

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ

ՓԱՆՈՍՅԱՆ ՀՈՎԻԿ ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆԻ

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԵՎ ԼԵՌՆԱՅԻՆ ՂԱՐԱԲԱԴԻ ԵՐԿՐԱԶԵՐՄԱՅԻՆ ԱՂԲՅՈՒՐՆԵՐԻ
ՄԱՆՐԵՆԵՐԻ ԲԱԶՄԱԶԱՆՈՒԹՈՒՆԸ, ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐՆ ՈՒ ԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՆԵՐՈՒԺԸ

Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների դոկտորի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2022

SPC «ARMBIOTECHNOLOGY» NAS RA

PANOSYAN HOVIK HARUTYUN

DIVERSITY, BIOLOGICAL FEATURES AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF
MICROBES OF THE GEOTHERMAL SPRINGS IN ARMENIA
AND NAGORNO-KARABAKH

SYNOPSIS

of dissertation for conferring of scientific degree of
Doctor of Biological Science
in the specialty 03.00.07 – «Microbiology. biotechnology»

YEREVAN – 2022

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական խորհրդատուներ՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ.գ.դ.,
պրոֆեսոր Ա.Շ. Թոշունյան
կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ն.Կ. Բիրկելանդ

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հ.Գ. Հովհաննիսյան
կ.գ.դ., պրոֆեսոր Կ.Ա. Թոշունյան
կ.գ.դ., պրոֆեսոր Գ.Զ. Անտրանիկյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2022թ. հոկտեմբերի 14-ին
ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի
Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան 14, հեռ./ֆաքս՝ (+374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»
ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2022թ. սեպտեմբերի 2-ին:

018 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կ.գ.թ.՝

Գ.Ե. Ավետիսովա

The theme of dissertation has been approved at Yerevan State University.

Academic advisors: Corresponding Member of NAS RA,
Dr. of Biological Sciences, Prof. A.A. Trchounian
Dr., Prof. N.K. Birkeland

Official opponents: Dr. of Biological Sciences, Prof. H.G. Hovhannisyan
Dr. of Biological Sciences, Prof. K.A. Trchounian
Dr., Dr. h.c., Prof. G.J. Antranikian

Leading organization: Institute of Molecular Biology NAS RA

The defense of the dissertation will be held on 14th October, 2022, at 15⁰⁰ at the
session of 018 Specialized Council on Biotechnology of SCC of RA at SPC
"Armbiotechnolog" NAS RA.

Address: 0056, RA, Yerevan, 14 Gyurjyan str., tel./fax (+374 10) 65 41 80.

The dissertation is available at the library of SPC «Armbiotechnology» NAS RA.

The synopsis has been sent on 2nd September, 2022.

Scientific Secretary of 018 Specialized Council,
PhD

G.E. Avetisova

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Ատենախոսության թեմայի արդիականությունը: Բարձր ջերմաստիճանային պայմաններում գոյատևելու ունակ թերմոֆիլ և հիպերթերմոֆիլ պրոկարիոտների ֆիլոգենետիկ ուսումնասիրությունները լույս են սփռում կյանքի ծագման և կենդանի նյութի վաղ էվոլյուցիային վերաբերող հիմնախնդիրների վրա [Damer, Deamer 2020]: Արդի պատկերացմամբ թերմոֆիլ պրոկարիոտները կազմում են Կյանքի ծառի (Tree of Life) բունը: Թերմոֆիլ մանրէների բնական կենսամիջավայրերից են երկրաջերմային աղբյուրները (ներառյալ վերերկրյա և ստորջրյա հիդրոթերմերը), որոնք տեղակայված են տեկտոնապես ակտիվ սալերի սահմանագծում [Zhang et al. 2018]: Ֆիլոգենետիկական մարկերային մոլեկուլների, մասնավորապես, *n*-*N*-*Թ*-ների գեների հիման վրա ֆիլոգենետիկական վերլուծությունները, մանրէաբանության ավանդական մեթոդների համակցմամբ, թույլ են տալիս վերծանել էկոհամակարգերի թե կոլտիվացվող և թե չկոլտիվացվող մանրէային ձևերը՝ էականորեն ընդլայնելով բնական մանրէային համակեցությունների տեսակային, կառուցվածքային և նյութափոխանակային բազմազանության, ինչպես նաև տարրերի կենսատերկրաքիմիական շրջապտույտում մանրէների դերի վերաբերյալ պատկերացումները [López-López et al. 2013, DeCastro et al. 2016]: Մետագենոմային ուսումնասիրությունները փաստում են, որ երկրաջերմային աղբյուրները բնակեցված են բավականին տարատեսակ և մենահատուկ նյութափոխանակային առանձնահատկություններ ունեցող բակտերիաներով և արքեաներով [DeCastro et al. 2016, Sysoev et al. 2021]: Որպես ռեյկտային էկոհամակարգեր, դրանք նախատիպ են ծառայում նաև արտերկրային հավանական կենսացենոզների մոդելավորման համար [von Hegner 2020, Das Sarma et al. 2020]: Երկրաջերմային աղբյուրների մանրէային համակեցությունների կազմի դինամիկ հետազոտությունները արժեքավոր են նաև սեյսմիկ ակտիվությունը գնահատելու և այդ ակտիվության փոփոխությունները կանխատեսելու համար [Zhang et al. 2018]:

Թերմոֆիլ մանրէների ջերմային սթրեսին դիմակայելու հարմարվողական մեխանիզմները, ի թիվս ջերմային շոկի սպիտակուցների և ջերմակայուն ֆերմենտների սինթեզի, գենոմում ԳՑ-ի համեմատաբար բարձր պարունակության, ներառում են նաև թաղանթային լիպիդների, փ-*N*-*Թ*-ների հետտորանսկրիպցիոն ձևափոխությունների քանակական և որակական կազմի փոփոխությունները, արտաքցջային կենսապոլիմերների, օրինակ՝ էկզոպոլիսախարիդների (ԷՊՍ) արտադրությունը (Wang et al. 2015, Hori et al. 2018, Poli et al. 2018, Sang et al. 2020):

Թերմոֆիլ մանրէների հիմքով նոր կենսատեխնոլոգիաների մշակումը արդի գիտության և արտադրության հեռանկարային ուղղություն է [Zhu et al. 2020]: Զերմակայուն ֆերմենտների և կենսաակտիվ միացությունների թերմոֆիլ շտամ-արտադրիչների կիրառումը թույլ է տալիս զգալիորեն բարելավել և խթանել կենսասինթեզի և կենսակատալիզի գործընթացները, մշակել էներգախնայողական և կոնտամինացումից զերծ տեխնոլոգիական նոր ուղիներ [Antranikian 2008, Zhu et

al. 2020]: Ներկայումս մեկուսացվել և նույնականացվել են Bacteria և Archaea դոմեններին պատկանող բազմաթիվ թերմոֆիլ և հիպերթերմոֆիլ մանրէներ, որոնք կիրառվում են կենսատեխնոլոգիական արտադրություններում որպես ջերմակայուն հիդրոլազների, ԴՆԹ-պոլիմերազների և այլ ֆերմենտների ակտիվ արտադրիչներ [Rigoldi et al. 2018]: Թերմոֆիլների ԷՊՍ-ները բնութագրվում են յուրահատուկ քիմիական և ֆիզիկական հատկություններով և լայն կիրառություն են գտել սննդի, դեղամիջոցների, ներկանյութերի և շաքարման պարագաների արտադրություններում, թունազերծման և կենսավերականգնման գործընթացներում [Poli et al. 2018]:

Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի տարածքում, որտեղ դեռևս նկատելի են հրաբխատեկտոնական գործընթացների հետևանքները, հայտնաբերվել են բազմաթիվ երկրաջերմային աղբյուրներ [Мкртчян 1969, Henneberger et al. 2000], որոնց միկրոբիոտայի ուսումնասիրությունը այս աշխատանքի հիմնական նպատակն է: Այս յուրահատուկ կենսացենոզներում մանրէների կենսաբազմազանության վերծանումը, գիտության համար նոր, մենահատուկ առանձնահատկություններով օժտված շտամների/տեսակների մեկուսացումը, դրանց հարմարվողական մեխանիզմների պարզաբանումը և կենսատեխնոլոգիական ներուժի բացահայտումը գիտության արդի հիմնախնդիրներ են և հեռանկարային կարող են լինել գիտության և արտադրության միջև երկխոսության կայացման համար:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաջերմային աղբյուրներում բակտերիաների և արքեաների ֆիլոգենետիկական և նյութափոխանակային բազմազանությունը, մեկուսացնել և պոլիֆազային մոտեցմամբ նույնականացնել թերմոֆիլ մանրէների կենսատեխնոլոգիապես հեռանկարային շտամ-արտադրիչներ, պարզաբանել ջերմային սթրեսին դիմակայելու թերմոֆիլ մանրէների հարմարվողականության մոլեկուլային մեխանիզմները: Նպատակն իրագործելու համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- աճեցման և աճեցումից անկախ (մոլեկուլային) մեթոդների կիրառմամբ պարզաբանել երկրաջերմային աղբյուրների միկրոբիոտայի ֆիլոգենետիկական և նյութափոխանակային բազմազանությունը,
- բացահայտել այդ էկոհամակարգերի կայուն կապերի ձևավորման մեջ և կենսաձին տարրերի կենսաերկրաքիմիական շրջապտույտում առանձին մանրէների դերը,
- մեկուսացնել և ֆենոտիպական, գենոտիպական ու ֆիլոգենետիկական հատկանիշների հիման վրա նույնականացնել նյութափոխանակային տարբեր խմբերին պատկանող մանրէների կուլտուրաներ, այդ թվում նոր շտամներ/տեսակներ,

- ընտրել հիդրոլազային (ամիլազային, լիպազային, պրոտեազային) ֆերմենտների և էՊՍ-ների կենսատեխնոլոգիական ներուժ ունեցող հեռանկարային շտամ-արտադրիչներ,
- ուսումնասիրել մեկուսացված թերմոֆիլ բացիլների ջերմային սթրեսին հակազդելու մեխանիզմները՝ պայմանավորված թաղանթային լիպիդների, դրանցում ներգրավված ճարպաթթուների և փ-ՌՆԹ-ի նուկլեոզիդների ձևափոխությունների քանակական և որակական կազմի փոփոխություններով,
- ստեղծել թերմոֆիլ մանրէների կուլտուրաների հավաքածու:

