

Филогенетический анализ микробного мата в горячем источнике Гарга (Байкальская рифтовая зона) и разнообразии природных пептидаз

Е.В. Лаврентьева^{1, 2}, А.А. Раднагуруева¹, Т.Г. Банзаракцаева¹, С.М. Базаров¹, Д.Д. Бархутова¹, И.Д. Ульзетуева³, М.К. Чернявский⁴, М.Р. Кабилов⁵, В.В. Хахинов²

¹ Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, Россия

² Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

³ Байкальский институт природопользования Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, Россия

⁴ Геологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Улан-Удэ, Россия

⁵ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

В настоящее время в микробной экологии активно применяются методы метагеномного анализа, которые позволяют охарактеризовать таксономический состав и разнообразие микробных сообществ. Гидролитические бактерии, в частности протеолитики, в горячих источниках занимают нишу первичных деструкторов, благодаря способности секретировать ферменты, активные в широких диапазонах значений pH и температур. Целью данной работы было определение таксономического состава, структуры бактериального микробного мата и выявление пептидаз в термофильном микробном сообществе Гарга. Гидрохимический анализ воды показал высокое содержание сульфатов – 390 мг/дм³. В микроэлементном составе воды отмечены повышенные концентрации В, Rb, Li, Ba и Sr. Проведен анализ таксономического разнообразия микробного мата в горячем источнике Гарга, в температурной зоне 54 °С. Структура микробного мата представлена разнообразными филогенетическими группами мезофильных и термофильных бактерий с различными метаболическими и экологическими функциями. Наибольшую долю в сообществе составил филум Firmicutes (64 %). Анализ собранных метагеномных последовательностей микробного мата позволил впервые систематизировать и дать характеристику выявленных пептидаз в микробном мате горячего источника Гарга. Сравнение метагеномных последовательностей репрезентативных данных выявило доминирование ферментов класса сериновых пептидаз. Природные пептидазы в исследуемом микробном сообществе обеспечивают гидролиз биополимеров на первых этапах деструкции органического вещества и могут представлять биотехнологический интерес.

Ключевые слова: филогенетический анализ; микробное сообщество; метагеномный анализ; пептидазы; Байкальская рифтовая зона.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Лаврентьева Е.В., Раднагуруева А.А., Банзаракцаева Т.Г., Базаров С.М., Бархутова Д.Д., Ульзетуева И.Д., Чернявский М.К., Кабилов М.Р., Хахинов В.В. Филогенетический анализ микробного мата в горячем источнике Гарга (Байкальская рифтовая зона) и разнообразии природных пептидаз. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8):959-963. DOI 10.18699/VJ17.319

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Lavrentyeva E.V., Radnagurueva A.A., Banzaraktsaeva T.G., Bazarov S.M., Barkhutova D.D., Ulzetueva I.D., Chernyavsky M.K., Kabilov M.R., Khakhinov V.V. Phylogenetic analysis of the microbial mat in the hot spring Garga (Baikal rift zone) and the diversity of natural peptidases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(8):959-963. DOI 10.18699/VJ17.319 (in Russian)

Received 17.07.2017

Accepted for publication 05.10.2017

© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: lena_l@mail.ru

Phylogenetic analysis of the microbial mat in the hot spring Garga (Baikal rift zone) and the diversity of natural peptidases

E.V. Lavrentyeva^{1, 2}, A.A. Radnagurueva¹, T.G. Banzaraktsaeva¹, S.M. Bazarov¹, D.D. Barkhutova¹, I.D. Ulzetueva³, M.K. Chernyavsky⁴, M.R. Kabilov⁵, V.V. Khakhinov²

