

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по Микробиология „Стефан Ангелов”

Николета Иванова Ботева

*Разнообразие и биотехнологичен потенциал на термофилни
микроорганизми от български горещи извори*

АВТОРЕФЕРАТ

на

ДИСЕРТАЦИЯ

За присъждане на образователната и научна степен

„ДОКТОР”

Професионално направление: 4.3 "Биологически науки",

Научна специалност 01.06.12 „Микробиология”

Научен ръководител:

проф. Маргарита Камбурова

София

2021

Използвани съкращения

AGA - Апиогалактуронан

amoA - Амоняк-монооксигеназа

Asp - Аспарагинова киселина

AZCL - Azur Cross Linked субстрати

CAZy db - database of Carbohydrate-Active Enzymes

COG - Clusters of Orthologous Groups of proteins

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CTAB - Цетилтриметиламониев бромид

DNS - 3,5-динитросалицилова киселина

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

EPG - Екзо-полигалактуроназа

EPGD - Екзо-поли- α -галактуронозидаза

Gal-A - Галактуронова киселина

GC - Гуанин/Цитозин

Glu - Глутаминова киселина

GTDB - Genome Taxonomy Database

HG - Хомогалактуронан

His - Хистидин

HMM - Hidden Markov Model

IPTG - Изопропил β -d-1-тиогалактопиранозид

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

MAGs - Metagenome-assembled genomes

NADH - Nicotinamide adenine dinucleotide

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NGS - Next Generation Sequencing

OGAs – Олигогалактурони

ORFs - ОРЧ - Отворени рамки на четене

PCR - Полимеразна верижна реакция

PGAza – Полигалактуроназа

pNPC4 - Пара-нитрофенил бутират

pNPP - Пара-нитрофенил палмитат

Rha - Рамноза

SCGs - Single copy genes

SDS - Натриев додецил сулфат

SDS PAGE - Полиакриламидна електрофореза с натриев додецил сулфат

Ser – Серин

TAE - Трис база, оцетна киселина, ЕДТА

TE - Трис база, ЕДТА

TEMED - Тетраметилетилендиамин

TLC - Тънкослойна хроматография

XGA - Ксилогалактуронан

XGA - Ксилогалактуронан

АОА – амоняк-окисляващи археи

АОБ - амоняк-окисляващи бактерии

АТФ - Аденозинтрифосфат

ЕДТА - Етилендиаминтетраоцетна киселина

КА - Карбонова анхидраза

КМ-целулоза - Карбоксиметил-целулоза

ПГК - Полигалактуронова киселина

РУБИСКО - Рибулозо-1,5- бифосфат карбоксилаза

УВОД

След въвеждането на филогенетичния анализ, основан на 16S рРНК ген се очертава ниската „разделителна способност“ на култивируемите подходи за изучаване на микроорганизмите, което неизбежно повлиява на последващото развитие на методите на метагеномиката и геномиката. Последните осигуряват информация за огромното разнообразие от некултивируеми микроорганизми, тяхната таксономия, метаболитните им функции и еволюция.

Нарастващото антропогенно влияние върху баланса на глобалния азотен цикъл все повече се осъзнава като глобален проблем. Едновременно с това информацията относно функционирането на азотния цикъл в геотермални среди е непълна и основни въпроси са все още неизяснени.

Термофилните микроорганизми са обект на засилен екологичен и биотехнологичен интерес. Нуждата от нови биокатализатори с повишена устойчивост в индустриални условия е провокирало редица изследователски екипи да се фокусират върху биосинтетичния потенциал на слабо проучени микробни групи, каквито са термофилните микроорганизми. Оpozнаването на термалните екологични ниши с тяхната термофилна микробиота, осветлява въпроси от фундаментална значимост, свързани с неустойчивостта на биологичните молекули или активността им в тесен физико-химичен диапазон. При търсене на нови биокатализатори все по-голям интерес е насочен към некултивируемата микробна фракция от екстремни хабитати. Интересът към термофилните ензими е продиктуван не само от тяхната еволюционно залегнала устойчивост, но и поради значителния непроучен потенциал. Стандартните култивационни условия предоставят твърде ограничена картина на микробното разнообразие в природата и лимитиран достъп до огромен, не експлоатиран биотехнологичен потенциал. Некултивируемата микробна фракция на планетата е природен ресурс, чийто достъп за сега е възможен единствено през техните геноми.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Да се определи филогенетичното разнообразие и биотехнологичния потенциал на термофилни микроорганизми в български горещи извори.

ЗАДАЧИ

1. Таксономичен и функционален метагеномен анализ на ДНК изолирана от седименти и вода за охарактеризиране съобществата в български горещи извори.
2. Реконструкция на MAGs и определяне на термофилните участници в азотния цикъл.
3. Метагеномен анализ на набогатени култури от екстремни термофили.
4. Клониране, експресия, пречистване и характеризиране на термофилна липаза от реконструиран геном на некултивируем термофил.
5. Изолиране на екстремно термофилни аероби.
6. Изолиране на екстремно- и/или хипертермофилни анаероби.
7. Скрининг за продуценти на въглехидрат-разграждащи ензими.
8. Пречистване и характеризиране на термофилен ензим с приложен потенциал от култивируем термофил.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛИ

1. Пробовземане.

Обект на изследване в настоящата дисертация са шест български горещи извора с различна температура на водата, различен геотектонен произход и съответно различен химичен състав на водата: три извора от басейна на Рупи, условно обозначени като Рупи I (73°C, pH 8.95), Рупи II (77°C, pH 9.25), Рупи III (75°C pH 7.5), изворът край Власа (86°C, pH 8.2), изворът Мизинка във Велинград (88°C, pH 8.0), изворът край село Левуново (83°C, pH 7.0).

2. Хранителни среди за набогатяване на аеробни и анаеробни екстремни термофили, продуциращи извънклетъчни белтък и въглехидрат разграждащи ензими.
3. Разтвори и буфери: Разтвори - разтвори на микроелементи – SL10 и C; Воден разтвор на Na₂S; Воден разтвор на ресазурин /редокс индикатор/; Разтвор на DNS; Разтвор на IPTG; Разтвор на ампицилин; Буфери - SDS PAGE буфери; 0.06M Натриево-ацетатен буфер (pH 5.0 и 5.5); 0.06M Калиево-фосфатен буфер (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0); 0.06M Трис-HCl буфер (pH 8.0, 8.5); 0.06M Глицин-NaOH (pH 9.0, 9.5, 10.0, 10.5).

МЕТОДИ

1. Метагеномен анализ.

- Изолиране на метагеномна ДНК от седиментни проби, водни проби и анаеробни култури.
- Shotgun секвениране – използвана е платформа за секвениране MiSeq Illumina paired ends.
- Обработка на секвенциите (програми, бази данни) – проверка на качеството на секвенциите, триминг, отстраняване на адапторите от секвенирането (FastQC, Trimmomatic); *de novo* асемблиране (CLC Genomics Workbench); таксономичен и функционален анализ на не асемблирани и асемблирани метагеноми (MG Rast – бази данни RefSeq и KEGG); таксономично класифициране на асемблирани метагеноми

(Centrifuge); таксономично класифициране до вид на не асемблирани метагеноми (MetaPhlAn2); изчисляване на екологични индекси - evenness (Shannon), Chao1 (R package Phyloseq), Pearson correlation (GraphPad Prism); идентифициране на гени свързани с разграждане на въглехидрати (run_dbcan, база данни CAZy), определяне на ORFs (FragGeneScan, Prodigal); реконструкцията на draft геноми от метагеноми (MAGs) (Anvi'o, CheckM); анализ на MAGs (Rast, Bowtie2, HMMER, Prokka, NCBI COG, KEGG, Genome Taxonomy Database, UniProt, SwissProt, pfam, NCBI, PUFAS; пангеномно сравняване на реконструирани таумархеални MAGs (Anvi'o).

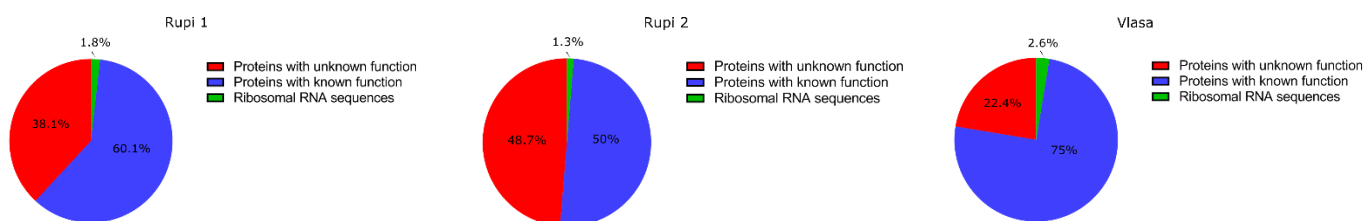
2. Клониране и експресия на липазен ген от некултивируемата бактерия *Candidatus Caldescibacterium*.
3. Hungate техника за анаеробно култивиране. Изолиране и култивиране на анаеробни термофилни микроорганизми.
4. Изолиране и култивиране на аеробни термофили.
5. Филогенетична принадлежност на изолираните аеробни и анаеробни термофили с използване на 16S рРНК секвенционен анализ.
6. Морфологични проучвания на щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4.
7. Определяне на мастнокиселинен състав и състав на полярни липиди.
8. Скрининг на продуценти на въглехидрат разграждащи ензими с използване на AZCL субстрати.
9. Количествено определяне на полигалактуроназна активност.
10. Определяне на липазна активност и свойства.
11. Пречистване на извънклетъчно продуцирана полигалактуроназа от анаеробен щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4.
12. SDS PAGE електрофореза.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Метагеномен таксономичен анализ на седиментни проби от горещи извори Рупи II и Власа и водна проба от Рупи I

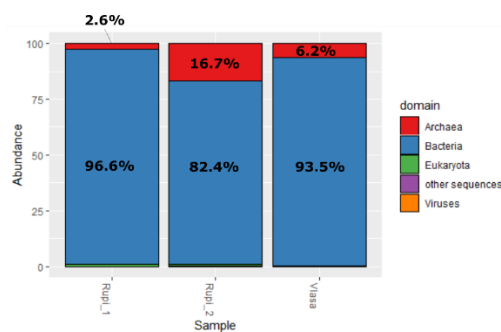
Редица пречки, както технически, така и концептуални са асоциирани с класическите култивационни микробиологични техники, което постави микробното разнообразие на челна позиция по степен на не изследваност и все още стои като приоритет номер едно пред микробиолози. Независими от култивационните методи, метагеномните анализи дават по-изчерпателна картина на микробната популация и функциониране в сравнение с културално-зависимите подходи. Таксономичният метагеномен анализ беше направен на не асемблираните метагеноми с използване на платформа MG Rast и RefSeq базата данни, както и програма Metaphlan2 за идентифициране до ниво вид.

Изследваните в настоящата работа горещи извори са местообитания със сериозен неизследван потенциал, както се вижда от степента на анотираност на изследваните метагеноми (фиг. 1).



Фигура 1. Анотирани функции в метагеномите от Рупи I, Рупи II и Власа с използване на RefSeq базата данни и MG Rast.

Информацията от метагеномното секвениране при всички изследвани в настоящата работа извори посочва доминиране на представителите на царство Бактерия и минорно присъствие на представителите на Археа (фиг. 2). Секвенциите отнесени към Археа бяха най-много (16.7%) в Рупи II (77°C), докато в извора с най-висока температура – Власа (86°C) бяха 6% и едва 2% в Рупи I (73°C).

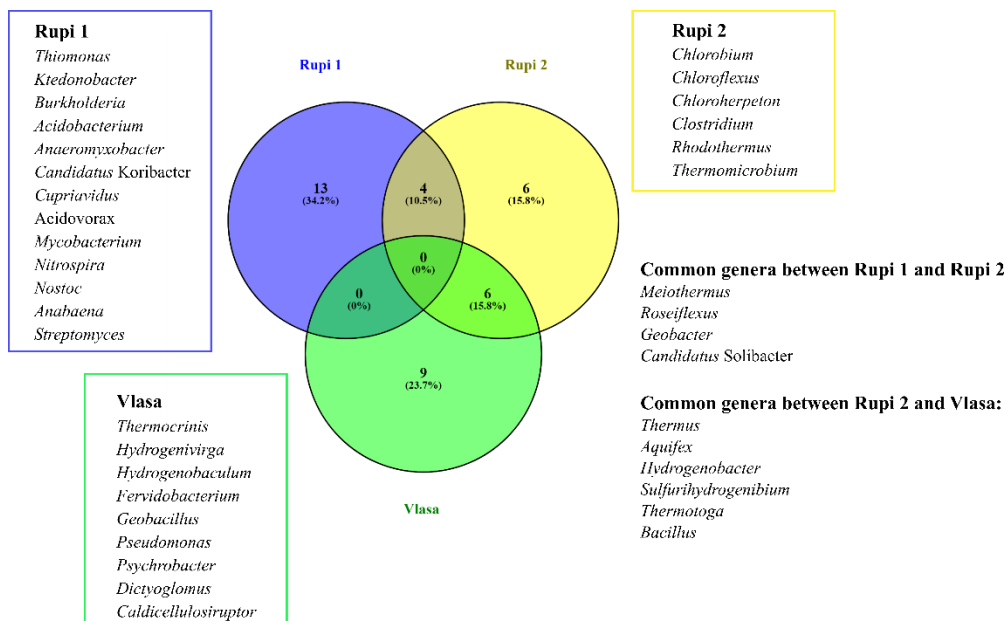


Фигура 2. Аотирание на секвенциите до ниво Царство в Рупи I, Рупи II и Власа.

Бактериално доминиране от подобен порядък се съобщава за редица горещи извори с температура на водата варираща от 45 - 94°C (Paul et al. 2016; Sahm et al. 2013; Kochetkova et al. 2020). Някои автори обобщават, че археите са слабо разпространени в алкални извори (Inskeep et al. 2010; Hugenholtz et al. 1998; Reysenbach et al. 1994) каквито са басейна на Рупи и Власа.

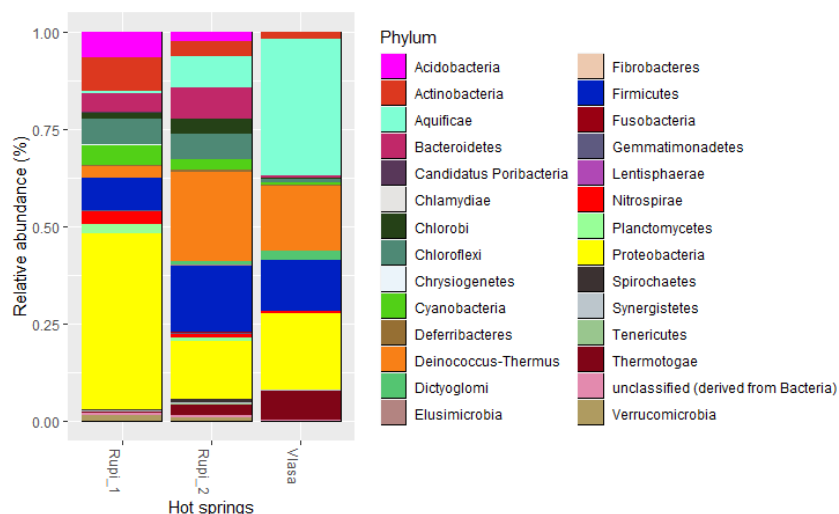
Таксономични профили на бактериите

Бактериалните секвенции от Рупи I бяха отнесени към 587 рода, от Рупи II и Власа към еднакъв брой – 583, от които 581 бяха общи за трите извора. От общия брой идентифицирани родове, над 1% бяха 17 рода в Рупи I, 16 в Рупи II и 15 във Власа (фиг. 3). Сред тях нямаше общи за трите извора, както и нямаше общи между изворите с най-ниска и най-висока температура - Рупи I и Власа. Шест общи рода се откриха между Рупи II и Власа, включващи типични термофили и род с термофилни представители (*Bacillus*). Между Рупи I и Рупи II имаше четири общи рода, сред които типични умерено-термофилни и мезофилни. Специфичните само за Рупи I родове бяха предимно мезофили, родове с умерено термофилни представители и родове с далечна термофилна връзка. При специфичните за Рупи II родове се наблюдаваше преобладаване на умеренотермофилни фотосинтезиращи бактерии, докато при Власа се затвърди картина на характерно термофилно съобщество. Идентифицираните над 1% бактериални родове във Власа обхващаха приблизително 70% от аотираната бактериална ДНК, 40% в Рупи II и около 30% в Рупи I.