Աշխատանքի գիտական նորոյթը: Առաջին անգամ ժամանակակից մոլեկուլային մեթոդների կիրառմամբ ուսումնասիրվել է Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի ինը երկրաջերմային աղբյուրների միկրոբիոտան, բացահայտվել են այդ էկոհամակարգերում գերակշռող բակտերիական և արքեային ֆիլումների պատկանող թերմոֆիլ մանրէների տարածման օրինաչափությունները և կենսածին տարրերի կենսատեխնոլոգիական շրջապտույտում ներգրավված առանձին մանրէների դերը: Մեկուսացվել և ֆենոտիպական ու ֆիլոգենետիկական (16S r-ՌՆԹ-ների գենների հաջորդականությունների սեքվենավորմամբ), որոշ դեպքերում նաև քեմոտաքսոնոմիական բնութագրիչների և ամբողջական գենոմների սեքվենավորման հիման վրա նույնականացվել են *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aeribacillus*, *Ureibacillus*, *Thermoactinomyces*, *Thermus*, *Methylocaldum* և *Arcobacter* ցեղերին պատկանող բակտերիաների, *Methanoculleus* ցեղին պատկանող արքեաների թերմոֆիլ և թերմոտոլերանտ 114 շտամներ:

Հայտնաբերվել է *Anoxybacillus* ցեղին պատկանող նոր տեսակ՝ անվանակոչված *Anoxybacillus karvacharensis* sp. nov. (=DSM 106524^T =KCTC 15807^T) և *Methylococcaceae* ընտանիքին պատկանող մեթանատրոֆ բակտերիայի նոր տեսակ:

Հաստատվել է, որ հետազոտված աղբյուրներում ազոտի կենսատեխնոլոգիական շրջապտույտում առանցքային նշանակություն ունեցող նիտրիտօքսիդացնող բակտերիաները ներկայացված են *Nitrospira calida* և *Nitrospira moscoviensis* տեսակներին $\geq 97\%$ նմանությամբ թերմոֆիլ մանրէներով ($T_{օպտ}$ 60°C):

Ընտրվել և ուսումնասիրվել են ջերմակայուն ամիլազների, լիպազների, պրոտեազների և էՊՍ-ների հեռանկարային շտամ-արտադրիչներ, բարելավվել են դրանց աճի և վերջնանյութի առավելագույն ելքի պայմանները: Հաջողվել է ստանալ համեմատաբար մեծ մոլեկուլային զանգվածով հետերոպոլիմերային էՊՍ-ներ՝ թերմոֆիլ *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 և *Parageobacillus toebii* ArzA-8 շտամները, որպես ածխածնի աղբյուր, ֆրուկտոզի միջավայրում աճեցնելիս:

Ցույց է տրվել, որ թերմոֆիլ բացիլներում ջերմային սթրեսին հակազդումը տեղի է ունենում թաղանթային լիպիդներում գլիկոլիպիդների պարունակության ավելացմամբ, ինչպես նաև բարձր հալման կետեր ունեցող իզո ճյուղավորված հագեցած երկարաշղթա ճարպաթթուների գերակշռմամբ:

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ *ϕ-ՌՆԹ-ի* նուկլեոզիդների ձևափոխությունների քանակական և որակյան կազմի փոփոխությունները կարևոր դեր ունեն բացիլների ֆիլոգենետիկ և թերմոֆիլիայի մեխանիզմում: Առաջ է քաշվել վարկած, համաձայն որի, այդ փոփոխությունների հիման վրա հնարավոր է տարբերակել օբյեկտ և չափավոր թերմոֆիլ բացիլները:

Աշխատանքի գործնական նշանակությունը: Մոլեկուլային հետազոտությունները և հատկապես գենոմային վերծանումները թույլ կտան մշակելու նոր սննդամիջավայրեր չկուլտիվացվող և գիտության համար նոր տեսակների լաբորատոր աճեցման համար: Իսկ արդեն ստեղծված թերմոֆիլ մանրէների կուլտուրաների հավաքածուն թույլ կտա իրականացնել կենսատեխնոլոգիական առումով արժեքավոր շտամ-արտադրիչների նպատակային ընտրություն: Հետազոտությունների արդյունքում մեկուսացված որոշ շտամ-արտադրիչներ և/կամ դրանց գեները ունեն կիրառական ներուժ մանրէաբանական ճանապարհով ամիլազների, լիպազների, պրոտեազների, *ԷՊԱ-ների* և *ԴՆԹ-պոլիմերազների* արտադրության համար:

Anoxybacillus ցեղը համարվել է *Anoxybacillus karvacharensis* նոր տեսակով: *Փ-ՌՆԹ-ների* մենահատուկ փոփոխությունների հիման վրա թերմոֆիլ բացիլները չափավոր թերմոֆիլներից տարբերակման համար առաջարկված վարկածը ծանրակշիռ ներդրում է թերմոֆիլ մանրէների ֆիլոգենետիկ վերծանման հետազոտություններում:

Ներդրվել են մանրէների համակեցությունների համալիր ուսումնասիրության նոր և ժամանակակից մոլեկուլային մեթոդներ, որոնք հիմք են հանդիսացել *ԵՊՀ* Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում մագիստրոսական կրթական մոդուլների մշակման և նոր լաբորատոր դասընթացի կազմակերպման, ինչպես նաև երեք ուսումնամեթոդական ձեռնարկների հրատարակման համար:

Պաշտպանությանը ներկայացվող հիմնական դրույթները՝

- Հետազոտված աղբյուրների մանրէային համակեցությունները Proteobacteria, Firmicutes, Nitrospirae, Deinococcus–Thermus քակտերիական և Euryarchaeota, Crenarchaeota, Thaumarchaeota արքեային ֆիլումների տարբեր նյութափոխանակային խմբերին պատկանող և կենսածին տարրերի կենսատերկրաքիմիական շրջապտույտում հանգուցային նշանակություն ունեցող նոր ու ինքնատիպ թերմոֆիլ մանրէային տեսակների մեկուսացման շտեմարաններ են:
- Քարվաճաղի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված *Anoxybacillus* sp. K1 շտամը ֆենոտիպական և ֆիլոգենետիկական բնութագրերի ու ամբողջական գենոմի սեքվենավորման հիման վրա առաջարկվում է որպես *Anoxybacillus* ցեղի նոր տեսակ *Anoxybacillus karvachariensis* sp. nov. անվանումով:
- Մեթանատրոֆ AK-K6 շտամը ֆիլոգենետիկական և ֆենոտիպական բնութագրերի հիման վրա առաջարկվում է որպես *Methylococcaceae* ընտանիքի նոր տեսակ:

- Ուսումնասիրված երկրաչերմային աղբյուրներից մեկուսացված թերմոֆիլ բացիլները ջերմակայուն հիդրոլազների և ԷՊՍ-ների, հեռանկարային արտադրիչներ են:

- Ջերմային սթրեսին թերմոֆիլ բացիլները հակազդում են թաղանթային ամինալիպիդների և գլիկոլիպիդների քանակական կազմի, ինչպես նաև ճարպաթթուների քանակական և որակական կազմի փոփոխություններով:

- Փ-Ռ-Ե-ի որոշ նուկլեոգիդային ձևափոխություններ մենահատուկ են օբլիգատ, իսկ որոշները՝ չափավոր թերմոֆիլ բացիլների համար:

Ատենախոսական աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ:

Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել է ԵՊՀ Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնի «10-3/1-9» բազային, ինչպես նաև ՀՀ ԳԿ-ի №470, 15T-1F399, 18T-1F261 ծածկագրերով պայմանագրային ֆինանսավորման ծրագրերի, ANSEF NS-microbio 2493, NS-microbio 3362, NS-microbio 4676, FEBS Short-Term Fellowship-2004 HP և Short-Term Fellowship-2009 HP, FEMS Research Fellowship-2008-2, CRDF/NFSAT TFP-12-05, CRDF/GRDF №A60920 գիտահետազոտական դրամաշնորհների, Բարձրագույն կրթության ոլորտում միջազգային համագործակցության նորվեգական կենտրոնի (SIU, DIKU, HK-dir) CPEA-2011/10081, CPEALA-2013/10107, CPEALA-2014/10068, CPEALA-2014/10111, CPEA-PD-2016/10022, CPEA-LT-2016/10095, CPEA-PD-2017/10012, CPEA-LT-2017/10061 դրամաշնորհային ծրագրերի շրջանակներում:

Աշխատանքի իրականացման վայրը: Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել է ԵՊՀ կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում, Նեապոլի (Իտալիա) Կենսամոլեկուլային քիմիայի ինստիտուտում, Բերգենի (Նորվեգիա) համալսարանի կենսաբանության ամբիոնում, Նևադայի (Լաս Վեգաս, ԱՄՆ) պետական համալսարանի Բնագիտության դպրոցում, Մյունխենի (Գերմանիա) Լյուդվիգ Մաքսիմիլիանի անվան համալսարանի Ինտեգրացված սպիտակուցների հետազոտության կենտրոնում:

Ատենախոսական աշխատանքի ապրոբացիան: Հետազոտության արդյունքները զեկուցվել են ԵՊՀ Կենսաբանության ֆակուլտետի գիտական խորհրդի նիստում, ԵՊՀ Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնի, Նեապոլի Կենսամոլեկուլային քիմիայի ինստիտուտի, Բերգենի համալսարանի Կենսաբանության ամբիոնի, Նևադայի պետական համալսարանի Բնագիտության դպրոցի, Մյունխենի Լյուդվիգ Մաքսիմիլիանի անվան համալսարանի Ինտեգրացված սպիտակուցների հետազոտության կենտրոնի սեմինարներում, «Կենսատեխնոլոգիայի արդի իրավաճակը և զարգացման հեռանկարները» 3-րդ միջազգային կոնգրեսում (Մոսկվա, Ռուսաստան, 2005), Էքստրեմոֆիլների 6-րդ (Բրեստ, Ֆրանսիա, 2006), 8-րդ (Պոնտա Դելգատա, Պորտուգալիա, 2010), 10-րդ (Սանկտ-Պետերբուրգ, Ռուսաստան, 2014) և 12-րդ (Իսկիա, Իտալիա, 2018) միջազգային կոնգրեսներում, FEBS 32-րդ (Վիեննա, Ավստրիա, 2007) և 39-րդ (Փարիզ, Ֆրանսիա, 2014) կոնգրեսներում, IUMS 12-րդ միջազգային կոնգրեսում (Ստամբուլ, Թուրքիա, 2008), ISSM 7-րդ միջազգային սիմպոզիումում (Շիզուոկա,