¹ Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russia

² Buryat State University, Ulan-Ude, Russia

³ Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude, Russia

⁴ Geological Institute SB RAS, Ulan-Ude, Russia

⁵ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Hydrolytic bacteria (in particular, proteolytics) are the primary destructors in hot springs. The proteolytic bacteria are able to secrete enzymes that are active in wide ranges of pH and temperature. The aim of this work was to study the taxonomic composition, the structure of the bacterial microbial mat, and to study the distribution of peptidases in the thermophilic microbial Garga community. For the study, we sampled the microbial mat at a water temperature of 54.2 °C and a pH of 8.3. Hydrochemical analysis of water showed a high content of sulfates, 390 mg/dm³. The microelement composition of water showed that the Garga water had increased concentrations of B, Rb, Li, Ba, Sr. We analyzed the taxonomic diversity of the microbial community in the hot spring Garga at a temperature zone of 54 °C. The structure of the microbial mat is represented by various phylogenetic groups of mesophilic and thermophilic bacteria, with various metabolic and ecological functions. The dominant group in this community was the phylum Firmicutes (64 %). The analysis of the collected metagenomic sequences of the microbial community allowed the detected peptidases in the microbial community in the hot spring Garga to be for the first time systematized and characterized. Comparisons of metagenomic sequences of representative data showed a dominance of serine peptidase class enzymes. Natural peptidases in the investigated microbial community ensure the hydrolysis of biopolymers at the first stages of the destruction of organic matter and may have biotechnological relevance.

Key words: phylogenetic analysis; microbial community; metagenomic analysis; peptidases; Baikal rift zone.

Термофильные и алкалофильные гидролитические бактерии представляют одну из наиболее обширных и активно изучаемых групп микроорганизмов и являются источником новых ферментов и метаболитов для промышленности и медицины. Множество термо-/алкалофильных микроорганизмов осуществляет гидролиз полимерных субстратов – это амилолитики (Krishnan, Chandra, 1983; Gupta et al., 2003), целлюлозолитики (Bergquist et al., 1999; Uhl, Daniel, 1999; Andrade et al., 2001; Kozina et al., 2010; и др.) и протеолитики. Основная часть протеолитиков в качестве источника углерода и энергии использует пептиды благодаря наличию внеклеточных пептидаз, активных в широких диапазонах значений pH и температур (Ward et al., 2002). В целом в природных местообитаниях гидролитики занимают нишу первичных деструкторов, благодаря способности гетеротрофно расти на биополимерах различной природы (Кубланов, Подсокорская, 2011).

Использование современных методов молекулярной биологии позволило значительно расширить знания о разнообразии культивируемых и некультивируемых представителей различных местообитаний, в том числе горячих источников. Высокопроизводительное пиросеквенирование дает возможность охарактеризовать состав и разнообразие микробных сообществ и выявляет как доминирующие микроорганизмы, так и минорные компоненты (Бонч-Осмоловская, 2011).

В настоящей работе проведена оценка состава и структуры микробного мата с использованием комплексного подхода и изучено распространение пептидаз в термофильном микробном сообществе Гарга.

Материалы и методы

Высокотемпературный источник Гарга находится в долине р. Гарги, в отрогах Икатского хребта, окаймляющего котловину с восточной стороны (54°19'203" с. ш. и 110°59'646" в. д., высота над уровнем моря 674 м). Участок выхода сложен водноледниковыми верхнечетвертичными отложениями, которые перекрывают палеозойские граниты и приурочены к Гаргинскому разлому, протягивающемуся в северо-восточном направлении на 30–40 км.

Микроэлементный состав воды определен в Геологическом институте СО РАН (г. Улан-Удэ) на масс-спектрометре с индуктивной связанной плазмой высокого разрешения ICP-MS Element XR (Thermo Scientific Fisher, Германия).

Изучение филогенетического разнообразия и поиск пептидаз в микробном сообществе проведены в ООО «Биоспарк» (г. Москва). Поиск пептидаз в микробном сообществе осуществляли в несколько этапов.