Фигура 3. Общи и уникални бактериални родове идентифицирани над 1% в метагеномите на Рупи I, Рупи II и Власа.

Идентифицираните родове в Рупи I, Рупи II и Власа принадлежаха към 27 бактериални типа (фиг. 4).



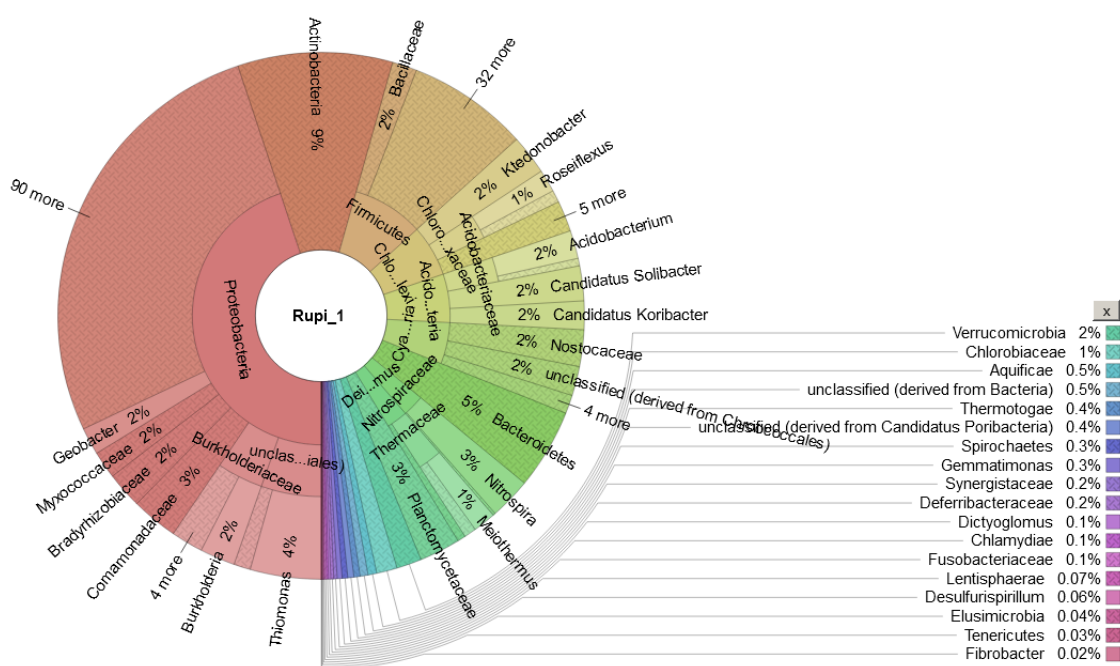
Фигура 4. Разпределение на бактериалните секвенции до ниво Тип в Рупи I, Рупи II и Власа.

В най-горещия извор Власа (86°C) най-много секвенции бяха отнесени към хипертермофилния тип *Aquificae*, обхващащ 35% от аотираниите бактериални секвенции от извора, в Рупи II (77°C) към термофилните *Deinococcus-Thermus* с дял от 23%, докато в Рупи I (73°C) най-разпространен тип беше *Proteobacteria* (45%), от който се срещат термофилни представители.

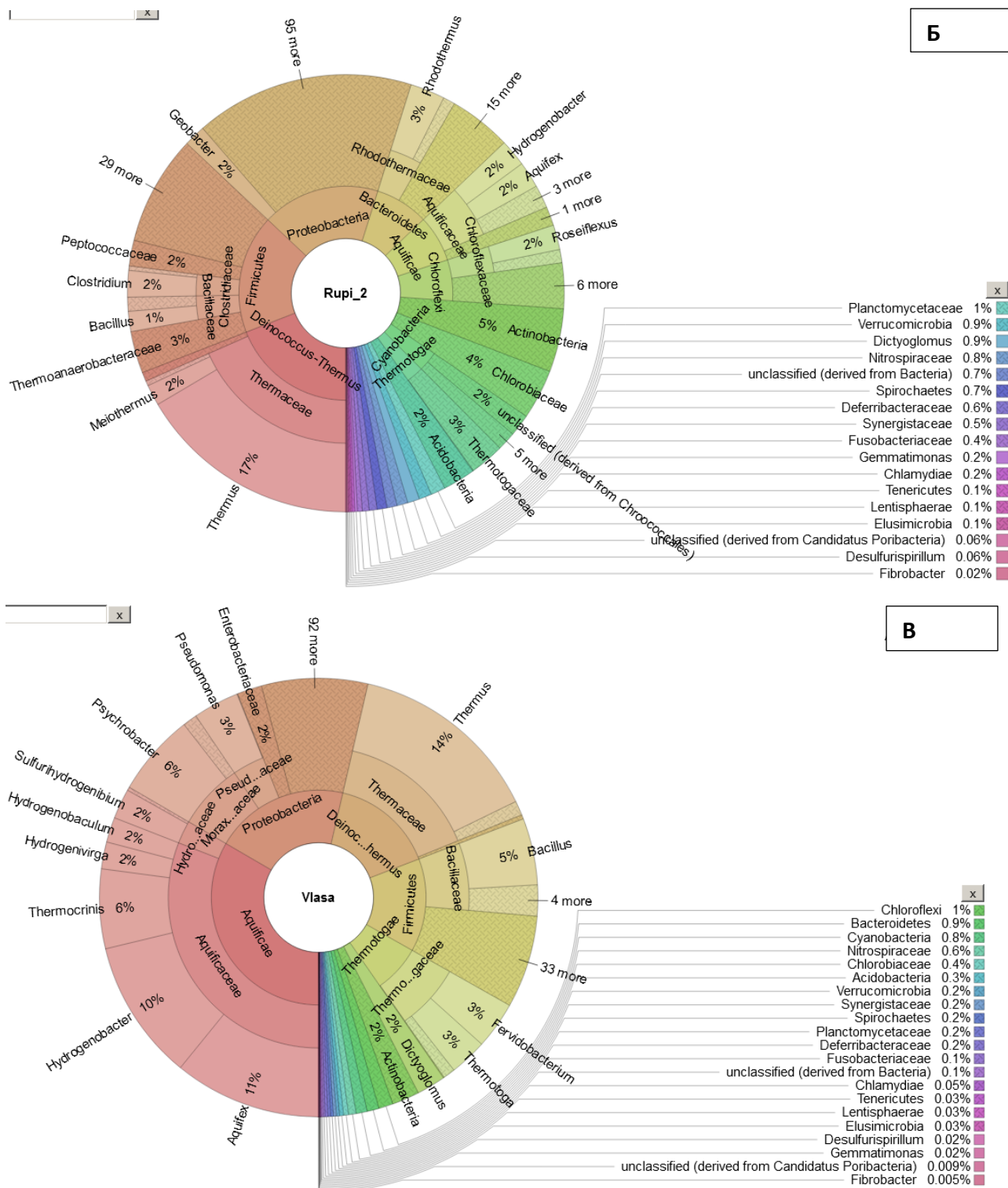
Секвенциите отнесени към *Aquificae* в Рупи II бяха приблизително четири пъти по-малко в сравнение с Власа (8% от анотираниите бактерии), докато количеството в Рупи I беше пренебрежимо малко (0.5% от бактериалните секвенции). По-ниската температура на извора (73°C) е най-вероятната причина с оглед хипертермофилната природа на типа.

Deinococcus-Thermus беше най-разпространеният тип в Рупи II (23%). В голямо количество се откри и в метагенома на Власа (17%), докато в Рупи I беше 3% от бактериалните секвенции. Родовият състав на типа в трите извора включваше род *Thermus*, който беше и най-многобройният род в седиментните съобщества на Рупи II и Власа обхващащ 17% от анотираната бактериална ДНК в Рупи II (фиг. 5Б) и 14% във Власа (фиг. 5В).

Тип *Proteobacteria* беше най-многобройният в Рупи I (45%). Наблюдаваше се разлика по отношение на родовете представляващи тип *Proteobacteria* в трите извора. От *Proteobacteria* беше най-разпространеният род в Рупи I – *Thiomonas* (4% от бактериите) (фиг. 5А).



A

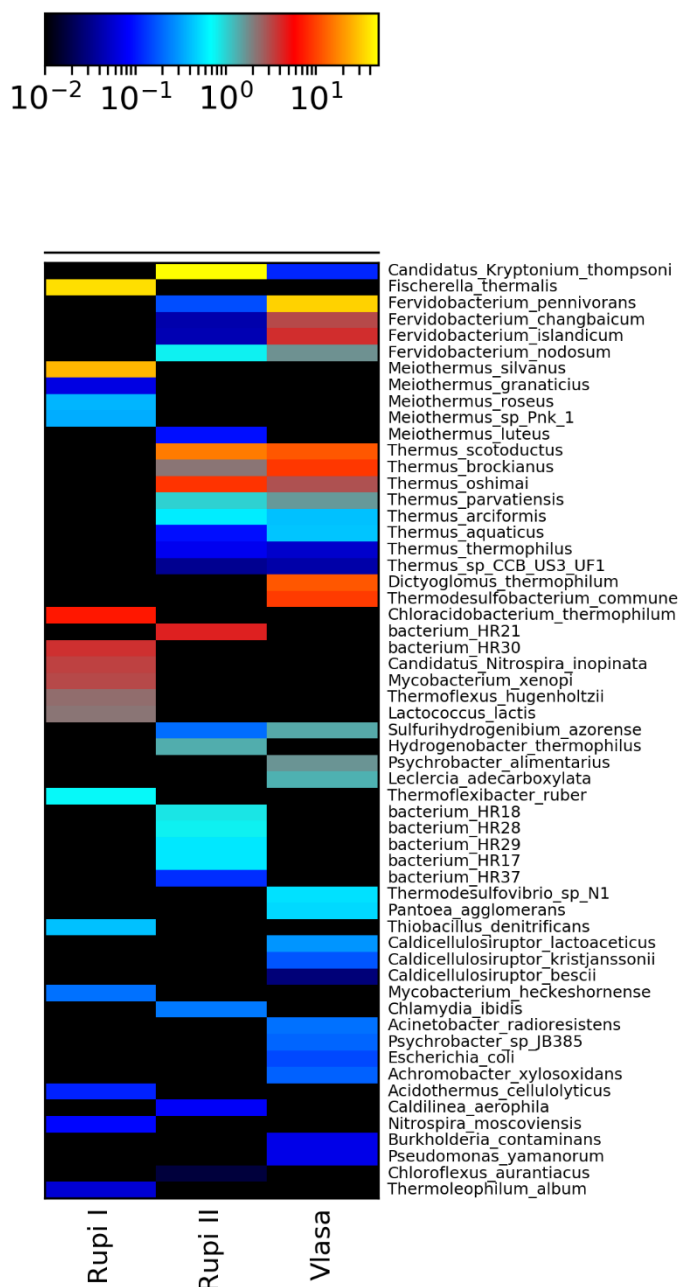


Фигура 5. Таксономичен състав на бактериите в Рупи I (А), Рупи II (Б) и Власа (В) определен с използване на MG Rast/RefSeq.

От род *Thiomonas* са описани автотрофни, органотрофни, миксотрофни, арсенит окисляващи и желязо-окисляващи щамове (Duquesne et al. 2008; Moreira et al. 1997; Johnson et al. 2003; Hallberg et al. 2005). Няма описани екстремно термофилни

представители. Има описани няколко умерено термофилни щама използващи редуцирни серни съединения.

С Metaphlan2 от тип *Proteobacteria* в Рупи I беше идентифициран вид *Thiobacillus denitrificans* (фиг. 6), който е единственият вид от рода докладван като факултативен анаеробен хемолитотроф, свързващ окислението на неорганичните серни съединения с редукция на нитрати, нитрити и други окислени азотни съединения до азот (Kelly and Wood, 2000).



Фигура 6. Бактериален видов състав на метагеномите на Рупи I, Рупи II и Власа определен с MetaPhlan2.

В Рупи II и Власа от тип *Proteobacteria* бяха открити над 95 рода, като в първия извор най-голям дял секвенции бяха отнесените към *Geobacter* (2%) и *Anaeromixobacter* (1%) и без идентифицирани видове с Metaphlan2. Докато във Власа бяха открити в най-голямо количество секвенции аотирани като *Pseudomonas* (3%) и необичайният за горещ извор *Psychrobacter* (6%), чието наличие е свързано с вторично замърсяване от околната среда през зимния сезон, в който бяха събрани пробите.

Тип *Firmicutes* беше вторият по разпространение в Рупи II (17%), във Власа беше 13%, а в Рупи I – 8%. Типът беше представен от *Clostridia* и *Bacilli*, като в Рупи I и Рупи II преобладаваха секвенциите от *Clostridia* (65% и 72% от типа съответно), а във Власа от *Bacilli* (64% от типа), с по-разпространен род *Bacillus* (5% от бактериите във Власа) (фиг.13).

В трите метагенома се откриха секвенции отнесени към *Clostridium*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Thermoanaerobacter*, *Caldanaerobacter*, включително и род с доказан биотехнологичен потенциал – *Caldicellulosiruptor* (Blumer-Schuetz et al. 2010; Martinez-Porqueras et al. 2013; Basen et al. 2014; Groom et al. 2014). С Metaphlan2 във Власа бяха идентифицирани три от общо десетте вида от род *Caldicellulosiruptor* – *C. lactoaceticus*, *C. kristjanssonii* и *C. bescii*, а в Рупи I вид *Lactococcus lactis* (фиг. 6).

Секвенции от повсеместно разпространения в геотермални хабитати тип *Thermotogae* бяха открити в по-голямо количество в метагенома на Власа (8%) и Рупи II (3%) и идентифицирани като родове *Thermotoga*, *Fervidobacterium*, *Thermosiphon*, *Kosmotoga* и *Petrotoga*. С Metaphlan2 в двата извора от типа бяха идентифицирани четири вида от род *Fervidobacterium* – *F. pennivorans*, *F. changbaicum*, *F. islandicum* и *F. Nodosum*.

Тип *Dictyoglomi* са също типични термофили, но бяха открити в малко количество – 2% от бактериите във Власа, 0.9% в Рупи II и 0.1% в Рупи I. С Metaphlan2 във Власа беше идентифициран *Dictyoglomus thermophilum* (12.1% от аотираните до вид секвенции).

По-ниската температура на изворите Рупи I и Рупи II е обусловила възможността за развитие на фотосинтезиращите термофили от тип *Chloroflexi*, които заемаха 7% и 6% от батериалните секвенции в двата извора съответно, докато във Власа бяха под 1%. Тип *Chloroflexi* в изворите бяха представени от *Chloroflexus*, *Roseiflexus*, *Herpetosiphon*, *Thermomicrobium*, *Sphaerobacter* и *Ktedonobacter* открит в по-голямо количество в Рупи I (3% от бактериите). С Metaphlan2 в Рупи II бяха идентифицирани видовете *Chloroflexus aurantiacus* и *Caldilinea aerophila*, а в Рупи I – *Thermoflexus hugenholtzii* (фиг. 6).

Макар и не сред доминантните типове, присъствието на фотосинтетични бактерии е необичайно, тъй като все още не се съобщава за фотосинтетични процеси при температури по-високи от 75°C. López-López et al. (2015) приемат, че фототрофните бактерии във високо температурни извори не са фотосинтетично активни.

Наред с фототрофните бактерии, в Рупи I бяха открити значително количество (за горещ извор) секвенции отнесени към *Cyanobacteria* (5%), по-малко в Рупи II (3%) и 0.6% във Власа, въпреки че горната температурна граница за бактериалната фотосинтеза, над която е съобщено, че хлорофилът деградира е 73–75°C (Cox et al. 2011). Strunecký et al. (2018) докладват за разнообразие на термофилни цианобактерии в басейна на Рупи. С Metaphlan2 в Рупи I най-много секвенции бяха отнесени към цианобактерията *Fischerella thermalis*, повсеместно разпространена в геотермални местообитания и чийто фотосинтезиращ апарат е активен до 58°C.

