0.01	0.06	0.06	0.04	0.26	0.02	0.03	0.05	0.63	0.08	0.04	0.01	0.05
Th	<	<	<	<	<	0.02	<	<	<	<	<	<	<	<
U	<	<	<	<	<	0.01	<	<	<	<	<	0.57	<	<