- Выделение тотальной ДНК из микробного сообщества. Непосредственно само выделение ДНК выполняли в три этапа: разрушение клеток, промывка и осаждение.
- Подготовка на основе полученных препаратов ДНК библиотеки для секвенирования на платформе Illumina MiSeq проводилась с использованием коммерческого набора реактивов New England Biolabs NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina® в строгом соответствии с рекомендациями производителя (<https://www.neb.com/products/e7370-nebnext-ultra-dna-library-prep-kit-for-illumina>).

- Секвенирование полученной библиотеки на платформе Illumina MiSeq.
- Биоинформатический анализ полученных данных с целью выявления всего разнообразия пептидаз в микробном сообществе Гарга. Для сборки контигов использовали пакет программного обеспечения SPAdes v3.9.1 (<http://bioinf.spbau.ru/spades>). На основании обработанной аннотации получен перечень всех выявленных типов пептидаз.

Результаты и обсуждение

Физико-химические условия горячего источника Гарга.

Термальная сульфатно-натриевая вода изливается с дебитом 5 л/с в небольшой грот, расположенный на правом берегу р. Гарга, на высоте около 100 м от уреза воды (674 м над уровнем моря). Температура воды на выходе достигает 74 °С. В газовом составе преобладает азот. По температурному режиму воды источника гипертермальные, с температурой выше 41 °С. Вода источника, по классификации И.С. Ломоносова (1974), относится к горячинскому типу сульфатно-натриевых кремнистых терм. Отличительная особенность вод этого типа – абсолютное преобладание сульфатов натрия и небольшая минерализация, изменяющаяся от 0.5 до 1.0 г/л. Вода, стекая по ручью, образует травертин длиной до 50 м и шириной до 25 м, который считается одним из самых крупных в Байкальском регионе.

Высота уступов террас колеблется от 0.3 до 1.5 м, их образование зависит от водообильности источника. Состав травертинов практически полностью карбонатно-кальциевый, с высоким содержанием SiO₂.

Пробы микробного мата отобраны при температуре воды 54.2 °С и pH 8.3. Минерализация составила 0.74 г/дм³. Химический состав воды представлен в табл. 1.

Доминирующий катион в воде – натрий; среди анионов обнаружено максимальное количество ионов сульфата и гидрокарбоната. Характерной чертой для вод источника Гарга является высокое содержание радона, до 43 эман.

Анализ результатов микроэлементного состава воды показал, что в Гаргинских водах отмечена повышенная концентрация В, Rb, Li, Ва и Sr (табл. 2). Преобладание данных элементов в целом характерно для термальных источников, разгружающихся в пределах Икатского хребта. Наличие Sr, Li, Ва и некоторых других элементов в воде горячего источника связано с их высоким содержанием в гранитоидных породах Баргузинского комплекса.

Установлено, что содержание элементов и их соединений колеблется по разрезу травертинов, что может свидетельствовать о непостоянстве гидрохимического режима в период осадкообразования (Замана и др., 2011).

Филогенетический анализ микробного мата. Структура микробного мата горячего источника Гарга представлена различными филогенетическими группами мезофильных и термофильных бактерий с различными метаболическими и экологическими функциями (рисунок).

В микробном мате наибольшую долю в сообществе составил филум Firmicutes (30925 нуклеотидных последовательностей, 64 %). Подавляющее большинство последовательностей отнесено к порядку Bacillales и является представителями рода *Paenibacillus* (57 %). В про-

Table 1. Chemical composition of water in the Garga hot spring at the site of microbial mat sampling

Ion concentration	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	H ₂ SiO ₃	F ⁻	PO ₄ ³⁻	Cl ⁻
mg/L	312	11.3	23	0.08	6	109.8	7.4	390	89	10.5	2.02	51.4