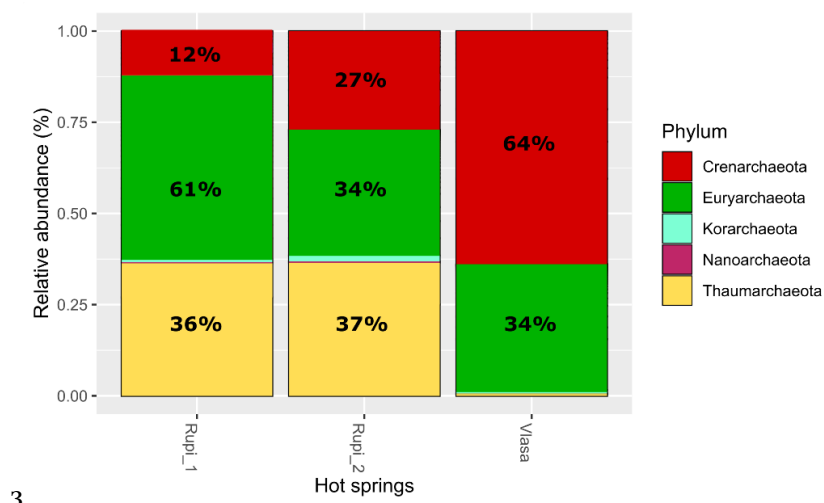
Тип *Nitrospirae* в Рупи I заемаше 3% от бактериалните секвенции, докато в седиментните съобщества беше под 1% - в Рупи II 0.8% и 0.6% във Власа. Типът в изворите беше съставен от два рода – нитрит окисляващият *Nitrospira*, който беше идентифициран в по-голямо количество в Рупи I и сулфат-редукторите *Thermodesulfovibrio* с превес в Рупи II и Власа. От Тип *Nitrospirae* в метагенома на Рупи I с Metaphlan2 бяха идентифицирани два вида - *Candidatus Nitrospira inopinata* (3.4%) и *Nitrospira moscoviensis*, а във Власа - *Thermodesulfovibrio* sp. Род *Nitrospira* са повсеместно разпространени, окисляват нитрит (втората стъпка от нитрификацията) и съответно играят роля в азотния цикъл.

Различните физико-химични параметри на трите местообитания са формирали различна структура на термофилните микробни съобщества, развита в процеса на физиологични адаптации. Така очертаният бактериален консорциум в изследваните извори с доминиране на типични термофили често откривани в доминантната микробна фракция на горещи хабитати от различни точки на планетата, както и нетермофилни представители разкрива картина на голямо бактериално разнообразие, висока степен на неизследваност и приложен потенциал.

Таксономични профили на археите

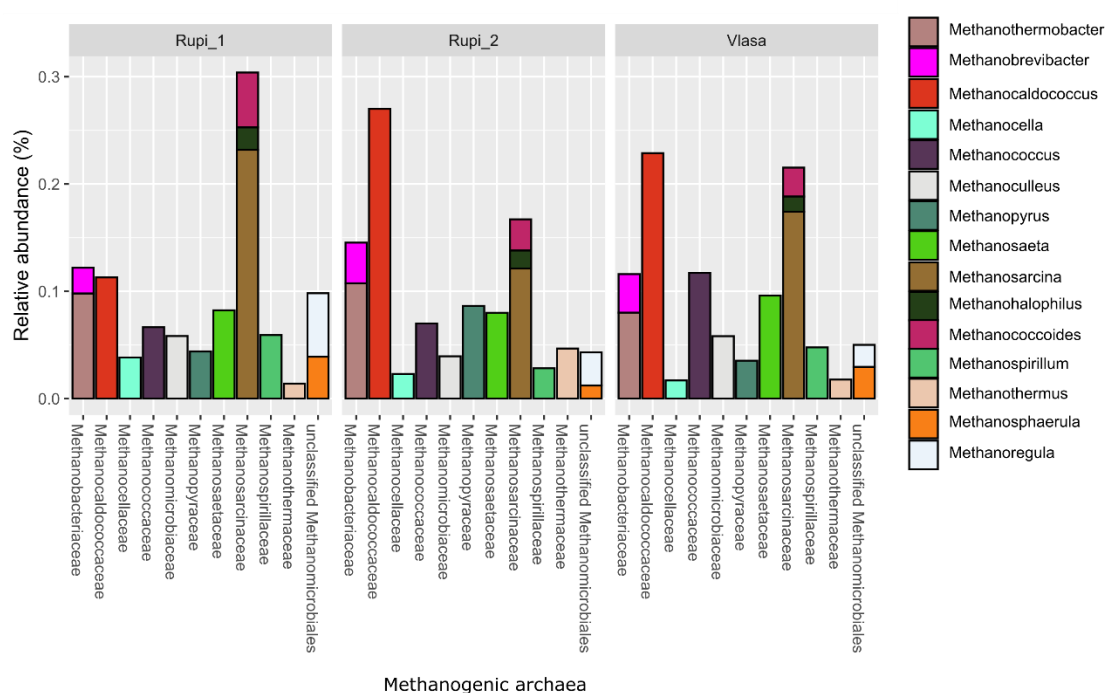
Най-голямо количество археални секвенции с MG Rast бяха идентифицирани в метагенома на Рупи II (77°C) – 16.7%, във Власа (изворът с най-висока температура, 86°C) – 6.2%, а в Рупи I (73°C) – 2.6% (фиг. 2). В трите извора доминираха различни типове (фиг. 7). Групата на амоняк-окисляващите археи *Thaumarchaeota* беше еднакво

представена в Рупи I и II и заемаше около 1/3 от археалните секвенсии, докато във Власа бяха едва 0.6%. Това се обяснява с намалената концентрация на амониевите йони във водата на Власа, както и по-високата температура в този извор.



Фигура 7. Разпределение на археалните типове в Рупи I, Рупи II и Власа с използване на RefSeq и MG Rast.

В трите извора се откри разнообразие от метаногени, разпределени в 10 метаногенни семейства (фиг. 8). С доминиращо присъствие в трите извора бяха родовете *Methanosarcina* и *Methanocaldococcus*.

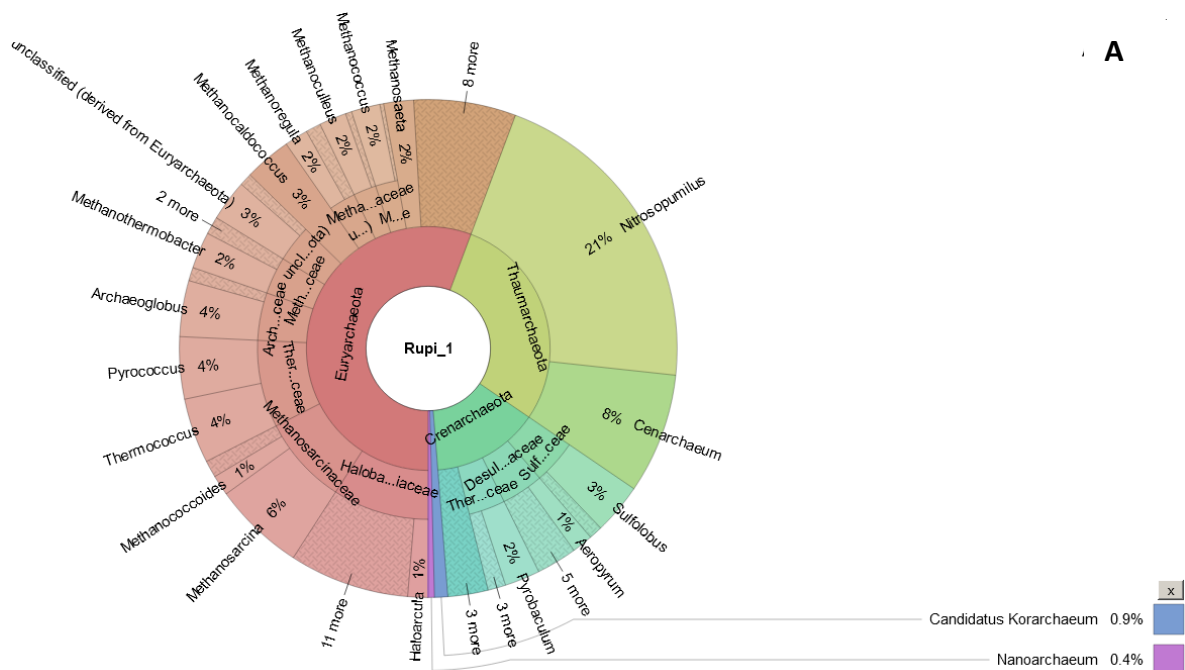


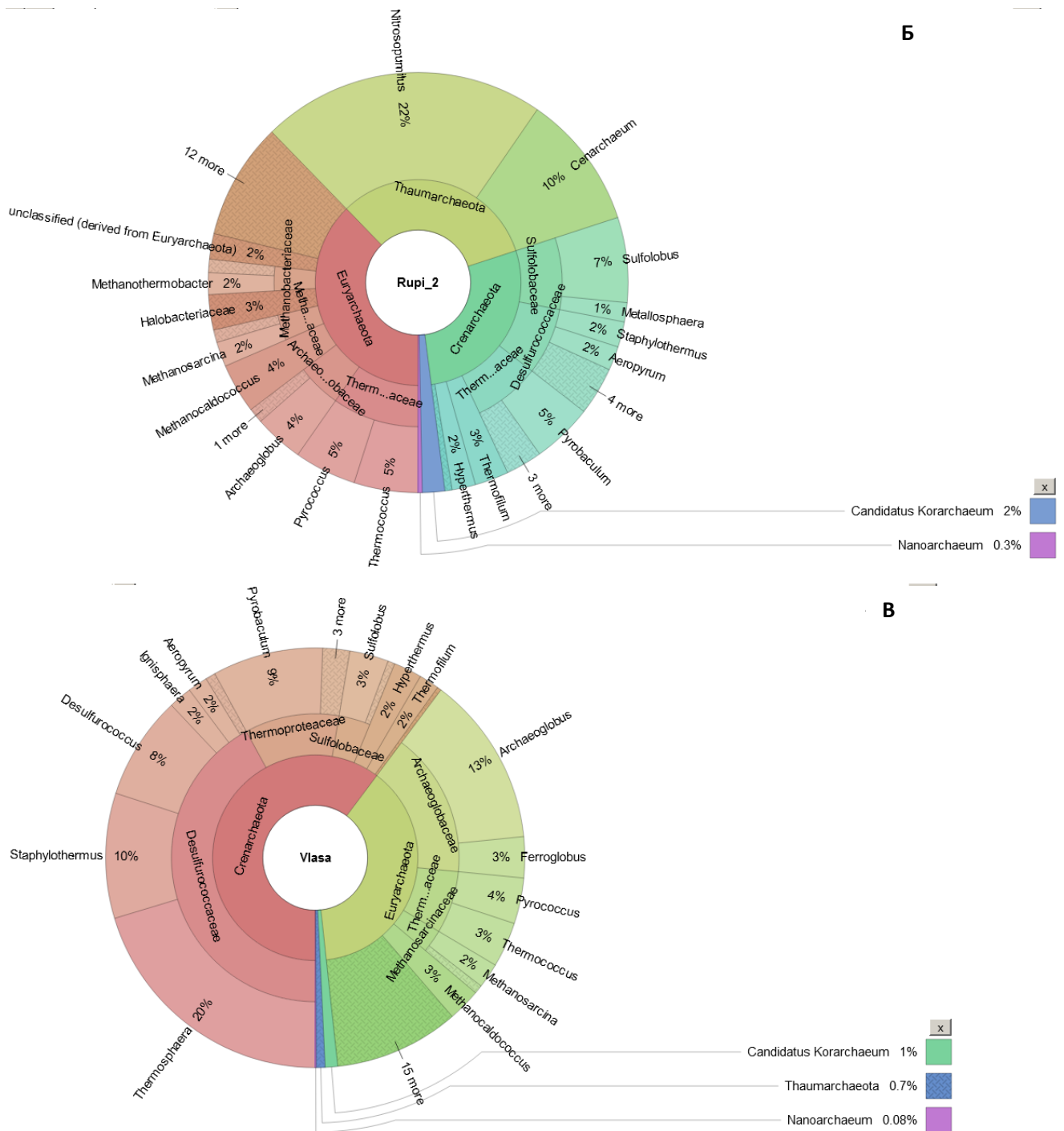
Фигура 8. Метаногени идентифицирани в Рупи I, Рупи II и Власа.

Род *Methanosarcina* са широко разпространени метаногенни археи, способни да метаболизират разнообразен кръг от субстрати като H_2/CO_2 , метанол, метиламин, метилсулфид и ацетат през четири различни метаногенни пътя. Представители са открити в местообитания простиращи се от морски и сладководни утайки до стомашно-чревния тракт (Lyu & Liu 2018; Youngblut et al. 2015; Anderson et al., 2009; Thauer et al., 2008).

Тип *Crenarchaeota*, наричани още групата на хипертермофилните археи, бяха най-многобройни във Власа, с 64% от аотираниите археални секвенции, определено с MG Rast. Всички кренархеални секвенции, открити в изследваните извори, принадлежаха към Клас *Thermoprotei*, разпределени между *Desulfurococcales*, *Thermoproteales* и *Sulfolobales*. Род *Thermosphaera* от *Desulfurococcales* беше идентифициран като най-многобройният археален род във Власа, заемащ 20% от археите в извора (фиг. 9В).

В Рупи II и Рупи I секвенциите онесени към *Thaumarchaeota* заемаха 37% и 36% от археите съответно. От този тип бяха и най-разпространените родове от археите в изворите – *Nitrosopumilus* (22% в Рупи II, 21% в Рупи I) и *Cenarchaeum* (10% в Рупи II, 8% в Рупи I) (фиг. 9АБ).





Фигура 9. Разпределение на археалните секвенции в Рупи I (А), Рупи II (Б) и Власа (В) определено с MG Rast/RefSeq.

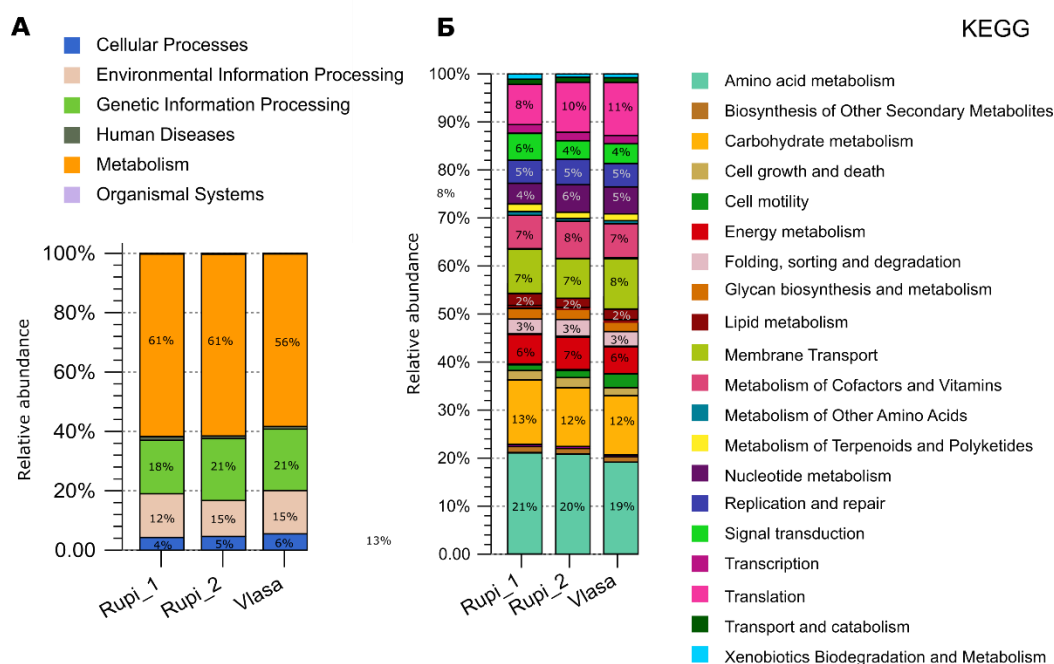
Въпреки, че повечето докладвани амоняк-окисляващи археи от *Nitrosopumilus* са с морски или почвен произход, от мезофилни аеробни хабитати е изолиран и един умерено термофилен представител (*Nitrososphaera gargensis*) и са описани три екстремно термофилни амоняк-окисляващи археи (AOA) (*Candidatus Nitrosocaldus yellowstonii*, *Candidatus Nitrosocaldus cavascurensis* и *Candidatus Nitrosocaldus islandicus*) (Palatinszky

et al. 2015; De la Torre et. al. 2008; Abby et al. 2018; Daebeler et al. 2018), което доказва високо температурния капацитет на ензима амоняк-монооксигеназа (*amoA*) (De la Torre et. al. 2008; Hatzenpichler et. al. 2008).