Ճապոնիա, 2008), FEMS 3-րդ (Գոթենբերգ, Շվեդիա, 2009), 6-րդ (Մաստրիխտ, Նիդերլանդներ, 2015) և 7-րդ (Վալենսիա, Իսպանիա, 2017) կոնգրեսներում, Թերմոֆիլների 12-րդ (Ռեգենսբուրգ, Գերմանիա, 2013) և 13-րդ (Սանտիագո, Չիլի, 2015) միջազգային գիտաժողովներում, ISME 15-րդ (Սեուլ, Հարավային Կորեա, 2014), 16-րդ (Մոնրեալ, Կանադա, 2016) և 17-րդ (Լեյպցիգ, Գերմանիա, 2018) միջազգային սիմպոզիումներում, «Էքստրեմոֆիլների կենսաբազմազանությունը և կենսատեխնոլոգիական ներուժը», միջազգային գիտաժողովում (Սոֆիա, Բուլղարիա, 2016), «Եվրասիայի թերմոֆիլ և հալոֆիլ էքստրեմոֆիլները» միջազգային սիմպոզիումում (Հոանչժոու, Չինաստան, 2016), մանրէների կենսատեխնոլոգիայի միջազգային Միկրոկոն 2017 կոնֆերանսում (Չանդիգարի, Հնդկաստան, 2017), Կենսատեխնոլոգիայի և կենսաինժեներիայի միջազգային կոնգրեսում (Դուբայ, ԱԵ, 2017), «Մանրէները և դրանց վիրուսները, էկոլոգիա, բազմազանություն և կիրառություն» միջազգային գիտաժողովում (Թբիլիսի, Վրաստան, 2019) և բազմաթիվ այլ միջազգային գիտաժողովներում ու ամառային դպրոցներում:

Հրատարակված աշխատությունները: Ատենախոսության հիմնադրույթներն ու արդյունքներն ամփոփված են 94 գիտական աշխատություններում՝ 33 հոդվածներում, որոնցից 10-ը՝ առանց համահեղինակների, 5 գրքի գլուխներում և միջազգային գիտաժողովների 56 թեզիսներում:

Աշխատանքի կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսական աշխատանքը շարադրված է համակարգչային շարվածքով՝ 288 էջի վրա, ներառում է 61 նկար ու 35 աղյուսակ: Ատենախոսությունը կազմված է հետևյալ բաժիններից՝ «Բովանդակություն», «Հապավումների, միավորների և տերմինների ցանկ», «Ներածություն», «Գրականության ակնարկ», «Փորձարարական մաս», որը ներառում է «Հետազոտության օբյեկտներ, նյութեր և մեթոդներ», «Արդյունքներ և քննարկում», «Ամփոփում», «Գիտագործնական երաշխավորություններ կամ առաջարկներ», «Եզրակացություններ», «Օգտագործված գրականության ցանկ» բաժինները և 4 հավելվածներ:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գլուխ 1-ում ներկայացված է երկրաջերմային աղբյուրներում թերմոֆիլ մանրէների տարածվածությունը, նյութափոխանակային և ֆիլոգենետիկական բազմազանությունը, էկոլոգիական դերը և դրանց կենսատեխնոլոգիական ներուժը: Նկարագրված է թերմոֆիլ մանրէների էՊՍ-ները, դրանց կենսասինթեզի առանձնահատկությունները, քիմիական և ֆիզիկական հատկություններն ու կիրառական հեռանկարները:

Բերված են թերմոֆիլ մանրէների հարմարվողականության մոլեկուլային մեխանիզմների վերաբերյալ ժամանակակից պատկերացումները: Վերլուծաբար ներկայացված են լիպիդների և դրանցում ներգրավված ճարպաթթուների, ինչպես նաև փ-ՌՆԹ-ների ձևափոխությունների քանակական և որակական կազմի փոփոխությունների դերը թերմոֆիլիայի մեխանիզմում:

ՉԼՈՒԽ 2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՕՐՅԵԿՍՆԵՐ, ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Հետազոտության օբյեկտները: Հետազոտության օբյեկտներ են ծառայել Հայաստանի (Ախուրիկ, Բջին, Տաթև, Ույծ, Հանքավան, Արզական, Զերմուկ) և Լեռնային Ղարաբաղի (Ջուառ և Քարվաճառ) երկրաջերմային աղբյուրների ջրային ու նստվածքային նմուշները և այդ նմուշներից մեկուսացված *Bacillus*, *Geobacillus*, *Parageobacillus*, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus Aeribacillus* և *Ureibacillus*, ցեղերին պատկանող թերմոֆիլ բացիլների 109, *Thermoactinomyces* և *Methylocaldum* ցեղին պատկանող երկուական, *Arcobacter*, *Thermus* և *Methanoculleus* ցեղերին պատկանող մեկական շտամներ, ինչպես նաև մեթանագեն արքեաների և նիտրիտօքսիդացնող բակտերիաների կուտակիչ կուլտուրաները:

Կուտակիչ և մաքուր կուլտուրաների ստացումը և ուսումնասիրումը: Թերմոֆիլ բացիլների, թերմոակտինոմիցետների, թերմոանների, նիտրիտօքսիդացնող և մեթանօքսիդացնող, հետերոտրոֆ և քեմոլիթոտրոֆ անաերոբ բակտերիաների, մեթանագեն արքեաների կուտակիչ և մաքուր կուլտուրաների ստացման համար կիրառվել են այդ նյութափոխանակային խմբերի մանրէների համապատասխան սննդամիջավայրեր և աճեցման պայմաններ [Smibert, Krieg 1981, Williams et al. 1983, Ehrlich et al. 1995, Tindall et al. 2007, Dahle et al. 2008]: Բջիջների ձևաբանական առանձնահատկությունները որոշվել են ֆազակոնտրաստային (Nikon, Eclipse E400), ինչպես նաև սքանավորող (ՍԷՄ, Jeol JSM-7400F) և տրանսմիսոն (ՏԷՄ, Jeol JEM-1230) էլեկտրոնային մանրադիտակմամբ: Մանրէների ֆիզիոլոգիական հատկանիշներից ուսումնասիրվել է աճի ջերմաստիճանային, NaCl-ի և pH տիրույթները, անաերոբ պայմաններում աճելու ունակությունը [Smibert, Krieg 1981]: Մանրէների կենսաքիմիական հատկանիշներից ուսումնասիրվել են ածխածնի տարբեր աղբյուրներ յուրացնելու ունակությունը, հիդրոլիզային (ամիլազ, լիպազ, պրոտեազ), կատալազային, օքսիդազային, թիրոզինազային, β-գալակտոզիդազային, արգինինդեհիդրոլազային, լիզինդեկարբօքսիլազային, օրնիտինդեկարբօքսիլազային, ուրեազային և տրիպտոֆան դեամինազային ակտիվությունները, հիպոքսանտինի քայքայումը և կաթի պեպտոնացումը, VP ռեակցիան, ցիտրատի և պրոպիոնատի յուրացումը, նիտրատը վերականգնելու ունակությունը, H₂S-ի և ինդոլի առաջացումը՝ ըստ համընդհանուր ընդունված մեթոդների [Smibert, Krieg 1981, Williams et al. 1983, Tindall et al. 2007, Sahay et al. 2017, Yadav et al. 2018], ինչպես նաև API 20 E և API 50 CHB (bioMerieux) թեստերիզների առևտրային հավաքածուների կիրառմամբ: Լուծելի մեթանոնօքսիդենազային ակտիվությունը որոշվել է համաձայն Գրահամի և գործընկերների առաջարկած մեթոդի [Graham et al. 1992]: NO₂⁻ և NO₃⁻ կոնցենտրացիաները, ինչպես նաև ClO₃⁻-ի արգելակիչ ազդեցությունը NO₂⁻-ի օքսիդացման վրա որոշվել են կոլորիմետրիկ եղանակով (Spectronic 20D սպեկտրացույց Milton Roy): Մեթանը քանակապես չափվել է այրման իոնիզացնող դետեկտորային կցորդով գազային քրոմատոգրաֆիական (GC-2014 Shimadzu) վերլուծությամբ: Տվյալների վիճակագրական վերլուծությունները իրականացվել են

Կրուսկալ-Ուալիսի (Kruskal–Wallis) H, Բոնֆերոնիի ուղղումով Ման-Վիթնեի (Mann–Whitney) U և Սթյուդենտի (Student) t-թեստերի կիրառմամբ:

Մանրէների և մանրէային համակեցությունների ֆիլոգենետիկական վերլուծությունները: Երկրաջերմային աղբյուրների մանրէային համակեցությունների կազմը վերծանվել է բնափոխիչ գրադիենտային ժել-էլեկտրաֆորեզով (ԲԳԺԷ), կլոնային գենադարանների կառուցմամբ, պիրոսեքվենավորմամբ և նոր սերնդի ILUMINA սեքվենավորմամբ: Նմուշներից և մանրէային կուլտուրաններից ԴՆԹ-ն լուծամզվել է ֆերմենտային [Marmur 1961] և նատրիումի դոդեցիլսուլֆատով քայքայման եղանակներով [Dempster et al. 1999], FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, OH) առևտրային հավաքածուների կիրառմամբ: Լուծամզված ԴՆԹ-ի որակական և քանակական վերլուծությունը կատարվել է ժել-էլեկտրաֆորեզային և սպեկտրացուցական NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) մեթոդներով: Լուծամզված ԴՆԹ օգտագործվել է որպես կաղապար ինչպես 16S r-ԴՆԹ-ի գեների (ամբողջական և առանձին հատվածների), այնպես էլ տարբեր գործառնության գեների ՊՇՌ- ամպլիֆիկացման համար: ԴՆԹ ամպլիկոնները սեքվենավորվել են ABI PRISM մազանոթային սեքվենատորի կիրառմամբ: Պիրոսեքվենավորումը իրականացվել է ամպլիկոնների 515F ծայրից GS FLX (454 Life Sciences, USA) սեքվենատորով:

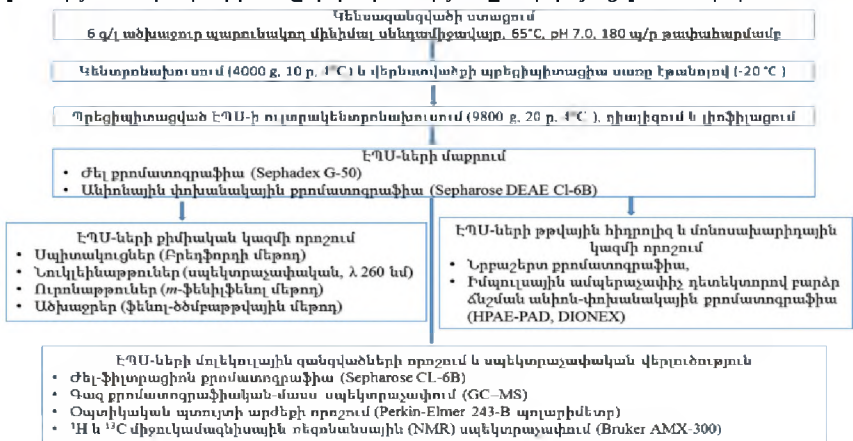
Քիմերային հաջորդականությունները որոշվել են DECIPHER առցանց հասանելի ծրագրային փաթեթի (<http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimeras.html>) և Mallard version 1.02 package (<http://www.bioinformatics-toolkit.org/index.html>) կիրառմամբ: Ոչ քիմերային հաջորդականությունները ($\geq 98\%$ նմանությամբ) խմբավորվել են օպերացիոն տաքսոնոմիական միավորներում (OSU): Պիրոթագերը մշակվել են mothur v 1.28 ալգորիթմով [Schloss et al. 2009], իսկ հաջորդականությունները՝ Needleman–Wunsch ալգորիթմով [Pruesse et al. 2007]: 16S r-ԴՆԹ գեների հաջորդականությունների ամենամոտ համընկումները գենային բանկի տվյալների հետ որոշվել են BLAST վերլուծությամբ (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>):

Մետագենոմային հետազոտությունը իրականացվել է Գերմանական GATC Biotech սեքվենավորման կենտրոնում Genome Sequencer Illumina HiSeq տեխնոլոգիայով՝ Կրակենի ալգորիթմի կիրառմամբ [Wood, Salzberg, 2014]:

Ամբողջական գենոմի սեքվենավորումը կատարվել է ըստ Illumina paired-end և PacBio RS տեխնոլոգիայով գերմանական GATC Biotech սեքվենավորման կենտրոնում, իսկ արդյունքները վերլուծվել են CLC Genome Workbench և Celera Assembler ծրագրային փաթեթներով: Խմբագրումը իրականացվել է RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) ծրագրային փաթեթով և պրոկարիոտների գենոմի խմբագրման NCBI առցանց հասանելի գործիքներով:

Գենոմները վերլուծվել են ըստ նուկլեոտիդների միջին նմանության (ANI) (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>) և ԴՆԹ-ԴՆԹ հիբրիդացման: Գենոմների հիման վրա ֆիլոգենետիկական վերլուծությունները իրականացվել են TYGS սերվերի միջոցով [Meier-Kolthoff, Goker 2009]: Ֆիլոգենետիկական ծառերի կառուցման համար կիրառվել է MEGA X առցանց հասանելի փաթեթը [Tamura et al.