Table 2. Concentrations of microelements in the Garga hot spring

Element	µg/L								
Be	0.6023	Hf	0.0011	La	0.0217	Mn	13.30	Gd	< DL
B	260.82	Tl	0.1946	Ce	0.0277	Fe	16.67	Tb	0.0005
Rb	118.59	Bi	0.0071	Pr	0.0026	Ni	0.4905	Dy	< DL
Y	0.0161	Th	0.0038	Nd	0.0095	Pb	0.4948	Ho	0.0005
Zr	0.0525	U	0.0056	Sm	0.0009	Al	33.70	Er	0.0013
Nb	0.0017	Li	1736	P	92.40	Ge	10.61	Tm	< DL
Mo	14.35	Co	< DL*	Sc	0.0015	As	0.0877	Yb	< DL
Ag	0.0080	Zn	6.144	Ti	0.8597	Se	< DL	Lu	< DL
Sn	0.1240	Ga	3.861	V	0.0405	Sr	3794	Ta	0.0025
Sb	0.0641	Cd	0.0287	Cr	0.2082	Eu	0.0010	Cu	1.306
Cs	42.85	Ba	46.25	W	80.82				

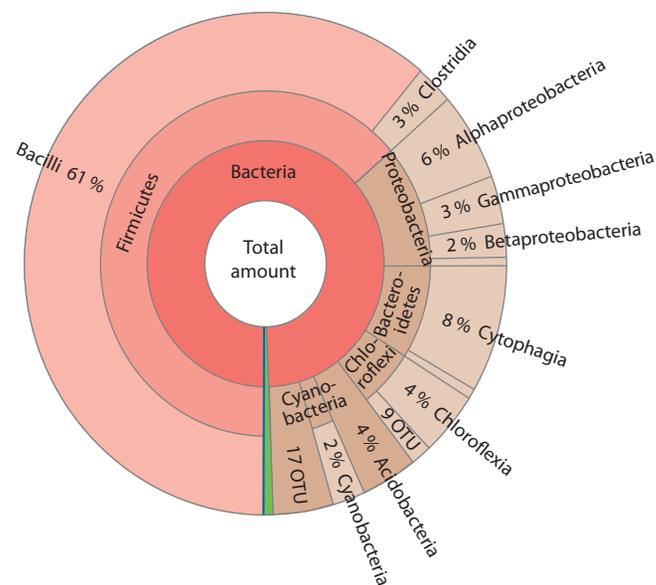
* DL, detection limit.

веденных ранее исследованиях нам удалось выделить алкало-термофильную протеолитическую бактерию в виде чистой культуры Га-35, которая была отнесена к *Paenibacillus dendritiformis*. Определение пептидазной активности показало, что штамм Га-35 обладает высокой активностью (3.7 ед/мг белка) на специфичном для субтилизин-подобных пептидаз субстрате GlpAALpNa (Раднагуруева и др., 2016). Известно, что представители рода *Paenibacillus* являются активными продуцентами гидролитических ферментов, в частности пептидаз, и наиболее перспективными объектами для использования в промышленной биотехнологии (Grady et al., 2016).

Филум Proteobacteria представлен четырьмя основными классами: Alpha (6 %), Beta (2 %), Gamma (3 %) и Delta (0.6 %). Для этого филума характерны большое разнообразие и высокая скорость аэробных и анаэробных метаболических путей (Madigan, 2000). Активность протеобактерий способствует деградации и быстрому повторному использованию органических веществ внутри микробного мата (Thibault et al., 2010).

В микробном мате горячего источника Гарга представители Gammaproteobacteria включают порядок Xanthomonadales (2 %), к которому относится семейство Xanthomonadaceae. Характерно, что многие бактерии этого семейства способны осуществлять разложение органического вещества. В классе Alphaproteobacteria доминирует порядок Rhodospirillales. Большая доля последовательностей в филуме Proteobacteria (18.0 %) принадлежит неклассифицированным в настоящее время видам бактерий.