Археалният консорциум в трите извора беше съставен както от типични за местообитанието родове, така и от нехарактерни като халофилни, ацидофилни археи, както и типично морски родове. Наличието на толкова много секвенции, отнесени към нетипични за местообитанието археални родове е в синхрон с непрекъснато променящата се картина на царство Археа. Развитието на нашето разбиране за физиологията и екологията на археите силно се подпомогна от метагеномните анализи, които разкриха повсеместното им разпространение и огромно биоразнообразие.

2.Метаболитна реконструкция с използване на MG Rast и базата данни KEGG

Метагеномният подход с използване на стратегия *shotgun* секвениране дава генетична основа за извършване на метаболитна реконструкция. Разкрити са различни метаболитни типове включващи хетеротрофи и хемолитотрофи, включително метаногенни, ацетогенни, хидрогенотрофни, нитрифициращи (включително амоняк-окислител и нитрит-окислител), сяра окисляващи и окисляващи ароматни съединения. Гените асоциирани с аминокиселинния метаболизъм преобладаваха над гените свързани с въглехидратния метаболизъм и бяха най-разпространената функция в трите извора (фиг. 10Б).

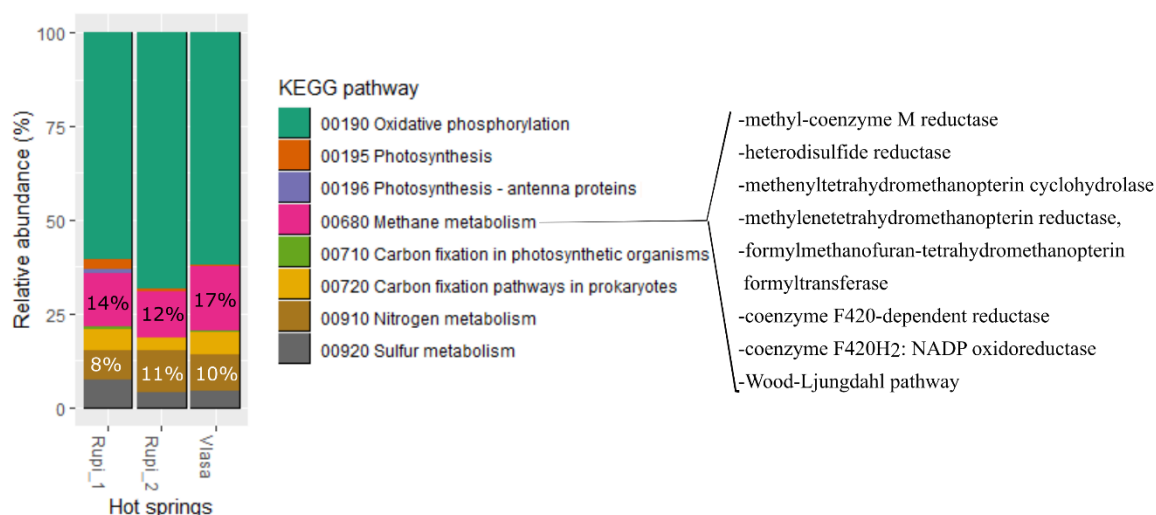


Фигура 10. Разпределение на ORFs от трите извора към основните функционални категории в KEGG, ниво 1 (А) и под-ниво 2. (Б).

От въглехидратния метаболизъм се откриха ORFs кодиращи ензими участващи в Цикъла на Трикарбоксилите киселини и окислителното фосфорилиране, което сочи за присъствие на аеробно окисление като енергийна стратегия в трите извора. Аеробни хемоорганотрофи са доминиращите *Thermus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Meiothermus*, *Pseudomonas* за Власа, *Thermus*, *Meiothermus*, *Bacillus*, *Ca. Solibacter* за Рупи II и *Meiothermus*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Ktedonobacter*, *Acidobacterium*, *Ca. Solibacter*, *Ca. Koribacter* за Рупи I.

Термофилният начин на живот благоприятства алтернативни метаболитни пътища и наред с аеробният хемоорганотрофен метаболизъм, в изследваните извори се откриха и генетични основи за литотрофия.

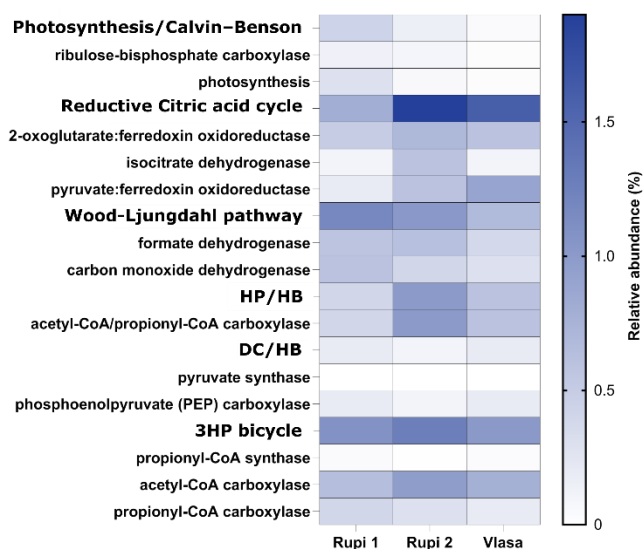
В трите извора се откриха повечето ензими от метаногенезата, както и от пътя Wood-Lingdahl за фиксиране на CO₂ (фиг. 11). Последният е характерен както за метаногенни археи така и за ацетогенни бактерии и карбоксидотрофи (Inoue et al. 2019).



Фигура 11. Разпределение на ORFs отнесени към енергийния метаболизъм.

Автотрофният ацетогенен метаболизъм (синтезиране на ацетат от H_2 и CO_2 анаеробно) се счита за един от най-рано възникналите. Откриха се генетични доказателства за ацетогенеза, представена от ензимите фосфотрансацетилаза и ацетат киназа в комбинация с пътя Wood-Ljungdahl. ORFs кодиращи ацетат киназа бяха най-малко в Рупи II - 0.2% от ORFs на въглехидратния метаболизъм, докато в Рупи I и Власа заемаха 0.5%.

В изследваните извори бяха идентифицирани различни видове автотрофен въглероден метаболизъм, както може да се установи от анализа на ключови ензими за тези пътища (фиг. 12).



Фигура 12. Разпространение на ключови гени от автотрофни пътища за фиксиране на CO_2 .

Азотният метаболизъм обхващаше 8% от енергийния метаболизъм в Рупи I, 11% в Рупи II и 10% във Власа (фиг. 11). В метагеномите на трите извора се откриха ORFs за всички ензими от денитрификацията - нитрат редуктаза, нитрит редуктаза, азотен оксид редуктаза, ди-азотен оксид редуктаза. В допълнение в Рупи I и Рупи II бяха идентифицирани ORFs кодиращи нитрогеназа (*nifD*, *nifK*) и азот-фиксиращ протеин (*nifTB*), за разлика от Власа където гени за азот-фиксация не бяха установени. Бяха идентифицирани също ORFs кодиращи хидроксиламин оксидоредуктаза (*hao*), която участва в нитрификацията като катализира превръщането на хидроксиламина, получен при окислението на амоняк, в нитрит. ORFs кодиращи амоняк монооксигеназа, катализираща аеробното окисление на NH_3 до NO_2^- през NH_2OH не бяха идентифицирани с MG Rast.

Литотрофният метаболизъм с използване на сяра или сулфати е често срещана стратегия сред термофили и хипертермофили. ORFs отнесени към метаболизма на сярата в Рупи I бяха приблизително два пъти повече в сравнение с Рупи II и Власа и слабо надхвърляха азотните ORFs. Обратната тенденция, но с по-голям порядък, се наблюдаваше в седиментните съобщества, където гените от азотния метаболизъм бяха близо три пъти повече от гените на серния. Бяха открити гени от пътища за окисление и редукция на сулфит. S-окисляващ е доминантът в Рупи I – *Thiomonas* (фиг. 11A), който е с широки метаболитни възможности простиращи се от литотрофия – окислява редуцирани неорганични серни съединения и водород, през миксотрофия, до хетеротрофия на пируват, оксалат, ацетат, глутамат (Vésteinsdóttir et al. 2011; Asano et al. 2011), както и *Thiobacillus denitrificans*, който беше идентифициран в Рупи I с Metaphlan2.

В олиготрофната среда на Рупи I се очерта тенденция за използване на окисление на сяра като енергийна стратегия.

От метаболизма на желязото, в изследваните извори бяха идентифицирани в по-голямо количество секвенции от гени, кодиращи протеини от ABC транспортни системи на желязо и феритин-подобни протеини. В изследваните извори като Fe-окисляващи може да се посочат *Ferroglobus*, а като Fe-редуциращи - род *Thermoanaerobacter* и *Geobacter* (Hedrich et al. 2011; Li et al. 2015).

В Рупи II и Власа бяха идентифицирани три типа метаболизъм зависещи от H_2 – хидрогенотрофна метаногенеза, автотрофна ацетогенеза и хидрогенотрофна литотрофия, характерна за доминиращия във Власа *Aquificae*. Потенциален биогенен източник на H_2 в споменатите извори са идентифицираните стриктни, анаеробни, хемоорганотрофни

термофили, открити в по-голямо количество във Власа – *Thermotoga*, *Fervidobacterium*, *Caldicellulosiruptor*, *Dictyoglomus* и *Clostridium*, от който има описани термофилни представители. Водородът се очерта като важен субстрат в седиментните съобщества на изследваните извори, особено силно изразено във Власа и в по-малка степен в Рупи II.

В метагеномите на трите извора се откриха гени от категорията Биодеградация на ксенобиотици с преобладаване в Рупи I.

3. Реконструкция на драфт геноми от метагеномите на извори Рупи I, Рупи II и Власа

Бяха реконструирани драфт геноми с различно качество от доминиращите бактерии и/или археи в трите извора, определени с MG Rast. От асемблирания метагеном на Власа (фиг. 13) бяха реконструирани *Thermosphaera aggregans*, *Fervidobacterium penivorans* и *Pseudothermotoga caldifontis*. От метагенома на Рупи I (фиг. 13) бяха реконструирани пет драфт генома, от които два бяха определени - некултивируема бактерия OLB17 sp003223975 (*Acidobacterium* group) и представител на род *Thiomonas*. От Рупи II (фиг. 13) бяха реконструирани най-много драфт геноми – 18 (табл. 1). По-голямата част от реконструиранияте MAGs бяха от некултивируеми бактерии и четири драфт генома бяха отнесени към некултивируеми археи. Археалните MAGs бяха от Клас *Nitrososphaeria*.

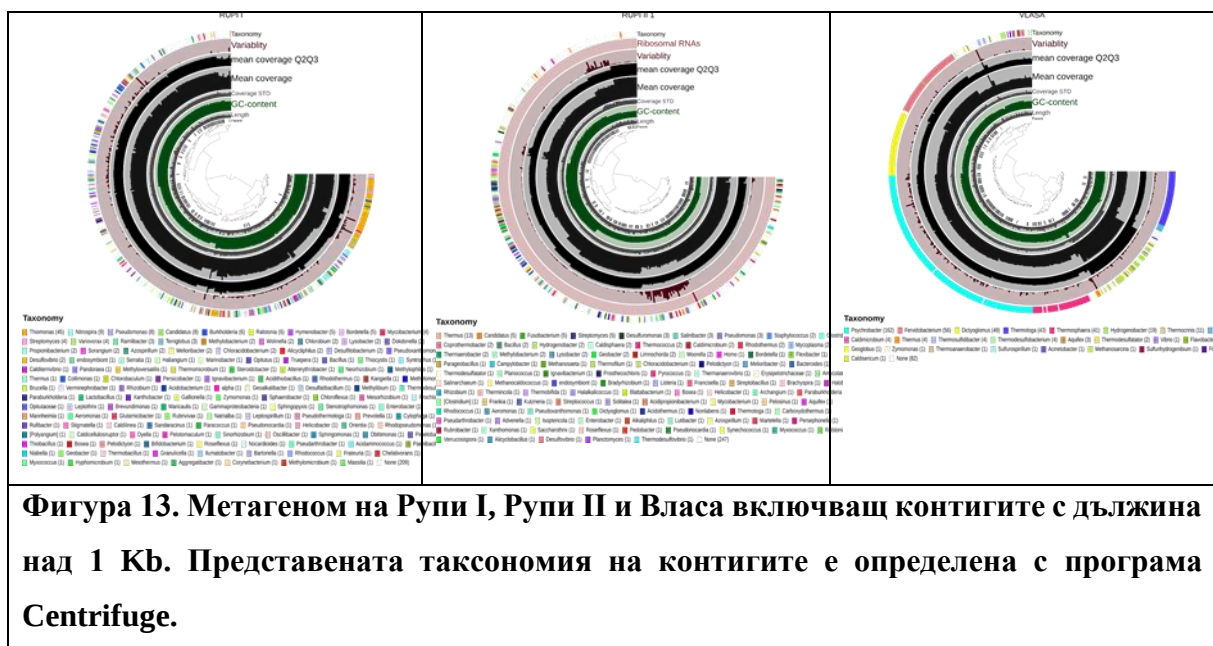


Таблица 1. Характеристики на реконструираниите MAGs от Рупи II.

MAG name	Size	Completeness (%)	Contamination (%)	GC content (%)	N50	Mean coverage	Taxonomy
R2.1-Armatimonadota_2	2.80 Mb	90.9	1.39	60.8	10175	30.14	d_Bacteria p_Armatimonadota c_Fimbriimonadia o_OS-L f_GBS-DC g_GBS-DC s_GBS-DC sp001442985
R2.1-Armatimonadota_5	3.05 Mb	73.27	4.94	55.7	3369	12.15	d_Bacteria p_Armatimonadota c_HRBIN17 o_HRBIN17 f_HRBIN17 g_HRBIN17 s_HRBIN17 sp002898575
R2.1-Thermus_1	1.14 Mb	40.89	3.04	68.5	2502	19.53	d_Bacteria p_Deinococcus-Thermus c_Deinococci o_Thermales f_Thermaceae g_Thermus
R2.1-Thermus_3	817.62 Kb	28.45	0	65.9	2266	20.57	d_Bacteria p_Deinococcus-Thermus c_Deinococci o_Thermales f_Thermaceae g_Thermus
R2.1-Chloroflexi	1.66 Mb	78.7	2.57	69.1	5155	8.79	d_Bacteria p_Chloroflexota c_Dehalococcoidia o_SM23-28-2 f_HRbin24 g_HRBIN24 s_HRBIN24 sp002898715
R2.1-Thermoflexus	2.95 Mb	90.35	3.18	68.2	13789	14.06	d_Bacteria p_Chloroflexota c_Anaerolineae o_Thermoflexales f_Thermoflexaceae g_Thermoflexus s_Thermoflexus hugenholtzii
R2.1-Firmicutes	2.09 Mb	79.17	1.47	72.1	14912	15.64	d_Bacteria p_Firmicutes_H c_CSP1-3 o_CSP1-3 f_HRBIN32 s_HRBIN32 sp002898935
R2.1-Kryptonium_6	1.93 Mb	62.22	2.73	37.2	35703	34.57	d_Bacteria p_Candidatus Kryptonia c_