2004; Kumar et al. 2018]: Ֆիլոգենետիկական վերլուծությունները կատարվել են Philip փաթեթով [Felsenstein 1989]՝ հեռավորության (NJ), առավելագույն հավանականության (ML) և առավելագույն խնայողության (MP) ալգորիթմներով: **ԷՊՍ-ների անջատման ու քիմիական վերլուծությունը:** ԷՊՍ-ների անջատման և վերլուծության մեթոդների հաջորդականությունը ներկայացված է նկար 1-ում:



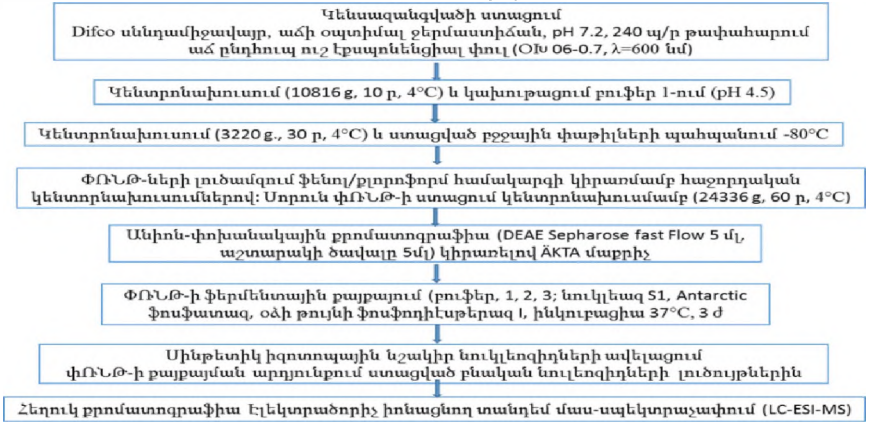
Նկար 1. ԷՊՍ-ների անջատման և վերլուծության մեթոդների հաջորդականությունը նկարագրող գծապատկեր:

Լիպիդների և ճարպաթթուների որակական և քանակական կազմի ուսումնասիրությունը: Թերմոֆիլ բացիլները ինկուբացվել են Difco սննդամիջավայրում (pH 7.2) և ինկուբացվել աճի 45, 55, 60, 65 և 70°C ջերմաստիճանային պայմաններում (240 պ/ր թափահարման պայմաններում) մինչև աճի ուշ էքսպոնենցիալ փուլ: Ինկուբացիայից հետո բջիջները առանձնացվել են կենտրոնախուսմամբ (10000 պ/ր, 15 ր) և լիոֆիլացվել: Ընդհանուր լիպիդները լուծամզվել են Բլիխի և Դաերի մեթոդով [Bligh, Dyer 1954]: Ֆոսֆոլիպիդները հայտնաբերվել են մոլիբդենային կապույտով, գլիկոլիպիդները՝ 3.4% N-(1-նաֆթիլ)-էթիլենդիամին պարունակող CH₃OH /H₂SO₄ (97:3) խառնուրդով, ամինալիպիդները՝ նինհիդրինով [Dittmer, Lester 1964, Kundu 1981, Kates 2010]:

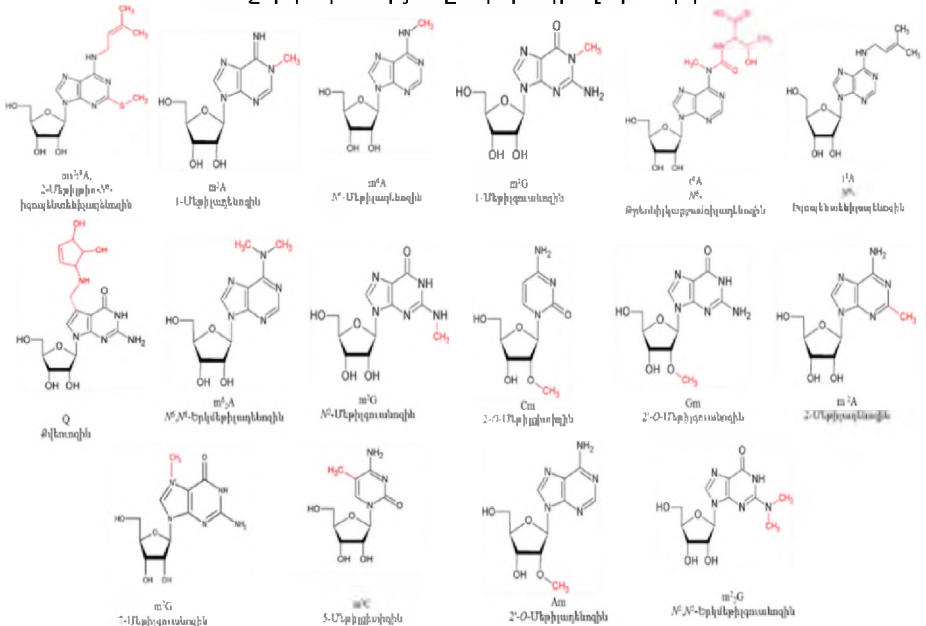
Ճարպաթթուների մեթիլէսթերները ստացվել են կոմպլեքսային լիպիդներից CH₃OH/HCl (9:1) հարաբերությամբ խառնուրդով 80°C ջերմաստիճանային պայմաններում թթվային մեթանալիզի միջոցով: Ճարպաթթուների կազմը որոշվել է գազահեղուկային քրոմատոգրաֆիական (GLC, Carlo Erba HRGC 5300 Instrument, FID) և մաս-սպեկտրացուցական (GC-MS HP5890 II TRIO 2000 VG) վերլուծությամբ:

Փ-Ռ-ՆԹ-ների ձևափոխված նուկլեոզիդների որակական և քանակական կազմի ուսումնասիրության մեթոդներ: Փ-Ռ-ՆԹ-ների անջատման և վերլուծության մեթոդների հաջորդականությունը ներկայացված է նկար 2-ում: Հետազոտությունում կիրառվել են 16 բնական և իզոտոպային նշակիր (դեյտերիում, ¹³C և ¹⁵N) փ-Ռ-ՆԹ-

ների հետևյալ ձևափոխված նուկլեոզիդները՝ $ms^{216}A$, m^6A , m^1G , t^6A , i^6A , m^2A , m^2G , m^2_2G , Am , Q , Gm , m^1A , Cm , m^5C , m^7G և $m^6_2^a$ (նկար 3):



Նկար 2. Փ-ՈՒՆԹ-ների անջատման և վերլուծության մեթոդների հաջորդականությունը նկարագրող պատկեր:



Նկար 3. Զուգահեռ քանակական ուսումնասիրությունների համար սինթեզված բնական և նշակիր ձևափոխված նուկլեոզիդները:

Փ-ՈՒՆԹ-ի մոլեկուլում $ms^{216}A$, m^6A , m^1G , t^6A , i^6A , m^1A ձևափոխված նուկլեոզիդներ ստեղծված են 37-րդ դիրքում; m^2G 9-րդ դիրքում; m^2_2G 24-րդ և 25-րդ դիրքերում; Am 4-րդ դիրքում; Q և Gm ՝ փոփոխական (wobble) դիրքում են, իսկ Gm ՝ նաև 18-րդ դիրքում; m^1A 14 և 58 (հիմնականում) դիրքերում; Cm ՝ 32-րդ դիրքում; m^5C ՝ 38րդ դիրքում; m^7G ՝ 46րդ դիրքում; $m^6_2^a$ ՝ 37 -րդ դիրքում [Brandmayr et al. 2012, Duechler et al. 2016]:

Նշակիր և ոչ նշակիր նուկլեոզիդների տիրույթները LC-MS չափումներում որոշվել է *Qualbrowser* (Xcalibur) ալգորիթմով: Յուրաքանչյուր նուկլեոզիդի քանակությունը հաշվարկվել է տրամաչափման կորի ստացված տիրույթների հարաբերությամբ և գծային համընկումների հավասարումներով: Փ-ՌՆԹ-ների ձևափոխությունները քանակապես արտահայտվել են ըստ ձևափոխությունների քանակների (մոլ) և A նուկլեոզիդների քանակների (մոլ) հարաբերությամբ 1000 փ-ՌՆԹ-ների կտրվածքով:

Փ-ՌՆԹ ձևափոխությունների քանակական տվյալների հիման վրա տեսակների կլաստերացումը իրականացվել է *Perseus* ծրագրով (տարբերակ 1.6.14.0) [Tyanova et al. 2016]:

ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ
ԳԼՈՒԽ 3. ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԵՎ ԼԵՌՆԱՅԻՆ ՂԱՐԱԲԱԴԻ ԵՐԿՐԱՋԵՐՄԱՅԻՆ
ԱՐՔՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԻԿՐՈԲԻՈՏԱՅԻ ՄԵՏԱԳԵՆՈՄԱՅԻՆ
ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