Филум Vacteroidetes (8 %) представлен в сообществе микробного мата классом Cytophagia. Следует отметить, что все последовательности этого филума отнесены к некультивируемым бактериям. Филум Vacteroidetes включа-



Species composition in the microbial mat of the Garga hot spring. OTU, operational taxonomic unit, ≤ 1% in the community.

ет разнообразные гетеротрофные бактерии с чрезвычайно разнообразными метаболическими функциями. В работе (Portillo et al., 2009) показано, что филум Vacteroidetes составляет важную группу прокариот в горячих источниках Таиланда. Они потенциально важные потребители органического вещества, производимого цианобактериями и другими автотрофными организмами (Mackenzie et al., 2013).

Доля филума Chloroflexi в микробном сообществе составляет 5%. Термофильные бактерии Chloroflexus являются доминирующей группой в самом многочисленном

классе Chloroflexia (4 %). Метаболическая гибкость различных представителей филума Chloroflexi определяет эти бактерии как матообразующий компонент во многих исследованных горячих источниках и способствует в борьбе за питательные вещества и/или физическое пространство.

Около 4 % микроорганизмов определены как Acidobacteria. Полученные последовательности филума Acidobacteria отнесены к неклассифицированным бактериям на уровне класса.

Вклад Cyanobacteria в структуру микробного мата составил 2 % и представлен родами *Leptolyngbya*, *Chlorogloeopsis* и *Synechococcus*.

Минорными компонентами сообщества были бактерии филумов Armatimonadetes и Deinococcus-Thermus (0.9 %).

В проведенных ранее исследованиях в горячем источнике Гарга показано, что основа микробного мата в температурной зоне (52–57 °C) – цианобактерии. Культуральными и микроскопическими методами установлено доминирование цианобактерий родов *Phormidium*, *Oscillatoria* и *Synechococcus* (Бархутова и др., 2011; Намсараев и др., 2011). Характерно, что русло ручья в источнике периодически меняется, и, вероятно, в связи с этим произошла смена доминирующих видов в микробном мате в период наших исследований.

Обнаружено, что в составе микробного мата большое количество последовательностей имеет низкий уровень гомологии с известными культивируемыми представителями в мировой базе данных. Это, возможно, указывает на потенциально новые виды бактерий, не описанные ранее.

Метагеномный анализ пептидаз в микробном мате Гарга. Особенностью микробных сообществ термальных источников Байкальской рифтовой зоны являются его термофилия и алкалитолерантность, что предполагает термо- и pH стабильность соответствующих ферментов.

Ферменты, функционирующие в экстремальных условиях, определяют метаболические процессы и специфические биологические функции этих микроорганизмов в местах обитания. Среди секретируемых внеклеточных ферментов важная роль принадлежит пептидазам, принимающим активное участие в использовании микроорганизмами органических субстратов.

Результаты метагеномного анализа показали разнообразие пептидаз в природном образце микробного мата горячего источника Гарга. Основные данные биоинформатического анализа для изученного образца представлены ниже.

Кол-во контигов	467 457
Совокупная длина, п. н.	398 557 590
Медианная длина, п. н.	320
Средняя длина, п. н.	853
Максимальная длина, п. н.	994 249
N50	2330
N90	274
Кол-во аннотированных генов	332 830
Кодирующие	327 004
тРНК	3 974
тмРНК	55
Повторы	1 797
Прочие	–
С названием	121 875
С кодом фермента EC	82 125

Анализ полученных результатов позволил впервые систематизировать и дать характеристику установленных пептидаз в микробном мате горячего источника Гарга.

Сравнение метагеномных последовательностей репрезентативных данных показало доминирование ферментов класса сериновых пептидаз. Из литературных данных известно, что сериновые пептидазы обычно активны при нейтральных и щелочных значениях pH и имеют оптимум pH между 7 и 11 (Rao et al., 1998). На основании аминокислотной последовательности пептидазы делят на семейства, в настоящее время выделено более 20 семейств (Rao et al., 1998).