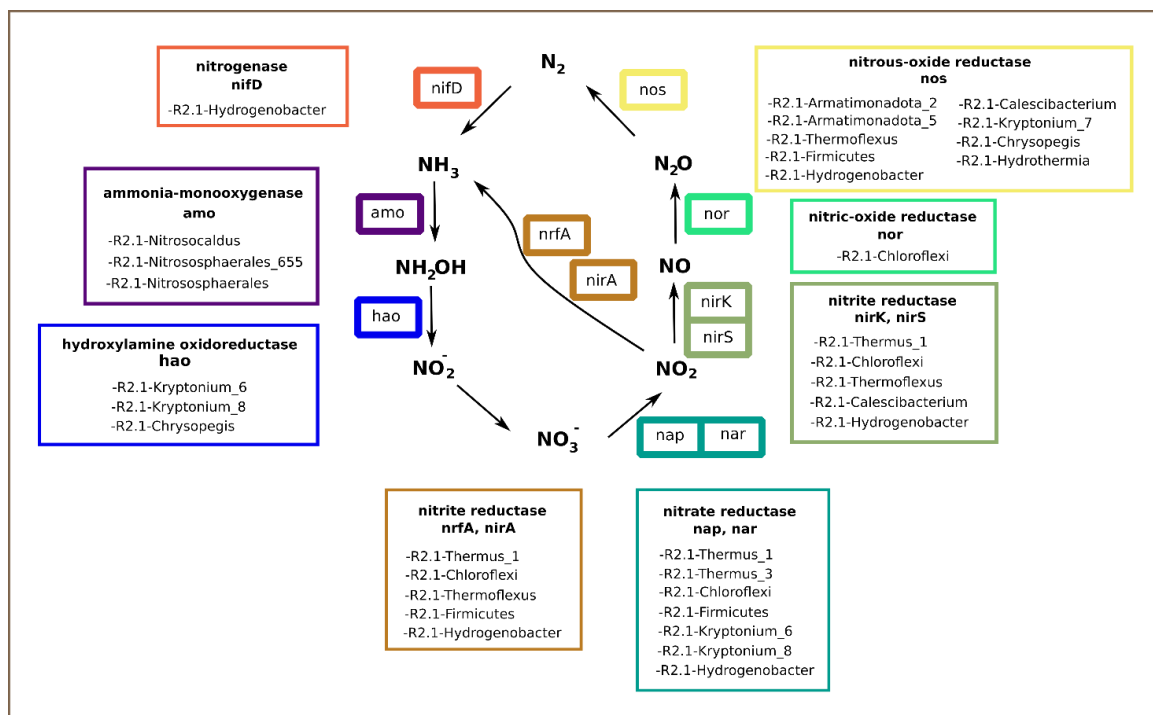
							o_ f_ g_ <i>Candidatus</i> Kryptonium s_ <i>Candidatus</i> Kryptonium thompsoni
R2.1- Kryptonium_7	818. 1 Kb	47.83	4.55	38.3	4679	35.2	d_Bacteria p_ <i>Candidatus</i> Kryptonia c_ o_ f_
R2.1- Kryptonium_8	1.27 Mb	33.97	5.17	36.5	4542	60.9	d_Bacteria p_ <i>Candidatus</i> Kryptonia c_ o_ f_
R2.1- Calescibacteri um	1.88 Mb	85.35	2.17	36.4	86781	34.2	d_Bacteria p_ <i>Candidatus</i> Calescamantes c_ o_ f_ g_ <i>Candidatus</i> Calescibacterium
R2.1- Chrysopegis	2.06 Mb	87.57	2.46	36.4	19123	16.74	d_Bacteria p_ <i>Candidatus</i> Kryptonia c_ o_ f_ g_ <i>Candidatus</i> Chrysopegis s_ <i>Candidatus</i> Chrysopegis kryptomonas
R2.1- Hydrothermia	1.47 Mb	93.22	3.39	27.5	15994	21.82	d_Bacteria p_WOR-3_A c_Hydrothermia o_LBFQ01
R2.1- Hydrogenobac ter	1.38 Mb	54.19	6.91	42.8	2062	7.03	d_Bacteria p_Aquificae c_Aquificae o_Aquificales f_Aquificaceae g_Hydrogenobacter
R2.1- Nitrososphaera les_655	1.27 Mb	91.75	0.97	38.0	16378	162.41	d_Archaea p_Thaumarchaeota c_Nitrososphaeria o_Nitrososphaerales f_HRBIN04 g_HRBIN04 s_HRBIN04 sp002898655
R2.1- Nitrosocaldus	1.22 Mb	96.12	0.56	42.4	16715	38.57	d_Archaea p_Thaumarchaeota c_Nitrososphaeria

							o_ <i>Candidatus</i> Nitrosocaldales f_ <i>Candidatus</i> Nitrosocaldaceae g_ <i>Candidatus</i> Nitrosocaldus s_ <i>Candidatus</i> Nitrosocaldus cavascurensis
R2.1- Nitrososphaerales	555 Kb	7.77	0	34.2	6408	63.27	d_Archaea p_Thaumarchaeota c_Nitrososphaeria o_Nitrososphaerales
R2.1- Caldiarchaeales	1.53 Mb	98.06	0	52.6	34096 2	38.58	d_Archaea p_Thaumarchaeota c_Nitrososphaeria o_ <i>Candidatus</i> Caldiarchaeales f_HR02 g_HRBIN02 s_HRBIN02 sp002898395
The taxonomy estimation was set with minimum percent identity value of 90.							

4. Азотен цикъл, осъществяван от термофилната микробна популация на горещ извор Рупи II

В екстремно термофилни хабитати ($< 70^{\circ}\text{C}$) редица микробиологични въпроси свързани с прокариотния компонент задвижващ биогеохимичния цикъл на азота, сярата или въглерода са все още неизяснени. От метагенома на извор Рупи II бяха реконструирани най-много драфт геноми (таблица 1), което ни даде възможност да проследим екологичната роля на термофилното микробно съобщество в контекста на азотния цикъл. Фокусът беше върху гени кодиращи нитрогеназа, амоняк монооксигеназа, хидроксиламин оксидоредуктаза, нитрит оксидоредуктаза и нитрат, нитрит, азотен оксид и ди-азотен оксид редуктази.

Бяха разкрити ясни генетични доказателства, които предполагат ролята и приноса на членовете на термофилната популация за азотния цикъл. В 17 MAGs от общо 18 бяха идентифицирани гени, кодиращи ензими, участващи в биогеохимичния цикъл на N_2 . Само в археалния MAG R2.1-Caldiarchaeales не бяха открити гени, участващи в N_2 цикъла.



Фигура 14. Основни ензими, участващи в биологичния азотен цикъл, идентифицирани във възстановените MAGs от метагенома на горещ извор Rupī II.

Ген кодиращ нитрогеназа (Mo-Fe nifD) беше идентифициран само в R2.1-Hydrogenobacter, обуславящ възможност за фиксиране на атмосферен N_2 (фиг. 14). Фиксиране на N_2 от представители на типичния термофилен тип *Aquificae* беше наскоро демонстрирано за първи път от Nishihara et al. (2018).

Аеробното окисление на амоняк до нитрат през нитрит (нитрификация) е съществен етап в азотния цикъл, осъществяван от повсеместно разпространени прокариотни представители. Гени кодиращи амоняк-монооксигеназа (amo) бяха идентифицирани в реконструиранияте три таумархеални MAGs (R2.1-Nitrosocladus, R2.1-Nitrososphaerales_655 и R2.1-Nitrososphaerales).

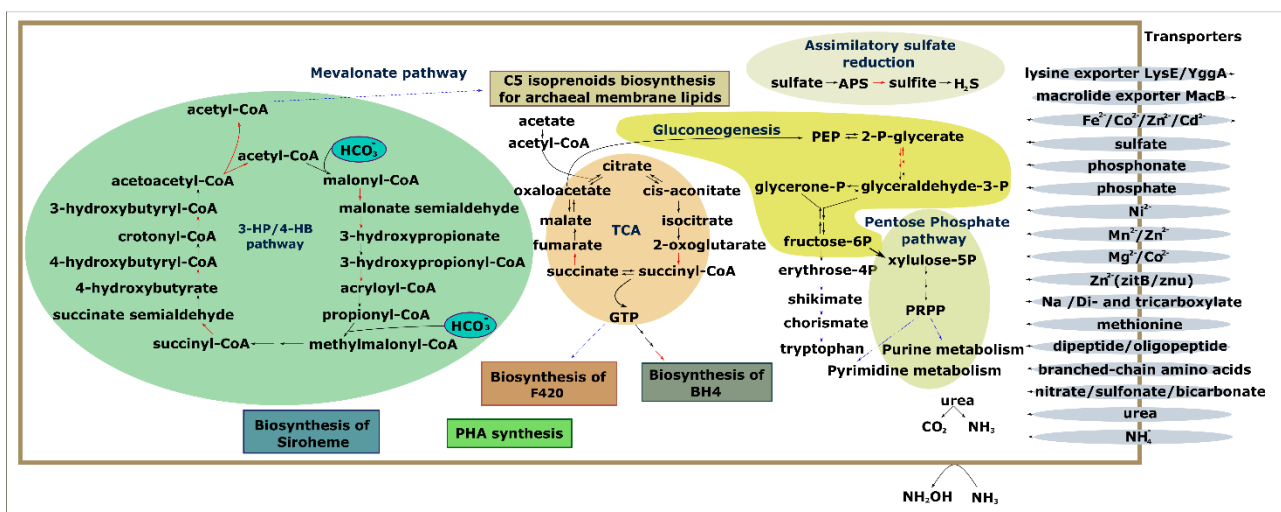
Фрагменти от хидроксиламин оксидоредуктаза (hao) бяха идентифицирани в три бактериални MAGs от тип *Candidatus Kryptonion*.

Наблюдаваше се различен денитрифициращ капацитет в реконструиранияте MAGs от Рупи II. Нито един от MAGs не беше идентифициран като пълен денитрификатор, притежаващ четирите редуктази необходими за редукция на нитрат до азот. Генетично обусловена способност (наличие на nosZ гени) за редукция на N_2O до N_2 беше открита при най-много драфт геноми (девет бактериални MAGs), което предполага, че този парников газ вероятно присъства в голямо количество в седиментите на извор Rupī II и

поради неговата токсичност е необходимо бързо да бъде трансформиран и отстранен от местообитанието. Активността на ди-азотен оксид редуктазите оказва значително въздействие върху околната среда по отношение на намаляването на инертния парников газ N₂O, който причинява разрушаване на озоновия слой.

5. Таумархеални MAGs от Рупи II. Метаболитна реконструкция на MAG R2.1-Nitrososphaerales_655

Групата на АОА може да бъде описана с няколко характеристики като повсеместно разпространение в разнообразни местообитания, висока степен на адаптивност към екстремни среди и голямо биоразнообразие (Zhou et al. 2015). С цел изясняване на основите на „екологичния успех“ на АОА беше извършена метаболитна реконструкция на MAG R2.1-Nitrososphaerales_655 (фиг. 15), който според покритието на секвенирането е най-разпространен в метагенома на Рупи II (асемблираната фракция включваща контигите над 1 Kb).



Фигура 15. Метаболитна реконструкция на MAG R2.1-Nitrososphaerales_655.

Преобразуванията, за които съответните ензими не са идентифицирани в R2.1-Nitrososphaerales_655, са обозначени с червени стрелки.

Централен въглероден метаболизъм

Въпреки че няколко ензима от модифицирания път НР/НВ, предложен по-рано за таумархеалните амоняк-окислителители (Könneke et al. 2014), не бяха идентифицирани в

R2.1-Nitrososphaerales_655, едно копие от ключовия ензим, катализиращ HCO_3^- фиксацията ацетил-CoA/пропионил-CoA карбоксилаза беше открит (фиг. 15).

Подобно на термофилните таумархеални амоняк-окислителите беше идентифициран почти пълен цикъл на Трикарбоксиловите киселини (ТСА цикъл) и пълна глюконеогенеза, осигуряващи прекурсори за биосинтетични реакции. Бяха идентифицирани и няколко гена, кодиращи ензими от редуктивния ТСА цикъл. От гликолизата беше идентифициран модулът включващ 3-въглеродни съединения, като липсваше пируват киназа и ацетил-трансфериращата пируват дехидрогеназа. Доставянето на ацетил-CoA за ТСА цикъла може да бъде НР/НВ или ацетат, тъй като беше идентифицирана ацетил-CoA синтетаза, подобно на *Ca. N. cavascurensis* (Abby et al. 2018). Неоксидативната фаза на Пентозо фосфатния път (фруктозо-6-фосфат до рибозо-5-фосфат) беше пълна, осигуряваща прекурсори за биосинтеза на нуклеотиди.

Бяха идентифицирани две копия на ген, кодиращ полихидроксиалканоат синтаза, което предполага, че полихидроксиалканоатите (PHA) са вероятни съединения, служещи като енергиен и въглероден резерв, подобни на повечето мезофилни АОА (Poli et al., 2011) и умерено термофилната *N. gargensis* (Spang et al. 2012).

Електрон-транспортна система

В съответствие с докладваните данни, касаещи структурата на таумархеалната електрон-транспортна система, бяха идентифицирани цитохром b тип, heme-мед оксидази и няколко пластоцианини (електронни преносители) (Walker et al. 2010; Abby et al. 2018).

Хемолитотрофен метаболизъм

В R2.1-Nitrososphaerales_655 бяха открити две субединици на ензима амоняк-монооксигеназа - amoA и amoB разположени в непосредствена близост и съседен скъсен ген (261 bp), аотиран като предполагаем amoB. В допълнение бяха идентифицирани също гени, кодиращи алфа, бета, гама субединици на ензима уреаза (ureA, ureB, ureC) и съседно разположени гени за уреазни аксесорни протеини (UreE, UreF и UreD). Също така бяха открити два гена кодиращи транспортери за уреа. В генома на R2.1-Nitrososphaerales_655 бяха идентифицирани два гена кодиращи нитроредуктаза и три гена кодиращи нитроимидазол редуктаза (NimA), предполагащи способност за редукция на съединения съдържащи нитро функционална група, включително нитроароматни съединения. Два гена в R2.1-Nitrososphaerales_655 бяха аотирани като нитрилаза/цианид хидратаза. Използване на цианат или нитрили, заедно с амоняк и урея

е докладвано за много АОА, както мезофилни, така и термофилни (Palatinszky et al., 2015; Sauder et al., 2017; Qin et al., 2017; Daebeler et al. 2018; Spang et al. 2012).

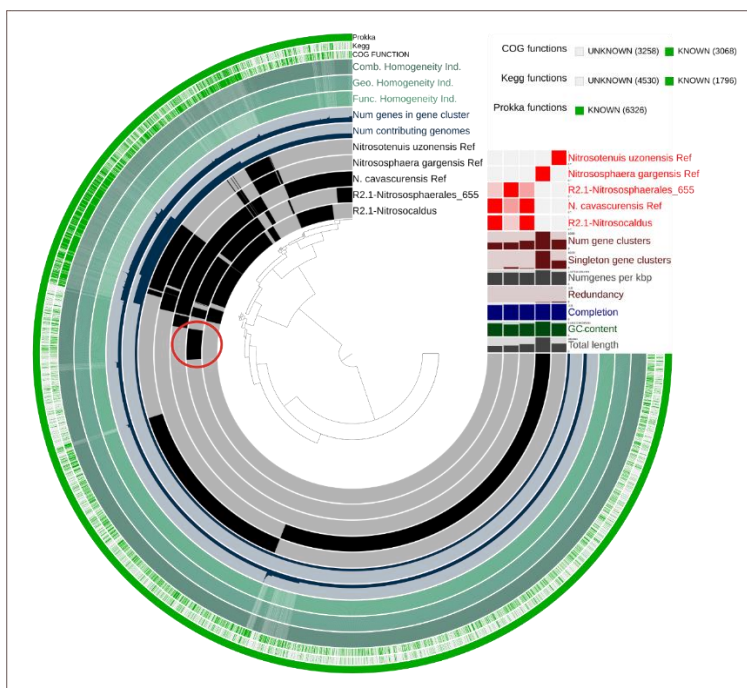
Устойчивост към токсични метали

Интригуващо, в R2.1-Nitrososphaerales_655 беше идентифицирана арсенат редуктаза (ArsC) в близост до ген кодиращ катионен ефлуксен белтък за $\text{Fe}^{+2}/\text{Co}^{+2}/\text{Zn}^{+2}/\text{Cd}^{+2}$ от семейството на CDF (cation diffusion facilitator transporter) обуславящ устойчивост на двувалентни метални катиони. Идентифицираният ген за арсенат редуктаза разположен в непосредствена близост до ген кодиращ ефлуксен транспортен белтък предполага, че редуктазата по-скоро може да има детоксифицираща роля при R2.1-Nitrososphaerales_655, отколкото да е свързана с използване на арсенит като биоенергетичен субстрат за хемолитотрофен растеж или анаеробно арсенатно дишане. Арсенът е силно мобилен, считан за един от най-токсичните метали, често свързан с геотермални среди (Bundschuh and Maity, 2015). Арсенат редуктаза не се съобщава за АОА и появата и в R2.1-Nitrososphaerales_655 може да се дължи на геохимичната характеристика на местообитанието Рупи II.