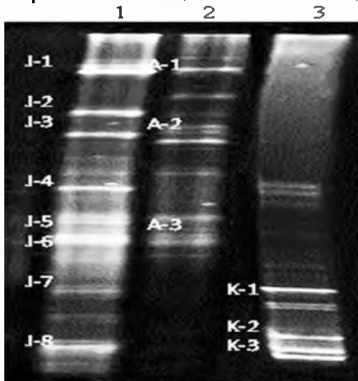
Ուսումնասիրված բոլոր երկրաջերմային աղբյուրները տեղակայված են ծովի մակարդակից 960-2090մ բարձրությունների վրա: Ամենացածր ջերմաստիճանը որոշվել է Ույծի երկրաջերմային աղբյուրում (25.8°C), իսկ համեմատաբար բարձր ջերմաստիճանով բնութագրվել են Ջերմուկի (>53°C) և Քարվաճառի (70°C) երկրաջերմային աղբյուրները: Հետազոտված երկրաջերմային աղբյուրների մեծամասնության ջրի pH-ի աժեքը 7–7.5 սահմաններում է, սակայն Տաթևի, Ախուրիկի և Ույծի ջրերի pH-ի արժեքը թույլ թթվային է՝ 6.0-6.5 տիրույթում: Էլեկտրահաղորդականության ամենաբարձր արժեքը՝ 6722.9 մկՍմ/սմ հայտնաբերվել է Հանքավանի երկրաջերմային աղբյուրում: Ընդհանուր լուծելի աղերի պարունակությունը միջինում կազմել է 0.5 գ/լ: Դիտվել է հետևյալ օրինաչափությունը. որքան բարձր է ջրի ջերմաստիճանը, այնքան այն հանքայնացված է և դրանում բարձր է $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) / (\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ կատիոնների հարաբերությունը և $(\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-)$ կամ $(\text{SO}_4^{2-} / \text{HCO}_3^-)$ անիոնների հարաբերությունը [Մկրտչյան 1969, Henneberger et al. 2000]: Ուսումնասիրված աղբյուրների ջրերում նկատելի են նաև ծծմբաջրածնային (H_2S) և չորոշված բաղադրությամբ այլ գազային աղաջակներ:

Բնական նմուշներից մեկուսացված հանրագումարային ԴՆԹ-ի ՊՇՌ-ԲԳԷԺ վերլուծությամբ ուսումնասիրվել է Արզականի, Ջերմուկի և Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրների բակտերիաների բազմազանությունը: ԲԳԺԷ էլեկտրաֆորեզից համապատասխան բծերի էլյուցիայից և վերաամպլիֆիկացումից, ապա ստացված ամպլիկոնային հաջորդականությունների սեքվենավորումից հետո, տվյալները համեմատվել են Գենային բանկում նմանատիպ հաջորդականությունների հետ (նկար 4, աղյուսակ 1):

ԲԳԺԷ պրոֆիլներից ստացված սեքվենավորված հաջորդականությունների մեծամասնությունը համընկել են մանրէների չկուլտիվացվող ձևերի հետ, իսկ Գենային բանկում առկա հաջորդականությունների հետ BLASTn վերլուծությամբ

դրանց 97%-ից պակաս նմանությունը վկայում է ուսումնասիրված աղբյուրների մանրէային նոր տեսակներով բնակեցված լինելու մասին: Այդ ֆիլոտիպերի ամենամոտ համընկնող տեսակների աճի ջերմաստիճանային օպտիմումները փաստում են, որ ԲԳԺԷ պրոֆիլում հայտնաբերված մանրէները ևս ունակ են գոյատևելու հետազոտված աղբյուրների ջերմաստիճանային պայմաններում՝ հաստատելով այն փաստը, որ ստացված հաջորդականությունները կոնտամինացիայի հետևանք չեն:

Ամենամեծ թվով ԲԳԺԷ բժեր ստացվել են Ջերմուկի երկրաջերմային աղբյուրից: Ջերմուկի երկաջերմային աղբյուրից ստացված ութ բակտերիական հաջորդականությունները պատկանել են հետևյալ բակտերիական ֆիլումներին՝ Epsilonproteobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Ignavibacteriae և Firmicutes:



Նկար 4. ՊՇՈ-ԲԳԺԷ էլեկտրաֆորեզիրը

(1- Ջերմուկ, 2-Արզական, 3-Քարվաճառ):

Արզականի և Ջերմուկի երկրաջերմային աղբյուրների նմուշներից անջատված հանրագումարային ԴՆԹ-ի 16S r-ՌՆԹ գեների ՊՇՈ ամպլիֆիկացմամբ կառուցվել են բակտերիական և արքեային կլոնային գենադարաններ:

Արզականի երկրաջերմային աղբյուրից ընդհանուր առմամբ ստացվել են բակտերիական 30 կլոններ, որոնցից յոթը եղել են քիմերիկ կառույցներ և բացառվել են հետագա ուսումնասիրություններում: Մնացած 23 կլոնների սեքվենավորմամբ պարզվել է, որ դրանց ֆիլոտիպերը պատկանել են Proteobacteria (12 կլոններ), Cyanobacteria (8 կլոններ), Firmicutes (2 կլոններ), և Bacteroidetes (1 կլոն) ֆիլումների ներկայացուցիչներին:

Արզականի և Ջերմուկի երկրաջերմային աղբյուրների նմուշներից մեկուսացված համընդհանուր ԴՆԹ-ի հիմքով կառուցված արքեային 16S r-ՌՆԹ գեների կլոնային գենադարանների վերլուծությունը բացահայտել է այդ երկու աղբյուրներում արքեային համակեցության ոչ մեծ բազմազանություն (աղյուսակ 2):

Չնայած որոշ արքեային ֆիլոտիպեր նոր են, այնուամենայնիվ, համեմատաբար մեծ տոկոս են կազմում արքեային հաջորդականությունները, որոնք համընկել են

Արզականի երկրաջերմային աղբյուրից ստացված հաջորդականությունները ամենամոտ նմանություն են ցուցաբերել Proteobacteria (ներառյալ Beta-, Epsilon- և Gammaproteobacteria) ֆիլումի ներկայացուցիչների հետ: Firmicutes ֆիլումին պատկանող բակտերիաները գերակշռող են եղել Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրի համակեցությունում:

արդեն հայտնի արքեային ցեղերին (68% Արզականի և 45% Զերմուկի դեպքում): Ուսումնասիրված երկու աղբյուրներում էլ հայտնաբերվել են մեթանագեն, ամոնիակ օքսիդացնող (AOA) և դեռևս չկոտիվացվող արքեաների ֆիլոգենետիկական խմբեր:

Աղյուսակ 1.

ԲԳԺԷ էլեկտրաֆորեզից էլյուցված բծերի հաջորդականությունների BLASTn վերլուծության արդյունքները

ԲԳԺԷ բծեր	Համընկնող ամենամոտ ֆիլոտիպը /Ավանդադրման համարը/	Ամենամոտ համընկնող կոտիվացվող տեսակը /Ավանդադրման համարը/	Նմանություն, % ֆիլոտիպ /տեսակ	Ֆիլոգենետիկական պատկանելությունը
J-1	Չկոտիվացվող կլոն 3-2 /GQ324229/	<i>Arcobacter pacificus</i> /NR148627/	96/100	Epsilonproteobacteria
J-2	Չկոտիվացվող կլոն 3-2 /GQ324229/	<i>Arcobacter</i> sp. /J42994/	95/98	Epsilonproteobacteria
J-3	Չկոտիվացվող <i>Exilispira</i> sp. կլոն /KT757670/	<i>Exilispira thermophila</i> /NR041644/	98/90	Spirochaetes
J-4	Չկոտիվացվող կլոն 88_C6 /K1985576/	<i>Melioribacter roseus</i> /NR074796/	100/98	Ignavibacteriae
J-5	Չկոտիվացվող <i>Wolinella</i> sp. կլոն /GQ324220/	<i>Wolinella succinogenes</i> /KM462073/	95/94	Epsilonproteobacteria
J-6	Չկոտիվացվող կլոն 1-16S-5C /JQ172713/	<i>Sulfurospirillum alkalitolerans</i> /NR108632/	93/93	Epsilonproteobacteria
J-7	Չկոտիվացվող կլոն PS1B_0085 /KU830682/	<i>Fastidiosipila sanguinis</i> /KJ419955/	95/91	Firmicutes
J-8	Չկոտիվացվող կլոն 3-12 /GQ324232/	<i>Acetobacteroides hydrogenigenes</i> /NR133950/	97/97	Bacteroidetes
A-1	Չկոտիվացվող ԲԳԺԷ բիծ EA-5 /FJ406515/	<i>Rhodoferax</i> sp. /KU569902/	95/98	Betaproteobacteria
A-2	Չկոտիվացվող կլոն 3-2 /GQ324229/	<i>Sulfurimonas</i> sp. /AB930173/	98/100	Epsilonproteobacteria
A-3	Չկոտիվացվող կլոն 10-2 /LN875311/	<i>Pseudomonas</i> sp. /KC906191/	98/96	Gammaproteobacteria
K-1	Չկոտիվացվող կլոն B_OTU_1064 /KX031046/	<i>Flexibacter</i> sp. /EU273858/	100/94	Bacteroidetes
K-2	<i>Geobacillus</i> sp. N7 /KU291217/	<i>Geobacillus</i> sp. /KU291217/	100	Firmicutes
K-3	<i>Geobacillus kaustophilus</i> /KY883609/	<i>Geobacillus kaustophilus</i> /KY883609/	100	Firmicutes

Երկու աղբյուրներում էլ հայտնաբերվել են *Methanomicrobiales* կարգին պատկանող *Methanospirillum hungatei* տեսակին մոտ ազգակցական ֆիլոտիպեր, իսկ Արզականի երկրաջերմային աղբյուրի նմուշներից ստացված երկու ֆիլոտիպեր պատկանել են *Methanoregula* ցեղին:

Այս երկու ցեղերի ներկայացուցիչները մեթանառաջացման գործընթացում ունակ են յուրացնելու H₂/CO₂ և ֆորմիատը որպես սուբստրատներ: Երկու աղբյուրներում էլ հանդիպող հաջորդ տարածված ներկայացուցիչները Euryarchaeota ֆիլումին պատկանող և միևնույն կարգում խմբավորված արքեաներն են:

Հետազոտված երկու աղբյուրներում էլ հայտնաբերվել են ամոնիակ օքսիդացնող արքեաներ, որոնք մոտ ազգակից են դեռևս չկոտիվացվող “Candidatus Nitrososphaera gargensis”-ին: Հաջորդ, դեռևս չկոտիվացված ֆիլոգենետիկական

խումբը, որը հայտնաբերվել է Արզականի երկրաջերմային աղբյուրում խորջրյա հիդրոթերմալին աղբյուրների կրենարքեային խումբ 1-ն է՝ DHVC:

Աղյուսակ 2.