Метагеномный анализ выявил распространение пептидаз класса металлопептидаз в микробном мате Гарга. Обнаружено 12 последовательностей металлопептидаз различной номенклатуры (Germination protease precursor, ATP-dependent zinc metalloprotease и др.). В классе металлопептидазы выделяют 25 семейств, относящихся к разным систематическим группам. Металлопептидазы, как правило, синтезируются в неактивной форме и катализируются в присутствии ионов металлов (магния, марганца, кобальта, цинка). Оптимальные значения pH для металлопептидаз также находятся в диапазоне 7–9. Известны металлопептидазы, обладающие свойствами термостабильности (Oliveira et al., 2003).

Нами выявлены лишь единичные последовательности генов класса цистеиновых пептидаз в микробном сообществе Гарга. Возможно, это связано с тем, что цистеиновые пептидазы эффективны при нейтральных значениях pH; реже зона оптимума лежит в слабощелочной или слабощелочной среде (pH 4–9) в зависимости от природы гидролизующего белка (Oliveira et al., 2003). У изученного нами микробного сообщества диапазон развития находится в высокотемпературной зоне и щелочной области pH.

Заключение

Таким образом, впервые методом пиросеквенирования удалось подробно описать таксономический состав и количественное соотношение основных групп микроорганизмов в микробном мате горячего источника Гарга в температурной зоне 54 °C. Характерно, что изученное микробное сообщество представлено весомой долей бактерий, участвующих на разных этапах продукции и деструкции органического вещества в микробных матах. Большое количество филогенетически разнообразных, метаболически разнонаправленных групп свидетельствует о сбалансированном сложном сообществе, где каждая группа занимает свою экологическую нишу. Доминирование бактерий филума Firmicutes позволяет предположить, что в сообществе изученного микробного мата активно протекают процессы деструкции органического вещества.

Использование метагеномного метода позволило выявить распространение пептидаз в изученном микробном мате. Показано доминирование ферментов класса сериновых пептидаз. Изучение пептидаз микроорганизмов, функционирующих в экстремальных местах обитания, предоставляет уникальную возможность исследовать стратегии отдельных регуляторных процессов микробной клетки и границы функционирования микроорганизмов, так как известно, что усиленный синтез гидролитических

ферментов является одним из способов адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям окружающей среды.

Acknowledgments

This study was supported by the Federal Agency for Scientific Organization, projects 037-2017-0003; Russian Federation Ministry of Education and Science 6.9754. 2017/BCh 15-04-01275; and the Russian Foundation for Basic Research, projects 15-04-01275; 15-44-04335-r_Siberia_a.