Метаболизиране на пептиди

Не бяха открити транспортери за захари в R2.1-Nitrososphaerales_655, но бяха идентифицирани няколко за протеиногенни субстрати (фиг. 36). Системите за транспорт на олигопептиди и аминокиселини заедно с идентифицираните протеази, аминопептидази, една метало-карбоксипептидаза и голям брой аминотрансферази, предполага използване на аминокиселини. Последните могат да бъдат източник на амоняк или да служи като въглероден и/или енергиен субстрат при анаеробни условия. Може да се предположи, че е възможно да протичат реакции на Stickland и продуктите от окислително и редуктивно деаминиране на аминокиселини могат да бъдат по-нататък предмет на субстратно фосфорилиране. В допълнение на предположението, произходът на метагеномната ДНК, изследвана в настоящото проучване, са седиментите на горещ извор - местообитание силно свързано с условия близки до безкислородните.

Реконструиранията таумархеални MAGs с високо качество бяха сравнени със секвенирани представители на амоняк-окисляващи *Thaumarchaeota* – екстремно термофилните *Ca. Nitrosocaldus cavascurensis* и *Ca. Nitrosocaldus islandicus*, умерено термофилната *Nitrososphaera gargensis* и мезофилния *Nitrosotenuis uzonensis* (фиг. 16).



Фигура 16. Пангеномно сравняване на R2.1-Nitrosocaldus, R2.1-Nitrososphaerales_655 и секвенирани геноми на *Ca. N. cavascurensisi*, *Nitrososphaera gargensis* и *Nitrosotenuis uzonensis*. Специфичният само за R2.1-Nitrososphaerales_655 генен клъстер е ограден с червено.

Уникалният за R2.1-Nitrososphaerales_655 генен клъстер (фиг. 16) съдържаше гени кодиращи протеини, участващи в поддържането на хромозомната архитектура, транспозази, транскрипционни регулатори, ензими участващи във възстановяването на ДНК. В R2.1-Nitrososphaerales_655 беше идентифициран ген, кодиращ обратна гираза, индикация за термофилен начин на живот, за разлика от *Ca. N. cavascurensisi* и *Ca. N. islandicus*, за които е докладвана липса (Abby et al. 2018; Daebeler et al. 2018). Температурата на местообитанието на R2.1-Nitrososphaerales_655 е 77°C, само 2-3° над горната граница, измерена за двата екстремофилни представителя на род *Ca. Nitrosocaldus*, но определящи необходимостта от компенсаторен механизъм, стабилизиращ двойната спирала на ДНК.

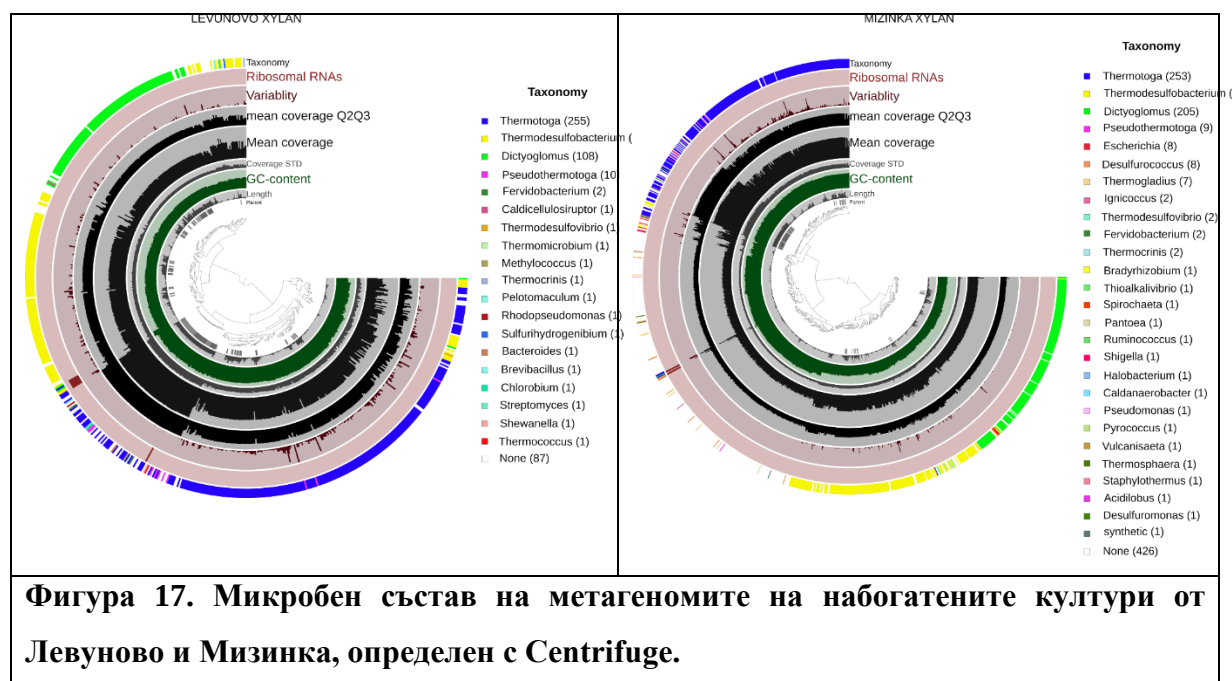
Реконструираният метаболитен потенциал на R2.1-Nitrososphaerales_655 показва широки възможности за използване на различни азот съдържащи субстрати - амоняк, урея, нитрили, нитро-ароматни съединения и аминокиселини.

6. Метагеномен анализ на набогатени култури от Левуново и Мизинка в среда с ксилан

Набогатяването на микробни съобщества в среди с предварително избрани субстрати влияе върху композицията на микробното съобщество, създавайки селективни култивационни условия за изолиране на перспективен продуцент. От друга страна, асемблираният метагеном на културата предоставя пълни ORFs на гени кодиращи ензими с потенциал, които могат да бъдат клонирани, експресирани и изследвани.

С цел набогатяване на анаеробни продуценти на ксиланази, проби от Левуново (83°) и Мизинка (88°C) бяха култивирани в среда с 0.3% ксилан от овес. Култивирането беше проведено с използване на Hungate техника (за анаероби). Двете смесени култури, набогатени в среда с ксилан като единствен въглероден източник, са култивирани при съответните за изворите температури (83° – Левуново, 88°C – Мизинка).

В двете култури доминираха *Thermotogae*, *Thermodesulfobacterium* и *Dictyoglomus* (фиг. 17).



Очаквано, доминантната фракция на набогатения термофилен консорциум в двете изследвани култури се състоеше от екстремно термофилни анаеробни хемоорганотрофни бактерии. Идентифицираните доминанти *Thermotoga* и *Dictyoglomus* са известни със своята способност да разграждат ксилан.

Другият доминант в двете култури *Thermodesulfobacterium commune* е термофилна, сулфат-редуцираща бактерия, използваща пируват, лактат и H₂ като донори на електрони

и сулфат или тиосулфат като акцептори на електрони и получаване на сулфид (Bhatnagar et al. 2015). Въпреки че ксиланът не може да бъде използван от *Thermodesulfobacterium*, крайните продукти от метаболизма на *Dictyoglomus* и *Thermotoga* като лактат или H_2 са достъпни субстрати за сулфат-редуктора. Средата, съдържаща сулфат, поддържа метаболизма, служещ за акцептор на електрони.

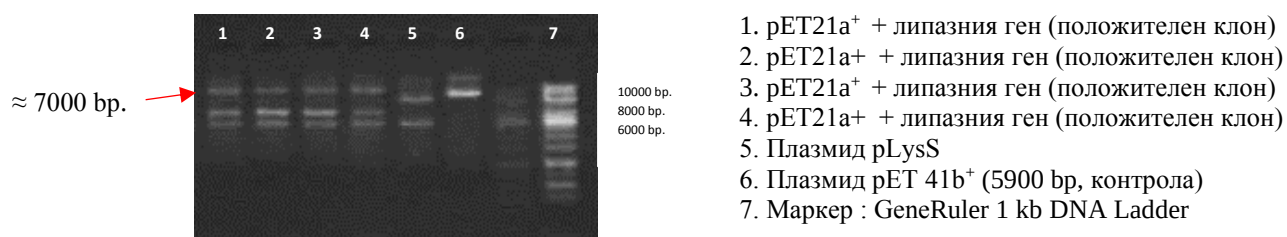
От двете набогатени култури бяха реконструирани геномите на доминантите - *Dictyoglomus thermophilum*, *Thermotoga*, *Thermodesulfobacterium commune*. В допълнение от метагенома на културата от Мизинка беше възстановен и един археален клъстер аотиран като *Desulfurococcus mucosus*.

7. Клониране, експресия и характеризиране на термофилна липаза (LipR) от некултивируемата бактерия *Candidatus Calescibacterium*

От реконструираният драфт геном на некултивируемия термофил *Candidatus Calescibacterium* (R2.1- *Calescibacterium*) от метагенома на извор Рупи II, беше избран, клониран и експресиран ген кодиращ предполагаема липаза. Микробните липази са биотехнологично ценни и приложими в различни промишлени процеси.

Candidatus Calescibacterium е хемоорганохетеротрофна, факултативно анаеробна, термофилна, некултивируема бактерия определена към бактериална класа „Calescamantes“ (Kato et al. 2018; Becraft et al. 2016).

Избраната липазна ORF беше клонирана с използване на синтетичен ген (дължина 1332 bp - LipR) във вектор pET21a⁺ с рестрикционни ензими NdeI и XhoI и беше експресирана в *E. coli* BL21 DE3 pLysS (фиг. 18, 19), култивирана в среда LB.



Фигура 18. Агарозна гел електрофореза, визуализираща изолирана плазмидна ДНК от случайно подбрани клонове. Наблюдава се плазмидна ДНК с очаквания размер ≈ 7000 bp. Хетероложно експресираният протеин имаше молекулна маса от около 50 kDa, определена с SDS PAGE (фиг. 45).

1 2 3 4 5 6 7

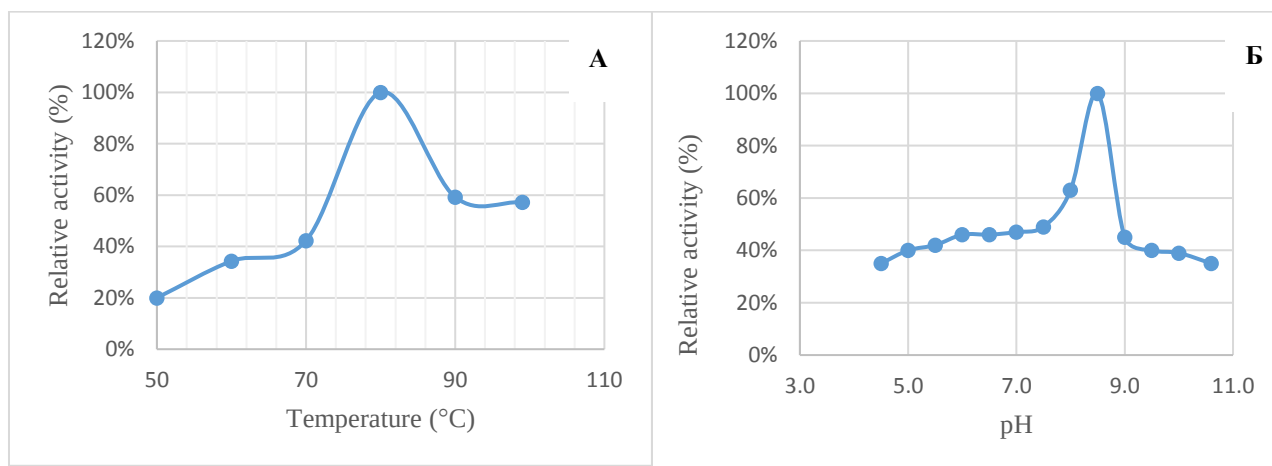


1. 10 mM имидазол
2. 50 mM имидазол
3. 100 mM имидазол
4. 500 mM имидазол
5. 500 mM имидазол
6. Разтворима вътреклетъчна фракция
7. Маркер (Spectra на фирма Thermo Fisher Scientific)

Фигура 19. SDS PAGE визуализация на степента на пречистване на хетероложната липаза.

7.1. Ензимни свойства

LipR се отличава с висока термостабилност, с полуживот от 30 мин. при 99°C, 3 дни при 70° и повече от седмица при 7°C. След един цикъл на замразяване/размразяване, LipR запази 85% от своята активност. LipR имаше максимална активност при 80°C и pH 8.5 и запази 50% от активността си в диапазона 73 - 100°C и pH между 6.0 и 9.0 (фиг. 20).



Фигура 20. Влияние на температурата (А) и pH (Б) върху активността на рекомбинантната липаза.

Липазата LipR произхожда от термофилна, факултативно анаеробна бактерия и се доближава по температурния си оптимум до докладваните липази от археи и от стриктни анаеробни бактерии.

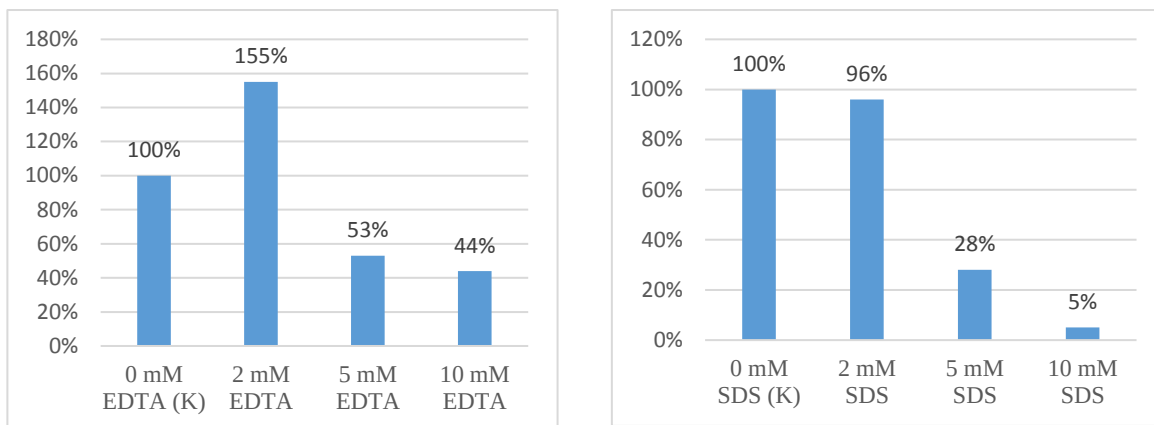
Беше изследвано влиянието на различни метални йони върху активността на рекомбинантната липаза LipR (табл. 2).

Таблица 2. Влияние на метални йони върху активността на LipR. Като контрола използвахме ензимната активност отчетена при оптимални условия.

Сол	Метални йони	Активност (%), 1 mM	Активност (%), 10 mM
Контрола	-	100	100
NaCl	Na ⁺	108	130
CaCl ₂	Ca ²⁺	101	99
NiCl ₂	Ni ²⁺	48	31
CoCl ₂	Co ²⁺	86	46
Li ₂ SO ₄	Li ⁺	116	119
MgCl ₂	Mg ²⁺	114	113
MnCl ₂	Mn ²⁺	102	68
BaCl ₂	Ba ²⁺	110	88
KCl	K ⁺	105	128
CuCl ₂	Cu ²⁺	98	12
FeCl ₃	Fe ³⁺	14	not detectable
ZnSO ₄	Zn ²⁺	8	8

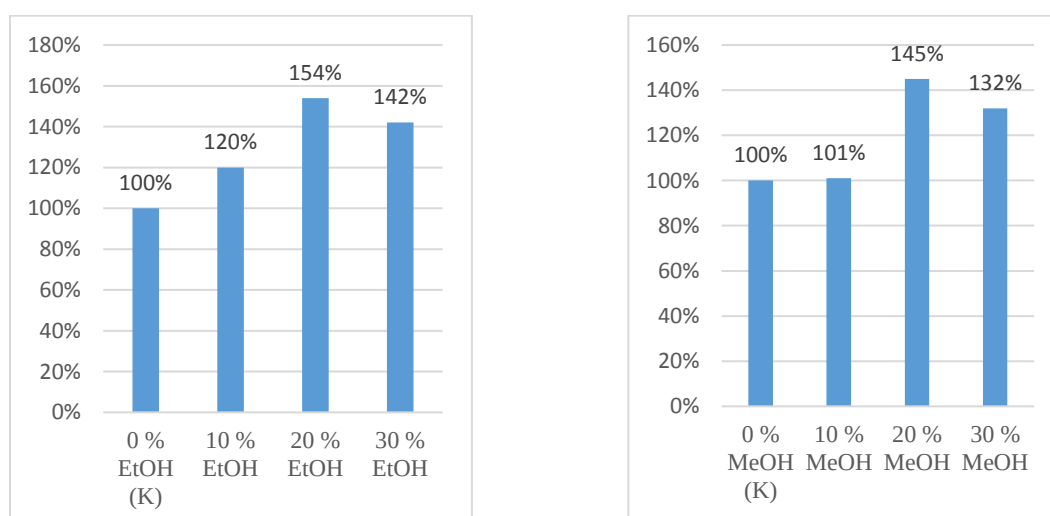
Присъствие на едновалентни йони на Na⁺, Li⁺ и K⁺ в концентрация 10 mM повишиха активността на LipR. По-осезаемо положително влияние се наблюдаваше при NaCl и KCl, което би могло да е под влияние не на металните йони, а на Cl⁻ в използваните соли, както са докладвали Chen et al. (2009) за липазата от *Archaeoglobus fulgidus*. Йоните на Ca²⁺ и Mg²⁺ в концентрации от 1 и 10 mM не повлияваха каталитичната активност на LipR. Ефектът на Zn²⁺ йони беше силно инхибиращ и при двете концентрации. Както 1, така и 10 mM концентрация на Ni²⁺ оказаха отрицателен ефект върху липазната активност и доведоха до повече от 50% загуба на активност. Концентрация от 10 mM Mn²⁺, Co²⁺ и в по-малка степен Ba²⁺ също понижиха активността на ензима. Същата концентрация на Cu²⁺ почти напълно деактивира LipR, докато 1 mM концентрация не повлия ензима.

Влиянието на хелатен агент и анионен детергент беше проследено при концентрации 2, 5 и 10 mM (фиг. 21).



Фигура 21. Влияние на EDTA и SDS върху активността на LipR.

Беше наблюдавано инхибиращо влияние на 5 и 10 mM EDTA и SDS върху активността на LipR. Концентрация от 2 mM EDTA оказва активиращ ефект, което предполага, че активността на LipR не се модулира от двувалентни йони, което се вижда и от анализа за влиянието на метални йони. Стимулиращо влияние на EDTA е докладвано за липаза от *Pyrococcus furiosus* (Alquéres et al. 2011). Същото количество SDS (2 mM) не повлия активността на липазата. Беше отчетен стимулиращ ефект на етанол и метанол върху активността на LipR в концентрации 10%, 20% и 30% за първия и 20%, 30% за метанола (10% метанол не оказва влияние) (фиг. 22). Този резултат е от особено значение за кожарската промишленост, където неразтворимостта на животинските мазнини във вода определя широко използване на различни алкохоли.



Фигура 22. Влияние на етанол и метанол върху активността на LipR.

Независимо от факта, че повечето липази показват устойчивост към органични разтворители като ацетон, метанол, етанол, ацетонитрил, пропанол и диметилсулфоксид, индиректно влияние върху активността на ензима би могло да бъде възможно изменение на свойствата на емулсията, причинено от споменатите химикали.

Рекомбинантната липаза беше тествана за хидролиза на природни мазнини. Беше потвърдено разграждане на зехтин и слънчогледово олио (фиг. 23).

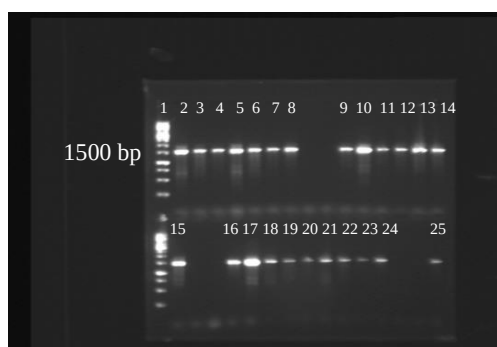


Фигура 23. Хидролиза на растителни масла - зехтин и слънчогледово олио от LipR.

8. Биотехнологичен потенциал на култивируеми термофили

8.1. Аеробни продуценти

От набогатените с различни въглехидрати култури изолирахме общо 17 аеробни екстремни термофили (таблица 3), (фиг. 25), идентифицирани въз основа на 16S рРНК ген анализ (фиг. 24) като принадлежащи към род *Geobacillus*.

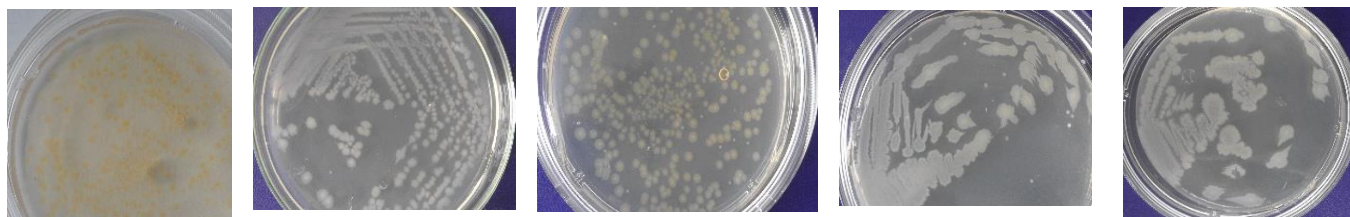


1 – Маркер 1 kb, Thermo Scientific GeneRuler
2-25 - 16S рДНК гени на изолирани термофилни щамове.

Фигура 24. Електрофоретична визуализация на 16S рДНК гени на изолираните аеробни и анаеробни термофилни бактерии.

Таблица 3. Аеробни екстремно-термофилни бактерии, изолирани от български горещи извори.

№	Източник	Най-близък филогенетичен родственик	Степен на идентичност на секвенцията на 16S гена с родственика (%)
1	Rupi II (77°C)	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> strain A4	97
2	Rupi II (77°C)	<i>Geobacillus thermoparaaffinivorans</i> strain A9	96
3	Rupi II (77°C)	<i>Geobacillus lituanicus</i> strain NST1-7	97
4	Rupi II (77°C)	<i>Geobacillus</i> sp. strain DVT13	96
5	Rupi II (77°C)	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> strain A4	97
6	Rupi II (77°C)	<i>Geobacillus</i> sp. strain DVT16	97
7	Rupi II (77°C)	<i>Geobacillus</i> sp. strain DVT13	97
8	Rupi II (77°C)	<i>Geobacillus</i> sp. strain NF3-3-1	97
9	Rupi III (75°C)	<i>Geobacillus thermoparaaffinivorans</i> strain A9	96
10	Rupi III (75°C)	<i>Geobacillus</i> sp. strain O2104	96
11	Rupi III (75°C)	<i>Geobacillus</i> sp. strain DVT13	98
12	Rupi III (75°C)	<i>Geobacillus lituanicus</i> strain NST1-7	96
13	Rupi III (75°C)	<i>Geobacillus thermoparaaffinivorans</i> strain A9	96
14	Rupi III (75°C)	<i>Geobacillus</i> sp. strain DVT13 1	97
15	Rupi III (75°C)	<i>Geobacillus thermoparaaffinivorans</i> strain MN3	96
16	Rupi III (75°C)	<i>Geobacillus kaustophilus</i> strain BGSC 90A1	97
17	Rupi I (72°C)	<i>Geobacillus</i> sp. strain DVT13	97



Фигура 25. Аеробни колонии на изолирани екстремно-термофилни щамове от род *Geobacillus*.

8.2. Анаеробни продуценти

Високата температура, корелираща с ниска разтворимост на кислорода във водата, подкрепя анаеробния метаболизъм и предполага разнообразие от анаеробни прокариоти. Бяха изолирани 5 стриктни анаеробни термофилни бактериални щама, принадлежащи към родовете *Caldicellulosiruptor*, *Thermotoga* и *Thermovorax* (таблица 4).

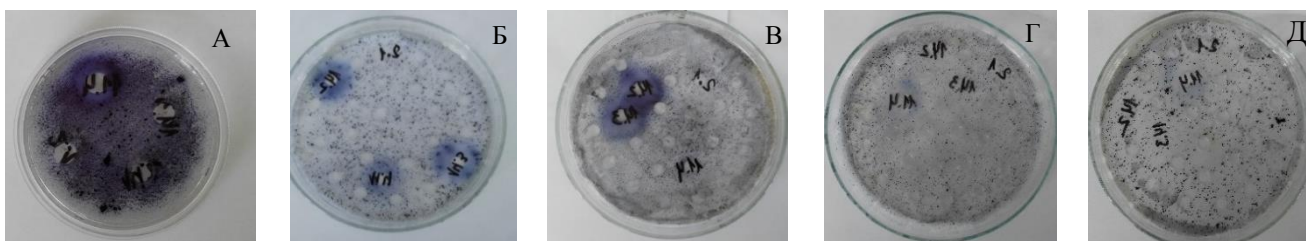
Таблица 4. Анаеробни екстремно-термофилни бактерии изолирани от български горещи извори.

№	Източник	Най-близък филогенетичен родственик	Степен на идентичност на секвенцията на 16S гена с родственика (%)
1	Levunovo (83°C)	<i>Thermotoga caldifontis</i>	98
2	Rupi III (75°C)	<i>Caldicellulosiruptor acetigenus</i>	96
3	Rupi III (75°C)	<i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i>	98
4	Rupi III (75°C)	<i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i>	99
5	Rupi III (75°C)	<i>Thermovorax subterraneus</i> 70B	98

Изолираните екстремни термофили (аеробни и анаеробни) бяха тествани за следните извън-клетъчни въглехидрат разграждащи ензими: ксиланаза, целулаза, алфа-амилаза, пулуланаза, хитиназа, арабиназа, декстраназа, пектиназа.

От изолираните 17 аеробни геобацилни щама, бяха открити 5 продуцента на амилаза и един на пулуланаза.

По отношение на продуцирани извън-клетъчни въглехидрат разграждащи ензими, анаеробите показаха по-голямо разнообразие в сравнение с аеробните геобацили. По-слабото познаване на тези микроорганизми е предпоставка за откриване на нови биокатализатори с практически потенциал. Бяха открити продуценти на галактоманаза, ксиланаза, бета-глюканаза, арабиноксиланаза, целулаза, полигалактуроназа (фиг. 26).



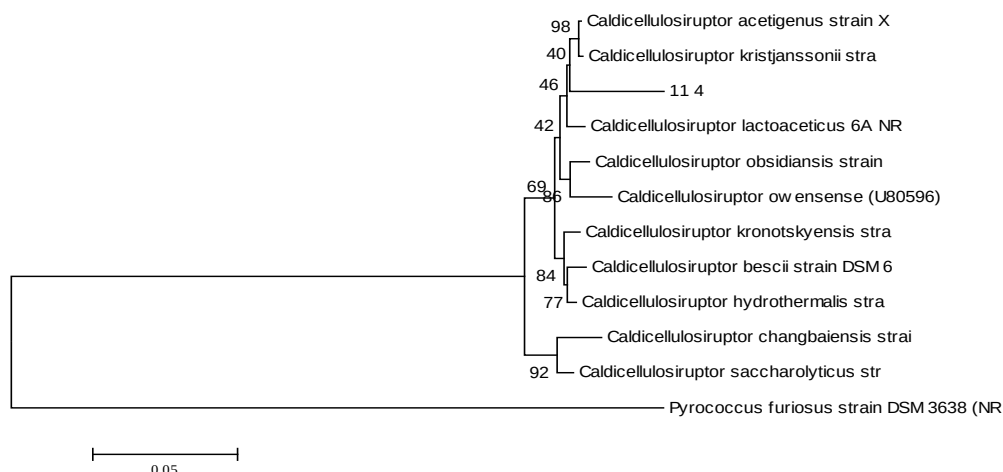
Фигура 26. Качествен скрининг с AZCL субстрати за продуциране на извън-клетъчни ензими. (А) галактоманан; (Б) арабиноксилан; (В) ксилан; (Г) целулоза; (Д) Бета-глюкан.

Сред изолираните три термофила, отнесени към род *Caldicellulosiruptor* щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4 показва най-широк ензимен спектър, с продуциране на извън-клетъчни галактоманаза, арабиноксиланаза, целулаза, бета-глюканаза, полигалактуроназа. Другите два щама от род *Caldicellulosiruptor* – 14.2 и 14.3 бяха продуценти на арабиноксиланаза, ксиланаза и полигалактуроназа. Представителите на рода са известни с това, че продуцират целулолитични и хемицелулолитични извънклетъчни ензими, както и водород, което ги поставя сред важните в промишлено отношение микробни родове (Blumer-Schuetz et al. 2010; Martinez-Porqueras et al. 2013). Лигноцелулозната биомаса е най-разпространената, възобновяема и достъпна суровина на планетата. Докладвано е, че видове от род *Caldicellulosiruptor* могат да разграждат лигноцелуозна биомаса до прости захари без предварително третиране (Basen et al. 2014), благодарение на широк кръг от екскретирани гликозил хидролази, пектинази и ксиланази (Groom et al. 2014), различно застъпени при отделните видове. От рода са описани и няколко ксиланази.

9. Характеризиране на изолат *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4

Разнообразният спектър на синтезирани ензими от щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4, както и 96% идентичността на 16S рДНК ген с най-близкия му родственик *Caldicellulosiruptor acetigenus*, даде основание за по-нататъшни изследвания и характеризирание на изолата.

Филогенетичната принадлежност на щам в рода е представена на фиг. 27.

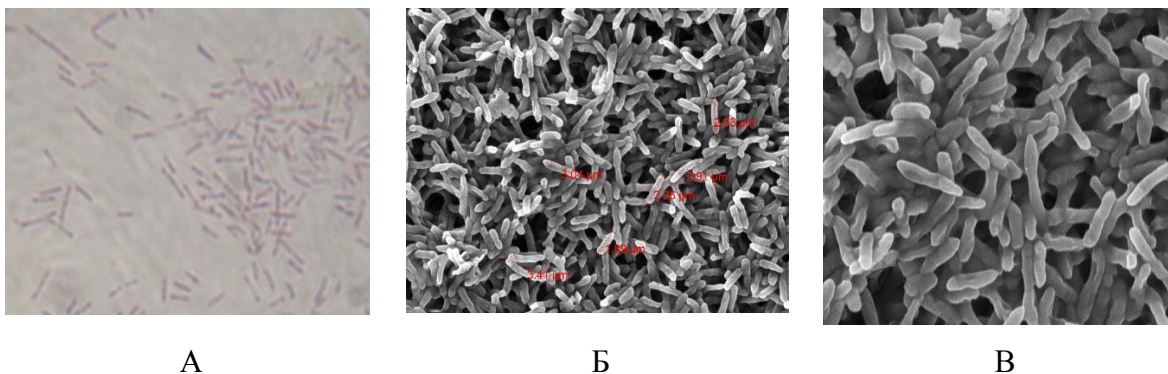


Фигура 27. Филогенетично дърво, построено с използване на секвенциите на частичен или пълен ген на 16S рДНК на видовете от род *Caldicellulosiruptor*, с корен *Pyrococcus furiosus*.

Род *Caldicellulosiruptor* принадлежат към Тип *Firmicutes*, Фамилия III *Thermoanaerobacterales*. Родът е представен до момента от 10 вида, изолирани от геотермални извори в Китай, Камчатка, САЩ/Йелоустоун, Исландия, Нова Зеландия. Представителите на рода имат сходни изисквания за растеж като температура варираща от 60° до 83°C и слабо алкална реакция (Scott et al. 2010). Родът е предложен от Rainey et al. (1994) с първи таксономично описан вид *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, изолиран от горещ извор Тауро, Нова Зеландия. Родовото име *Caldicellulosiruptor* отразява способността на бактериите да разграждат целулоза при висока температура (caldus – горещ, cellulorum – целулоза, ruptor – разграждащ).

9.1. Морфологични свойства на *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4

Клетките на щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4 са Грам-положителни с размери 1.8–3.4 x 0.4–0.6 µm. Клетките са пръчковидни, със заоблени краища, неподвижни, срещат се във вериги, по двойки или поединично, не-спорообразуващи (фиг. 28). Изолат 11.4 образува плоски колонии, с правилен ръб, 0.5 - 1.0 mm в диаметър, светло бежави на цвят.



Фигура 28. Микрографски снимки на щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4. (А) светлинно-микроскопска снимка, увеличение 1000 пъти.; (Б), (В) сканиращ електронен микроскоп, увеличение съответно 20000 и 25000 пъти.