The authors are grateful to Cand. Sci. (Biol.) A. Yu. Merkel, Director General of the Biospark Company (Moscow, Russia), and Cand. Sci. (Geol.-Min.) V.B. Khubanov, Researcher, Head of the Group of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Geological Institute of the Siberian Branch of the RAS (Ulan-Ude, Buryatia, Russia).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andrade C.M., Aguiar W.B., Antranikian G. Physiological aspects involved in production of xylanolytic enzymes by deep-sea hyperthermophilic archaeon *Pyrodicticum abyssi*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001;91-93:655-669.
- Barkhutova D.D., Tsyrenova D.D., Bryanskaya A.V., Danilova E.V., Zaitseva S.V., Namsaraev Z.B. Mikrobnye maty. Geokhimicheskaya deyatel'nost' mikroorganizmov gidroterm Baykal'skoy riftovoy zony [Microbial mats. Geochemical activity of microorganisms in thermal springs of the Baikal Rift zone]. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2011. (in Russian)
- Bergquist P.L., Gibbs M.D., Morris D.D., Te'o V.S.J., Saul D.J., Morgan H.W. Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1999;28:99-110.
- Bonch-Osmolovskaya E.A. Thermophilic microorganisms: a general overview. *Trudy Instituta mikrobiologii im. S.N. Vinogradskogo. [Gal'chenko V.F. (Ed.) Proceeding of the Winogradsky Institute of Microbiology]*. Moscow: Nauka Publ., 2011;5-14. (in Russian)
- Grady E.N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z.-C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb. Cell Factories.* 2016;15:203. DOI 10.1186/s12934-016-0603-7.
- Gupta R., Beg Q., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003;59(1):15-32.
- Kozina I.V., Kublanov I.V., Kolganova T.V., Chernyh N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Caldanaerobacter uzonensis* sp. nov., an anaerobic, thermophilic, heterotrophic bacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010;60:1372-1375.
- Krishnan T., Chandra A.K. Purification and characterization of α -amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983;46:430-437.
- Kublanov I.V., Podosokorska O.A. Thermophilic microorganisms decomposing biopolymers. *Trudy Instituta mikrobiologii im. S.N. Vinogradskogo. [Gal'chenko V.F. (Ed.) Proceeding of the Winogradsky Institute of Microbiology]*. Moscow: Nauka Publ., 2011;315-342. (in Russian)
- Lomonosov I.S. Geokhimiya i formirovanie sovremennykh gidroterm Baykalskoy riftovoy zony [Geochemistry and Formation of Modern Thermal Springs in the Baikal Rift Zone]. Novosibirsk: Nauka Publ., 1974. (in Russian)
- Mackenzie R., Pedrós-Alió C., Díez B. Bacterial composition of microbial mats in hot springs in Northern Patagonia: variations with seasons and temperature. *Extremophiles.* 2013;17:123-136. DOI 10.1007/s00792-012-0499-z.
- Madigan M.T. Bacterial habitats in extreme environments. *Journey to Diverse Microbial Worlds.* 2000; 2:61-72.
- Namsaraev Z.B., Zaitseva S.V., Dmitrieva O.M., Barkhutova D.D. Structure and functional activity of microbial mats of the Garga thermal spring (Barguzin valley). *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Buryat State University.* 2011;14a: 231-239. (in Russian)
- Oliveira A.S., Xavier-Filho J., Sales M.P. Cysteine proteinases and cystatins. *Brazil. Arch. Biol. Technol.* 2003;46(1):91-104.
- Portillo M.C., Sririn V., Kanoksilapatham W., Gonzalez J.M. Differential microbial communities in hot spring mats from Western Thailand. *Extremophiles.* 2009; 13(2):321-331. DOI 10.1007/s00792-008-0219-x.
- Radnagurueva A.A., Lavrentieva E.V., Budagaeva V.G., Barkhutova D.D., Namsaraev B.B., Dunaevsky Y.E. Organotrophic bacteria of the Baikal Rift Zone hot springs. *Microbiology (Mikrobiologiya).* 2016;85(3):367-378.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998;62(3):597-635.
- Thibault V., Lovejoy C., Jungblut A.D., Vincent W.F., Corbeil J. Metagenomic profiling of Arctic microbial mat communities as nutrient scavenging and recycling systems. *Limnol. Oceanogr.* 2010; 55(5):1901-1911. DOI 10.4319/lo.2010.55.5.190.
- Uhl A.M., Daniel R.M. The first description of an archaeal hemicellulase: the xylanase from *Thermococcus zilligii* AN1. *Extremophiles.* 1999;3:263-267.
- Ward D.E., Shockley K.R., Chang L.S., Levy R.D., Michel J.K., Connors S.B., Kelly R.M. Proteolysis in hyperthermophilic microorganisms. *Archaea.* 2002;1:63-74.
- Zamana L.V., Khakhinov V.V., Danilova E.V., Barkhutova D.D. Hydrochemistry of mineral waters. *Geokhimicheskaya deyatel'nost' mikroorganizmov gidroterm Baykalskoy riftovoy zony [Geochemical activity of microorganisms in thermal springs of the Baikal Rift zone]*. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2011;62-101. (in Russian)