9.2. Физиологични свойства

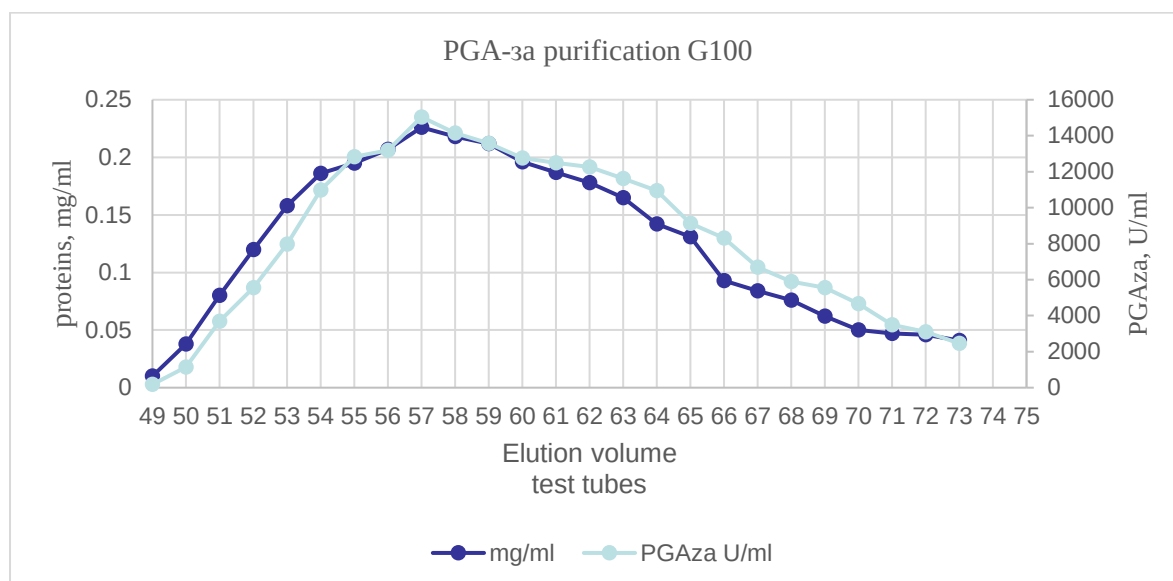
Температурата на растеж на щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4. беше определена между 50° - 83°C с оптимална температура 76°C, което го определя като екстремно термофилен, облигатен анаероб. Диапазонът на pH беше от 5.0 до 9.1 с оптимум pH 7.3. Растеше при концентрации на NaCl от 0 до 1%.

От тестваните субстрати, щам 11.4 беше способен да метаболизира и расте на дизахаридите: малтоза, захароза, целобиоза, лактоза, хексозите: глюкоза, галактоза, фруктоза, пентозата ксилоза. От високо молекулните въглехидрати можеше да расте на нишесте, полигалактуронова киселина, пектин, карбоксиметил целулоза. Щамът не показва растеж на пептон, манитол, трехалоза, декстран, рафиноза, арабиноза, Na-ацетат. Най-добър растеж на щам 11.4 се наблюдаваше на целобиоза като единствен въглероден източник, което е характерно и за другите представители на рода.

10. Полигалактуроназа от щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4. Пречистване и характеристика на ензима

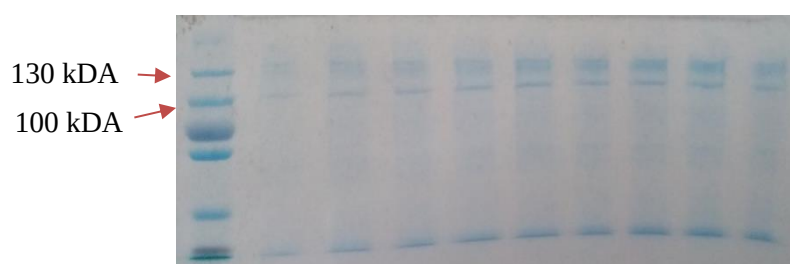
Термофилните въглехидрат разграждащи ензими са атрактивни за редица индустрии, а по-високата температура на растеж на анаеробните термофили, както и малкият брой съобщения за термофилни полигалактуронази от анаероби определи интереса ни към тази група продуценти и този тип ензими. Полигалактуроназа от изолирания стриктен анаероб *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4 беше частично пречистена (фиг. 29, 30) и характеризирана.

За пречистване на извънклетъчно синтезирания ензим култивирахме анаеробния термофил на среда №3 с 0.2% ябълков пектин и 0.1% дрождев екстракт. Култивационната и пречиствателна схема е представена в глава Материали и методи.



Фигура 29. Белтъчен профил (тъмно-синьо) и активност (светлосиньо) на извънклетъчна полигалактуроназа от *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4 с използване на сефадекс G100.

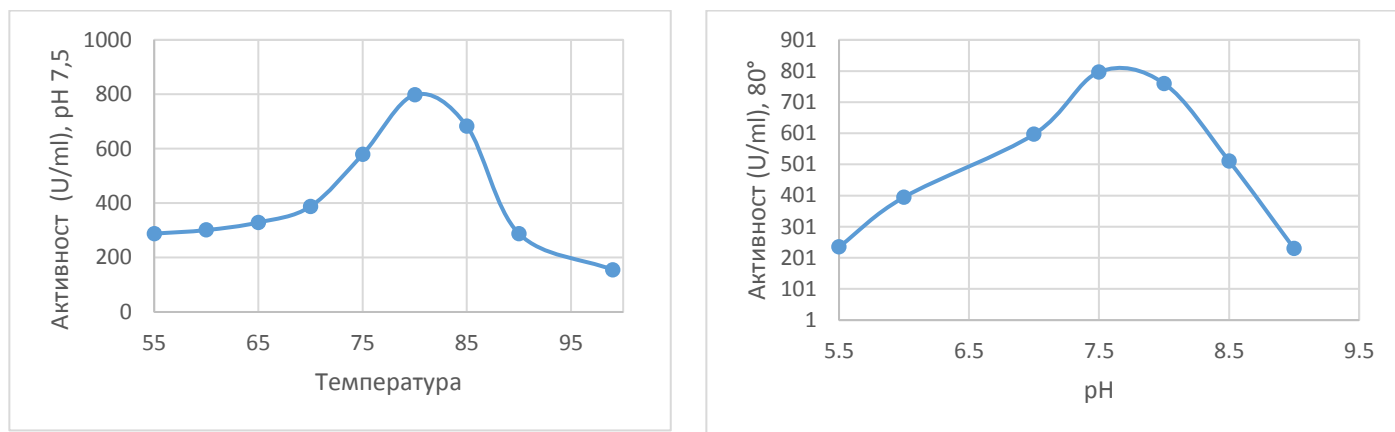
С SDS PAGE установихме, че частично пречистеният ензим е високомолекулен (100 - 130 kDa) (фиг. 57).



Фигура 30. Визуализация с SDS PAGE на частично пречистена полигалактуроназа от *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4.

Род *Caldicellulosiruptor* включват най-термофилните бактерии, способни да разграждат лигноцелуозна биомаса. Докладваните от някои от тях гликозид хидролази са с множество каталитични домейни, което обяснява високата молекулна маса на изследваната от щам 11.4 полигалактуроназа, която би могла да проявява по-широка субстратна каталитична активност или да притежава субстрат свързващ домейн.

Полигалактуроназата от щам 11.4 имаше температурен оптимум 80°C и запази над 50% активност в диапазона 70°-88°C като по този начин се нарежда сред най-термостабилните ензими от тази група. Ензимът имаше рН оптимум 7.5-7.7 и запази над 50% активност в диапазона 6.0-8.7 (фиг. 31).



Фигура 31. Влияние на температурата и рН върху ензимната активност.

Тестваните едновалентни метални йони (Na^+ , Li^+ , K^+) не повлияха чувствително ензимната активност на изследваната полигалактуроназа, както 1 така и 10 mM (табл. 5).

Таблица 5. Влияние на метални йони върху активността на полигалактуроназа от щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4.

Сол	Метални йони	Relative activity (%), 1 mM	Relative activity (%), 10 mM	Enzyme activity (U/ml), 1 mM	Enzyme activity (U/ml), 10 mM
	Контрола /1967 U/ml/	100	100		
NaCl	Na^+	94	88	1858	1737
CaCl_2	Ca^{2+}	239	88	4699	1737
NiCl_2	Ni^{2+}	61	17	1200	344
CoCl_2	Co^{2+}	81	49	1600	965
Li_2SO_4	Li^+	102	95	2011	1862
MgCl_2	Mg^{2+}	109	118	2135	2316
MnCl_2	Mn^{2+}	91	113	1793	2219
BaCl_2	Ba^{2+}	37	-	720	Няма активност
KCl	K^+	83	107	1641	2110
CuCl_2	Cu^{2+}	-	-	Няма активност	Няма активност
ZnSO_4	Zn^{2+}	-	-	Няма активност	Няма активност

Влиянието на Ni^{2+} беше инхибиращо за полигалактуроназата от щам 11.4, особено силно в концентрация от 10 mM. Беше наблюдавано инхибиращо въздействие на Co^{2+} и

Ba^{2+} . За силно инхибиращ ефект на Ba^{2+} върху активността на клонирана термостабилна пектиназа от *Thermotoga maritima* докладват Kim et al. (2014), както и за инхибиращ ефект на Mn^{2+} . Йоните на Mn^{2+} и Mg^{2+} не повлияха на ензимната активност на PGAza от щам 11.4. Присъствието на Cu^{2+} и Zn^{2+} в двете тествани концентрации напълно инактивираха изследваната полигалактуроназа. Най-силно влияние върху активността на полигалактуроназата оказаха Ca^{2+} в концентрация 1 mM, при което наблюдавахме приблизително два пъти повишаване на ензимната активност (табл. 5). Активираща роля на Ca^{2+} йони върху пектинолитични ензими е докладвано от много автори (Chiliveri et al. 2014; Horikoshi 1972).

Изводи:

1. Изследваните български горещи извори са местообитания характеризиращи се с високо разнообразие на представени таксони на различно филогенетично ниво.
2. Бактериите бяха доминиращият прокариотен компонент в изследваните термофилни съобщества (96.6% в Рупи I, 82.4% в Рупи II и 93.5% във Власа) и бяха обединени в 27 типа.
3. Физико-химичните условия на изследваните извори благоприятстват в различна степен развитието на археите, чийто дял варираше в границите 2.6% в Рупи I, 16.7% в Рупи II и 6.2% в най-горещия от изследваните извори – Власа. Идентифицирано беше присъствието на представители на основните археални типове.
4. В изследваните геотермални местообитания съществуват некултивируеми клонове и нови таксони, за които няма референтни представители в базите данни. При не асемблираните метагеноми от 22% до 49% от секвенциите бяха с неизвестни функции. Значителна част от контигите с дължина над 1 kb, представени в метагеномите на изворите, беше отнесена към некултивируеми клонове или не можеше да бъде отнесена към нито една от описаните микробни групи (62.8% от контигите над 1 kb за Рупи II, 46.3% за Рупи I и 16.4% за Власа).
5. Изследваните термофилни съобщества са развили разнообразни метаболитни стратегии, включващи специфични за тези екстремни ниши метаболитни пътища като метаногенеза, ацетогенеза, хидрогеногенеза, сулфат редукцията, редукция на сяра или желязо.
6. Проучени и доказани анаеробни екстремно термофилни продуценти на ксиланази доминираха в набогатените на ксилан термофилни култури – *Thermotogae* и *Dictyoglomus* в комбинация със сулфат-редуктор – *Thermodesulfobacterium*.
7. Биогеохимичният цикъл на азота в извор Рупи II е осъществяван както от култивируеми, така и от некултивируеми термофили, реконструирани като драфт геноми.
8. Реконструираният драфт геном на некултивируемия таумархеален АОА принадлежащ към Разред *Nitrososphaerales* показва метаболитна пластичност, изразяваща се в генетичен капацитет за усвояване на различни азот съдържащи субстрати - амониак, урея, нитрили, нитро-ароматни съединения и аминокиселини.

9. От реконструирания драфт геном на *Ca. Calescibacterium* sp. от Рупи II е клониран и успешно експресиран ген за термостабилна липаза, характеризираща се с висок температурен оптимум от 80°C и термостабилност до 30 мин. при 99°C и 3 дни при 70°C, както и устойчивост на органични разтворители, с което превъзхожда описани термофилни липази.
10. От горещ извор Рупи III е изолиран екстремно термофилен облигатно анаеробен щам, описан като *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4, който показва 96% идентичност на 16S рРНК ген с най-близкия филогенетичен съсед *C. acetigenus* и разлика в редица фенотипни свойства, предполагащи принадлежност към нов вид.
11. Синтетичният потенциал на изолираните култивируеми термофилни анаероби беше по-разнообразен от аеробните изолати. Сред анаеробите бяха изолирани продуценти на полигалактуроназа, галактоманаза, ксиланаза, бета-глюканаза, арабиноксиланаза, целулаза.
12. Частично пречистената полигалактуроназа от култивируемия анаеробен термофил *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4 показва необичайно висока термостабилност, превъзхождаща описани полигалактуронази (80°C оптимална температура, запазваща 50% активност в дапазона 70° - 88°C).

Приноси:

Научни приноси

- За първи път в България е охарактеризирано микробното разнообразие (археално и бактериално) в български горещи извори с помощта на Shotgun секвениране. Получените резултати показват присъствието на много по-голям брой филогенетични таксони в сравнение с класическия метод на клоновите библиотеки.
- За първи път е характеризирано разнообразието в набогатени анаеробни термофилни култури от български горещи извори, както и сравнителната представеност на различните таксони.
- За първи път в България е направен таксономичен и функционален анализ на не асемблирани и асемблирани метагеноми с MG Rast.
- Идентифицирани са отворените рамки на четене в метагеномите от различните извори и са определени с кой вид метаболизъм са свързани.

- Реконструирани са редица метаболитни пътища в микробните съобщества от български горещи извори и е определена ролята на различните термофилни представители.
- За първи път са изолирани анаеробни екстремни и хипер термофилни микроорганизми от български горещи извори.
- Наблюдаваните разлики от >4% в 16S rRNA генна секвенция, мастно-киселинния състав и някои използвани субстрати между изолирания от басейна на Рупи щам *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4 и най-близките филогенетични съседи предполага, че изолатът представлява нов вид от рода *Caldicellulosiruptor*.
- За първи път в България е клонирана и експресирана липаза от некултивируема термофилна анаеробна бактерия.
- Досега в световната литература не е описана липаза от драфт геном на некултивируемия тип *Candidatus Calescibacterium*.

Научно-приложни приноси

- Определеният температурен оптимум и полуживот от 30 мин при 99°C определя експресирания ензим като една от най-стабилните липази, което е от съществено значение за редица процеси в кожарството и получаването на енантио-специфични изомери.
- Високият температурен оптимум на полигалактуроназата от *Caldicellulosiruptor* sp. 11.4 (80°C) позволява прилагането и в памуко-преработвателната промишленост.

Публикации свързани с темата на дисертцията

1. Boteva N., Kambourova M. Thermophiles and their exploration for thermostable enzyme production. In: "Thermophilic and Halophilic Extremophiles in Eurasian Environments" (Birkeland N., Panosian H., Egamberdieva D., eds.). Springer Verlag
2. Nikoleta Boteva, Nils-Kåre Birkeland, Margarita Kambourova. Complete nitrogen cycle driven by the thermophilic microbial community of Rupii II hot spring. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences
3. Nikoleta Boteva, Nils-Kåre Birkeland, Margarita Kambourova. Metagenome-assembled genomes related to ammonia-oxidizing *Thaumarchaeota* recovered from near - anoxic environment. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences

Участия в научни форуми

Доклади:

1. Участие в международна конференция „Разнообразие и биотехнологичен потенциал на екстремофилите”, проведена на 26-28.09.2016 г. в София с устен доклад: Boteva N., Kambourova M., Birkeland N-K. Diversity and biotechnological potential of microbial communities in Bulgarian hot springs assessed by metagenomic analysis.
2. Участие в „Първа Национална конференция за докторанти 2016“, проведена на 01.11.2016 г. в гр. Пловдив с устен доклад: Boteva N., Kambourova M., Birkeland N-K. Diversity and biotechnological potential of microbial communities in Bulgarian hot springs assessed by metagenomic analysis.

Постери:

2. Участие в 10ти Балкански Конгрес по Микробиология МИКРОБИОЛОГИЯ БАЛКАНИКА 2017 с постер: Biodiversity of extreme and hyperthermophilic microorganisms from Bulgarian hot springs.