16S *n-n*-ԼԹ գեների հիման վրա ստացված արքեային կլոնային գենադարանի OSU-ները

OSU հաջորդակ նույնություններ	Կուլտիվացվող մանրէ, որի 16S <i>n-n</i> -ԼԹ գենը BLASTn վերլուծությամբ ամենամոտն է համընկել OSU ներկայացուցչական հաջորդականությանը	OSU-ի ֆիլոգենետիկական պատկանելություն*		
		Մանրէի անունը և շտամը ^ա	Ավանդադրման համար	Նմանություն (%) ^բ
Արզական				
Arz_11B_P2	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	CP000254.1	99	<i>Methanospirillum</i>
Arz_12B_P2	<i>Thermofilum pendens</i> Hw3	NR_029214.1	83	MCG*
Arz_09H_P1	<i>Thermofilum pendens</i> Hw3	NR_029214.1	82	MCG*
Arz_11H_P1	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	CP000254.1	99	<i>Methanospirillum</i>
Arz_11A_P2	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> ZB	AY260433.1	99	<i>Methanomethylovorans</i>
Arz_01A_P2	<i>Methanoregula formicicum</i> SMSMP	CP003167.1	96	<i>Methanomicrobiales</i>
Arz_01H_P1	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> B10	HQ896499.1	87	Չդասակարգված
Arz_02H_P1	<i>Methanoregula formicicum</i> SMSMP	CP003167.1	98	<i>Methanoregula</i>
Arz_04H_P1	<i>Thermofilum pendens</i> Hw3	NR_029214.1	82	MCG*
Arz_07B_P2	" <i>Ca. Nitrososphaera gargensis</i> " Ga9.2	CP002408.1	94	<i>Thaumarchaeota</i>
Arz_10H_P1	<i>Thermofilum pendens</i> Hw3	NR_029214.1	80	DHVC1*
	<i>Methanothermobacter</i>			
Arz_12G_P1	<i>thermautotrophicus</i> ΔH	NR_074260.1	78	DHVC1*
Ջերմուկ				
Jer_12D_P1	<i>Aciduliprofundum boonei</i> T469	NR_074217.1	80	Չդասակարգված
Jer_10A_P1	<i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	CP000254.1	99	<i>Methanospirillum</i>
Jer_11H_P2	<i>Methanosaeta thermophila</i> PT	CP000477.1	99	<i>Methanosaeta</i>
Jer_06F_P1	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> B10	HQ896499.1	88	Չդասակարգված
Jer_11C_P1	<i>Thermofilum pendens</i> Hw3	NR_029214.1	83	MCG*
Jer_04D_P1	" <i>Ca. Nitrososphaera gargensis</i> " Ga9.2	CP002408.1	94	<i>Thaumarchaeota</i>
Jer_07A_P1	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> ZB	AY260433.1	98	<i>Methanomethylovorans</i>
Jer_09A_P1	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> B10	HQ896499.1	88	Չդասակարգված
Jer_02C_P1	<i>Thermofilum pendens</i> Hw3	NR_029214.1	83	MCG*

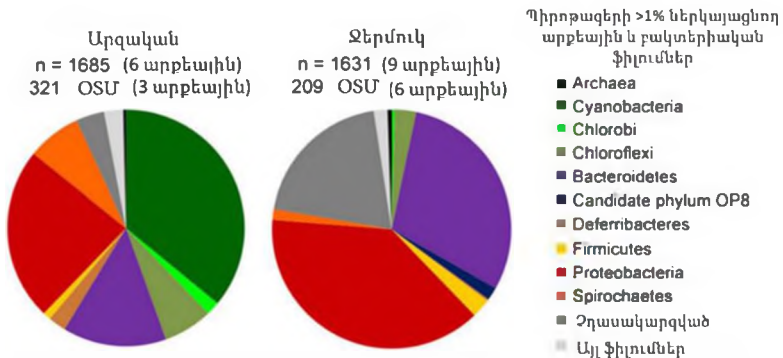
^ա BLASTn վերլուծությամբ ստացված ամենամոտ ազգակիցները հիմնված Megablast-ով սահմանված ցուցանիշներով առավելագույն թիրախային հաջորդականությունների խմբավորմամբ (մինչև 205) նուկլեոտիդային հավաքածուների վրա: Այն դեպքերում, երբ հաջորդականությունը ցածր նմանության տոկոս է ցուցաբերել կուլտիվացվող տեսակի հետ կամ չի եղել նման կուլտիվացվող տեսակ, որոնումը կրկնվել է հղումային *n-n*-ԼԹ հաջորդականությունների կիրառմամբ (refseq_rna).

^բ OSU ներկայացուցչական հաջորդականությունների նմանության տոկոսը:

^գ Պատկանելությունը հնարավոր տաքսոնոմիական մակարդակին (դաս, կարգ, ընտանիք կամ ցեղ) հիմնված Greengenes-ում սահմանված RDP դասակարգման վրա: Պատկանելության վերաբերյալ ֆիլոգենետիկական վերլուծությամբ դուրս բերված OSU-ները նշված են աստղանիշով:

16S *n-n*-ԼԹ գեների պիրոթագերի վերլուծությամբ Արզականի և Ջերմուկի երկրաջերմային աղբյուրներում հայտնաբերվել է բակտերիաների գերակշռմամբ մանրէային բազմազան համակեցություն (նկար 5):

Ընդհանուր առմամբ Արզականի և Ջերմուկի աղբյուրներում հայտնաբերվել են, համապատասխանաբար, 321 և 208 OSU-ներ՝ տեսակի մակարդակում, ու 64 և 38 OSU-ներ՝ ֆիլումի մակարդակում: Արզականի աղբյուրում հայտնաբերված պիրոթագերի միայն 16%-ը, իսկ Ջերմուկի աղբյուրում հայտնաբերվածների 51%-ն է համընկել հայտնի ցեղերին, ինչը ընդգծում է այդ աղբյուրների մանրէային համակեցությունների մենահատկությունը: Բազմազանության գնահատման Chao1 ալգորիթմի կիրառմամբ Արզականի աղբյուրում հայտնաբերվել են թվով 756, իսկ Ջերմուկի աղբյուրում՝ 406 մանրէային տեսակներ:



Նկար 5. Համընդհանուր պիրոթագային տվյալների հավաքածուում ֆիլոգենետիկական խմբերի տարածվածությունը: Ընտրված որակյալ պիրոթագերի ընդհանուր թիվը (n) նշված է:

OSU-ները խմբավորվել են 97% նմանության մակարդակով, իսկ ֆիլումային մակարդակով տաքսոնոմիական խմբավորումները ստացվել են Wang (Bayesian) մեթոդով Silva տվյալների բազայի հետ համեմատությամբ 50% հավաստիության սահմանափակմամբ: Ավել ցածր տոկոսով հավաստիությամբ հանրեկոմունները համարվել են չդասակարգված:

Արգականի աղբյուրից ստացված մի քանի OSU-ներ հստակ պատկանելություն են ցուցաբերել Cyanobacteria խմբին, ինչը համահունչ է աղբյուրի ելքում մաթային կառուցվածքների առկայությանը և ընդգծում է ֆոտոսինթետիկ առաջնային պրոդուկցիայի գերակշռող դերը այդ աղբյուրում: Մյուս OSU-ները ներկայացված են Betaproteobacteria, Spirochaeta, Bacteroidetes և Chloroflexi ֆիլումների ներկայացուցիչներով, սակայն դրանք չի հաջողվել նույնականացնել ընտանիքից ցածր տաքսոնոմիական մակարդակում:

Ջերմուկի աղբյուրից ստացված պիրոթագերի տվյալների հավաքածուում Proteobacteria, Bacteroidetes և Synergistetes ֆիլումները ամենատարածվածներն են եղել: Մի քանի պրոտոբակտերիական OSU-ներ նույնականացված են ծծմբի միացությունները, Fe²⁺ և/կամ H₂ որպես էլեկտրոնային դոնորներ յուրացնելու ունակ օբլիգատ կամ ֆակուլտատիվ քեմոլիթոտրոֆներով, ինչպիսիք են *Thiobacillus*, *Sulfuricurvum*, *Siderooxydans* և *Hydrogenophaga* ցեղերի ներկայացուցիչները՝ դրանով փաստելով առաջնային պրոդուկցիայում քեմոլիթոտրոֆիայի կարևոր դերը: Bacteroidetes ֆիլումին պատկանող OSU-ները տարամիտված են: Դրանցից միայն մեկն է ֆիլոգենետիկորեն մոտ *Lutibacter* ցեղի ներկայացուցիչներին:

Արքեային հաջորդականությունները երկու աղբյուրների պիրոթագերում էլ քիչ են ներկայացված (ընդհանուր առմամբ 9 OSU-ներ): Methanosarcinales կարգին պատկանող արքեային հաջորդականություններ հայտնաբերվել են երկու պիրոթագային հավաքածուներում, մինչդեռ Methanomethylivorans-ի հաջորդականություններ հայտնաբերվել են միայն Ջերմուկում: *Methanosaeta* ցեղին պատկանող ֆիլոտիպեր և, ևս մի ֆիլոտիպ, որը հնարավոր չի եղել նույնականացնել կարգից ցածր տաքսոնոմիական մակարդակում, հայտնաբերվել

հաջորդականությունները ներկայացված են նաև Cyanobacteria, Nitrospirae, Synergistetes, Acidobacteria, Planctomycetes, Deferribacteria, Spirochaetes, Chlorobi և Verrucomicrobia ֆիլումների ներկայացուցիչներով: Արքեաները ներկայացված են Euryarchaeota ֆիլումին պատկանող տեսակներով: Հայտնաբերված գերակշռող բակտերիական ցեղերն են եղել *Pseudomonas*, *Parvibaculum*, *Acidovorax*, *Ramlibacter*, *Flavobacterium*, *Rubrivivax*, *Rhodobacter*, *Thiobacillus*, *Melioribacter* և *Chloroflexus*: Ցեղի և տեսակի մակարդակում մանրէային բազմազանությունը և յուրաքանչյուր տեսակի ներկայացվածությունը ջրային և նստվածքային նմուշներում տարբերվում են:

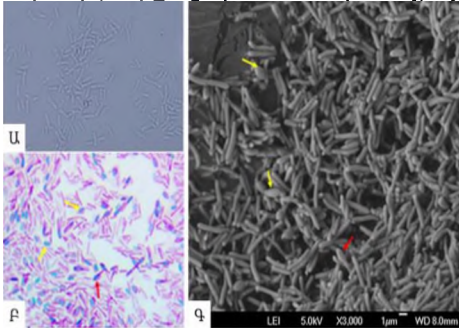
ԳԼՈՒԽ 4. ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԵՎ ԼԵՌՆԱՅԻՆ ՂԱՐԱԲԱՂԻ ԵՐԿՐԱՋԵՐՄԱՅԻՆ ԱՂՔՅՈՒՐՆԵՐԻՑ ՄԵԿՈՒՍԱՑՎԱԾ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԲՆՈՒԹԱԳՐԵՐԸ

Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաջերմային աղբյուրներից նմուշառված ջրի և նստվածքների 36 նմուշներից մեկուսացվել են աերոբ, էնդոսպոր առաջացնող օբլիգատ և չափավոր թերմոֆիլ բացիլների 107 շտամներ: Բոլոր մեկուսացված շտամները ներկայացված են ձողաձև, էնդոսպոր առաջացնող, Գրամ դրական և կատալազ-դրական մանրէներով: Մեկուսացված շտամների ավելի քան 56%-ը դրսևորել են օբլիգատ թերմոֆիլներին ($T_{օպտ}$ 60–65°C) բնորոշ աճ՝ ստացիոնար փուլին հասնելով ինկուբացման 12-24 ժ-ում, մինչդեռ 44%-ը՝ թերմոտոլերանտ մանրէներին ($T_{օպտ}$ 50–55°C) բնորոշ աճ՝ ստացիոնար փուլին հասնելով ինկուբացման 20-24 ժ-ում: Բոլոր շտամները աճ են դրսևորել միջավայրի pH 5.0–11.0 արժեքների տիրույթում և NaCl-ի 0–7% պարունակության պայմաններում: Թերմոտոլերանտ շտամները ունակ են եղել աճելու ջերմաստիճանի և pH-ի արժեքների լայն տիրույթում: Ընդհանուր առմամբ մեկուսացվել և նույնականացվել են *Bacillus* ցեղին պատկանող 32 (կազմել են մեկուսացված բացիլների 29.91%-ը), *Geobacillus* ցեղի 21 (19.63%), *Parageobacillus* ցեղի 10 (9.34%), *Anoxybacillus* ցեղի 36 (33.65%), *Brevibacillus* ցեղի 2 (1.87%), *Aeribacillus* ցեղի 2 (1.87%), *Ureibacillus* ցեղի 3 (2.8%) շտամներ և *Paenibacillus* ցեղի 1 շտամ (0.93%): Մեկուսացված բակտերիաները պատկանել են ավելի քան 22 տարբեր տեսակների:

Թերմոֆիլ բացիլների բազմազանությունը սահմանափակ է համեմատաբար բարձր ջերմաստիճանային աղբյուրներում և, ընդհակառակը: Այսպես, Ոյծի երկրաջերմային աղբյուրը, որի ջերմաստիճանը ելքում 25.8°C է, բնակեցված է առնվազն հինգ ցեղերի տարբեր տեսակներով, մինչդեռ Ջերմուկի և Քարվաճաղի երկրաջերմային աղբյուրները (>50°C), բնորոշվում են ավելի քիչ տաքսոնոմիական բազմազանությամբ և դրանց միկրոբիոտայում գերակշռող են *Geobacillus* և *Anoxybacillus* ցեղերի օբլիգատ թերմոֆիլ տեսակները: Հետազոտված աղբյուրների մեծամասնության (Տաթև, Ոյծ, Ախտրիկ, Արզական, Հանքավան, Բջնի և Զուար) ջրի ջերմաստիճանը ելքում <50°C է, և դրանք հիմնականում բնակեցված են *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* և *Ureibacillus* ցեղերին պատկանող թերմոտոլերանտ բացիլներով: Ավելի բարձր ջերմաստիճանային ռեժիմով աղբյուրներում գերակշռել են *Anoxybacillus*, *Geobacillus* և *Parageobacillus* ցեղի

օբլիգատ թերմոֆիլ բացիլները: *Bacillus* ցեղի տեսակները հայտնաբերվել են հետազոտված բոլոր աղբյուրներում: Ընդհանուր առմամբ *B. licheniformis* (17 շտամներ), *Parageobacillus toebii* (8 շտամներ) և *Anoxybacillus flavithermus* (13 շտամներ) տեսակները ամենատարածված տեսակներն են հետազոտված բոլոր աղբյուրներում:

Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված K1 կոլտուրան ըստ 16S r-ՌՆԹ-ի գեների հաջորդականությունների 99.9% նմանություն է դրսևորել *A. flavithermus* տեսակի DSM 2641^T տիպային շտամին, մինչդեռ *Anoxybacillus* ցեղի այլ տեսակների հետ ցուցաբերել է ավելի ցածր տոկոսային նմանություն: Բջիջները շարժուն, 2.3-7.2 մկմ երկարությամբ և 0.2-0.4 մկմ լայնությամբ ձողաձև են, իսկ էնդոսպորները՝ էլիպսաձև և ենթաձայրային դասավորությամբ (նկար 7):



Նկար 7. K1 շտամի

մանրադիտակային պատկերները:

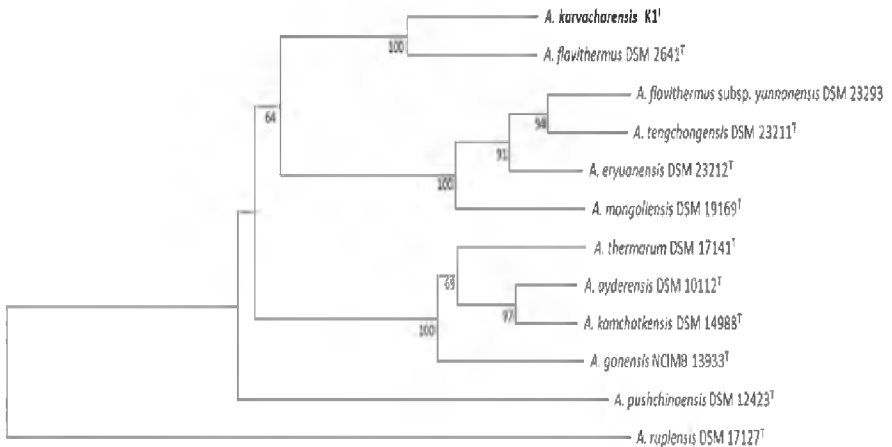
Ա, ֆազակոնտրաստային ($\times 1000$, OMAX), Բ, լուսային ($\times 1000$, OMAX) և Գ, ՍԷՄ պատկերները: Տեսադաշտում՝ ազատ էնդոսպորներ (դեղին սլաքներ), ենթաձայրային տեղակայմամբ բջիջները ուղեկցում էնդոսպորներ (կարմիր սլաքը):

Աճի ջերմաստիճանային տիրույթը 45-70°C է, $T_{օպտ}$ ՝ 60-65°C, pH տիրույթը՝ 5.0-12.0 է, $pH_{օպտ}$ ՝ 8-9: Ալկալիտուրանտ թերմոֆիլ է, աճը արգելակվել է միջավայրում NaCl-ի >2.5% կոնցենտրացիայի պայմաններում: Աճի բարելավված պայմաններում շտամի գեներացիայի ժամանակը կազմել է 30 ր: K1^T շտամը տարբերվել է տիպային տեսակից բջիջների չափով, էնդոսպորների ձևով և տեղակայմամբ, աճի ավելի նեղ ջերմաստիճանային և pH տիրույթով, NaCl-ի նկատմամբ դիմացկունությամբ, նիտրատը վերականգնելու ունակությամբ, օսլայի ու կազեինի հիդրոլիզով:

Ճարպաթթուների մեթիլէթերների վերլուծությամբ հայտնաբերվել է իզո-C15:0 (52.02%), իզո-C17:0 (19.09%) և C16:0 (13.15%) ճարպաթթուներ: Իզո- ճյուղավորված հագեցած ճարպաթթուները գերակշռել են՝ կազմելով ընդհանուր բջջային ճարպաթթուների ավելի քան 84%: Հայտնաբերվել են նաև C16:0 (13.15%), իզո-C16:0 (3.83%), C17:0 (0.48%), իզո-C17:0 (19.09%) և անթերիզո-C17:0 (4.62%) ճարպաթթուներ: Ի տարբերություն *Anoxybacillus* ցեղի այլ տեսակների K1 շտամը պարունակել է քիչ քանակությամբ իզո-C14:0 3-OH (0.31%), և C18:1 ω 9c (1.01%) ճարպաթթուներ:

Ամբողջական գենոմը 2.7 Մնգ է՝ բաշխված 59 կոնտիգներում: Այն պարունակում է 2689 կոդավորող գեներ, 115 պսևդոգեներ, և երկու CRISPR հատվածներ: K1 շտամը 94.5% գենոմային միջին նուկլեոտիդային (ANI) նմանություն ունի իր ֆիլոգենետիկորեն ամենամոտ *A. flavithermus* DSM 2641^T (CP020815.1) տեսակի գենոմի հետ:

in-silico Genome-To-Genome հեռավորության հաշվիչով հաշվարկված գենոմային հաջորդականությունների զուգահեռ նմանությունը K1 և DSM 2641^T շտամների միջև կազմել է 60.1%: Գենոմային ԴՆԹ-ների տարբերության այս արժեքը ավելի ցածր է ընդունելի արժեքից (70%), որով բակտերիական տեսակները տարամիտվում են միմյանցից [Stackebrandt et al. 2002, Chun et al. 2018]: Հետևաբար, K1 շտամը ներկայացնում է *Anoxybacillus* ցեղի նոր տեսակ: K1 շտամի նոր տեսակ լինելու հանգամանքը հաստատել է նաև հարակից մոտ ազգակցական տեսակների գենոմների համեմատության հիման վրա իրականացված ֆիլոգենետիկական վերլուծությունը (նկար 8):



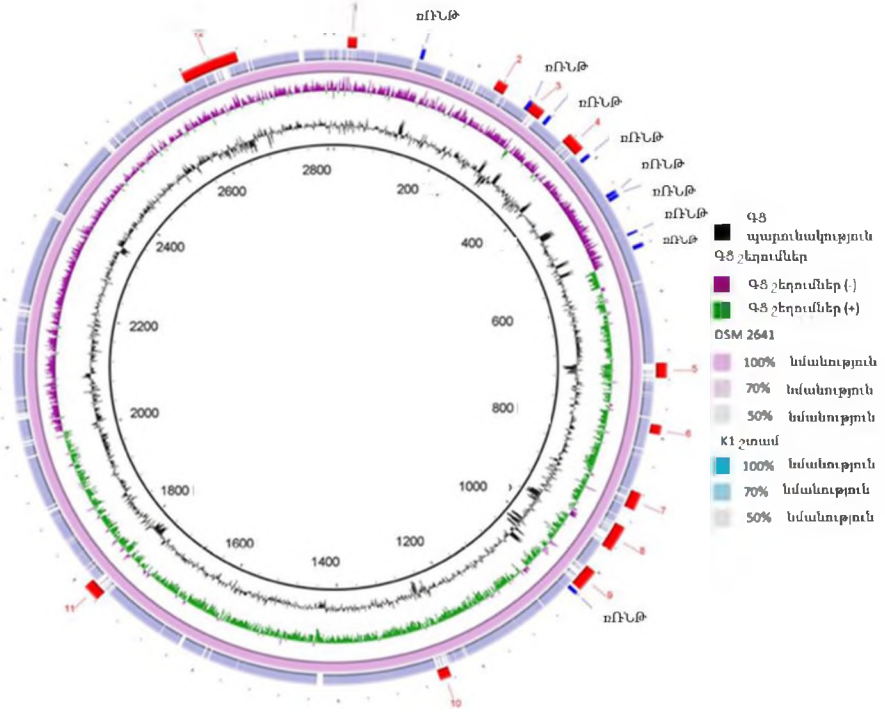
Նկար 8. *A. karvacharensis* K1^T շտամի և ազգակից *Anoxybacillus* ցեղի այլ տեսակների տիպային շտամների գենոմների հիման վրա կառուցված ֆիլոգենետիկական ծառը:

Ծառը կառուցվել է FastME 2.1.6.1 ծրագրով [Lefort et al., 2015] գենոմների միջև ֆիլոգենետիկական հեռավորության (GBDP) հաշվարկով կիրառելով TYGS սերվերի գենոմային հաջորդականությունները (<https://tygs.dsmz.de>) [Meier-Kolthoff, Göker 2019]: Ճյուղերի վրա բերված թվերը GBDP կնոճ-bootstrap արժեքներն են >64 % 100 կրկնություններից՝ միջինում 97.7 % [Farris et al. 1972]:

K1 շտամի և *Anoxybacillus flavithermus* DSM2641^T շտամի գենոմների քարտեզների շրջանաձև համեմատական պատկերը (նկար 9) ցույց է տվել բազմաթիվ ցրված ոչ հոմոլոգ հատվածներ: K1 շտամի ԳՑ պարունակությունը կազմել է 41.6%, ինչը համապատասխանում է մոտ ազգակից տեսակների նույն ցուցանիշին (41.4 – 42.0%):

Հիմնվելով ֆենոտիպական, ֆիլոգենետիկական և գենոմային վերլուծությունների վրա՝ ցույց է տրվել K1 շտամի պատկանելությունը *Anoxybacillus* ցեղին և նույնականացվել է որպես *Anoxybacillus karvacharensis* sp. nov. անվանումով՝ նոր տեսակ: 16S r-ԴՆԹ գենի և ամբողջական գենոմի հաջորդականությունները ավանդադրվել են Գենային բանկում,

համապատասխանաբար, MK418417 և MQAD00000000 հաշվառման համարներով: Այդ տեսակի տիպային շտամն է K1^T (=DSM 106524^T =KCTC 15807^T):



Նկար 9. K1^T շտամի և *A. flavithermus* DSM2641^T հղումային շտամի գենոմների համեմատությունը շրջանաձև քարտեզային պատկերում:

Քարտեզը կառուցվել է Ring Image Generator (BRIG) սերվերի օգնությամբ [Alikhan et al. 2011]։ Շրջանի ներսում 200-2800 թվերով արտահայտված է գենոմի չափը (Կնգ)։ Շրջանում կենտրոնից դեպի եզրերը՝ ԳՑ պարունակությունը (սև)։ ԳՑ շեղումը (-, բոտրագույն; +, կանաչ)։ *A. flavithermus* strain DSM2641^T (վարդագույն)։ *A. karvacharensis* strain K1^T (մանուշակագույն), ինը n-fnL օպերոնների տեղակայումը գենոմում (կապույտ աղեղներ) և 12 գենոմային կղզակներ (կարմիր աղեղներ)։

Գենոմային կղզակները հայտնաբերվել են IslandViewer 4 ծրագրով (www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/):

Ուսումնասիրվել են մեկուսացված բացիլային շտամների արտաբջջային հիդրոլազներ (պրոտեազներ, ամիլազներ և լիպազներ) արտադրելու ունակությունը աճի բարելավված պայմաններում։ Մեկուսացված կուլտուրաներից 76-ը (71%) ունակ են արտադրելու արտաբջջային հիդրոլազային ֆերմենտներ։ Բացիլների թվով 11 շտամներ (*Geobacillus* (2), *Parageobacillus* (1), *Anoxybacillus* (3), *Bacillus* (3), *Aeribacillus* (1), *Ureibacillus* (1)) պրոտեազների, 14 շտամներ (*Parageobacillus* (1), *Anoxybacillus* (12), *Brevibacillus* (1)) ամիլազների և միայն 3 շտամներ (*Geobacillus* (2), *Parageobacillus* (1)) լիպազների արտադրիչներ են։ Միաժամանակ պրոտեազի և ամիլազի ակտիվ արտադրություն հայտնաբերվել է ուսումնասիրված 7 շտամներում (*Geobacillus* (4), *Anoxybacillus* (2), *Bacillus* (1)), մինչդեռ, միաժամանակ լիպազային և

ամիլազային ֆերմենտների արտադրություն հայտնաբերվել է միայն 6 շտամներում (*Geobacillus* (1), *Parageobacillus* (2), *Anoxybacillus* (1), *Bacillus* (1), *Paenibacillus* (1)):

Հետազոտված 13 շտամները (*Geobacillus* (2), *Parageobacillus* (2), *Anoxybacillus* (1), *Bacillus* (6), *Ureibacillus* (2)) ակտիվ արտադրել են պրոտեազներ և լիպազներ: Շտամների 28.6%-ը, որոնք պատկանել են *Anoxybacillus* (5), *Geobacillus* (5), *Bacillus* (11) և *Brevibacillus* (1) ցեղերին, ունակ են արտադրելու բոլոր երեք ջերմակայուն հիդրոլազներն էլ: Գեոբացիլները ունակ են եղել արտադրելու գրեթե բոլոր հիդրոլազները առանձին և/կամ համակցված: *Ureibacillus* և *Aeribacillus* ցեղերին պատկանող շտամներում ամիլազ արտադրիչներ չեն հայտնաբերվել: Երկրաջերմային աղբյուրներում գերակշռել են *Anoxybacillus* ցեղին պատկանող հիդրոլազային ակտիվությամբ օժտված թվով 24 շտամներ: Մյուս օբյեկտներում ֆիլ կամ թերմոտոլերանտ բացիլները, որոնք օժտված են հիդրոլազային ակտիվությամբ, պատկանել են գլխավորապես *Geobacillus*, *Parageobacillus* և *Bacillus* ցեղերին: Ամենաակտիվ հիդրոլազային արտադրիչները պատկանել են անօքսիբացիլներին, ընդ որում, դրանցից 12 շտամներ ամիլազի ակտիվ արտադրիչ են:

Ուսումնասիրված բացիլները, հավանաբար, բնորոշվում են պրոտեազ կոդավորող գեների լայն բազմազանությամբ, քանի որ շտամների 70%-ը ցուցաբերում են պրոտեոլիտիկ ակտիվություն: Ամիլազի ամենաակտիվ արտադրիչներ են անօքսիբացիլները, որոնց 52%-ում հայտնաբերվել է այդ ակտիվությունը, մինչդեռ *Bacillus* ցեղի տեսակները եղել են պրոտեազների (շտամների 40%) և լիպազների (շտամների 34%) արտադրիչներ: *Anoxybacillus* ցեղի տեսակները հիմնականում ակտիվ են եղել օսլան հիդրոլիզելու, իսկ *Geobacillus* ցեղի տեսակները՝ լիպիդների հիդրոլիզման գործընթացում, մինչդեռ *Bacillus* ցեղի տեսակները ունակ են եղել յուրացնելու տարբեր սուբստրատներ:

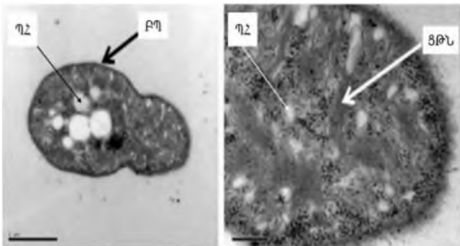
Ախտիկի և Տաթևի երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացվել են թերմոակտինոմիցետների, համապատասխանաբար, AkhA-12 և Tatev 35a անվանակոչված երկու կուլտուրաներ, որոնք ֆենոտիպական և ֆիլոգենետիկական (98.9 և 99.7% նմանությամբ) բնութագրերի հիման վրա նույնականացվել են որպես *Thermoactinomyces* ցեղի տեսակներ: Երկու շտամներն էլ առաջացնել են կարճ, չճյուղավորված սպորոֆորներում տեղակայված 0.7–0.9 մկմ չափսերով գնդաձև էնդոսպորներ: Աճի ջերմաստիճանի լայն տիրույթը 37°C-ից 60°C ջերմաստիճաններում է ($T_{օպտ}$ 50–55°C), pH տիրույթը՝ 5.0 – 8.0 ($pH_{օպտ}$ 7.0–7.2). Երկու կուլտուրաներն էլ ունակ են քայքայելու ժելատինը, կոագուլացնում են կաթը:

Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացվել է *Thermus* ցեղին պատկանող մանրէային կուլտուրա՝ անվանակոչված K1, որի աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 65°C է, իսկ pH օպտիմումը՝ 8: Կատալազ և օքսիդազ դրական է, ունակ է աճելու անաերոբ պայմաններում՝ նիտրատային շնչառությամբ: PacBio RS տեխնոլոգիայի և Celera Assembler փաթեթի կիրառմամբ K1 շտամի գենոմը սերվենսավորվել և վերլուծվել է: ԳՑ պարունակությունը կազմել է 65.2%: Միջին նուկլեոտիդային նմանության (ANI) վերլուծությունը և ԴՆԹ:ԴՆԹ

հիրրիդացումը ցույց է տվել համապատասխանաբար 97.55% ANI արժեք և 80.70% գենոմի հոմոլոգիա K1 և *T. scotoductus* SA-01 շտամների միջև, ինչը փաստում է դրանց պատկանելությունը նույն տեսակին: Գենոմում հայտնաբերվել են ընդհանուր առմամբ 2,529 գեներ, ներառյալ 2,104 սպիտակուց կոդավորող գեներ, *n*-*n*-*n*Թ գեների 3 հավաքածու, 48 *ψ*-*n*-*n*Թ գեներ և 2 *n*-*n*Թ չկոդավորող գեներ: *n*-*n*-*n*Թ գեները փոխկապակցված չեն և տեղակայված են 16S և 23/5S *n*-*n*-*n*Թ-ների գեների առանձին օպերոններում: Գենոմի կազմում հայտնաբերվել են երկու CRISPR հատվածներ: K1 շտամի ամբողջական գենոմը ավանդադրվել է DDBJ/EMBL/GenBank հաշվառման LJJR00000000 համարով:

Արզականի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացվել է 50°C աճի ջերմաստիճանային օպտիմում ունեցող Arz-AM-1 մեթանատրոֆ կուլտուրա, որն ըստ 16S *n*-*n*-*n*Թ գենի հաջորդականությունների հիման վրա նույնականացվել է որպես թերմոֆիլ մեթանատրոֆ *Methylocaldum* ցեղի տեսակ (96% նմանությամբ): Մեկ այլ մեթանատրոֆ կուլտուրա, անվանակոչված AK-K6, մեկուսացվել է Ախուրիկի տաք աղբյուրից: Աճի էքսպոնենցիալ փուլում AK-K6-ն առաջացնում է 1.5–2.2 մկմ երկարությամբ և 0.5–1.5 մկմ լայնությամբ ձողաձև, Գրամ բացասական, անշարժ բջիջներ (նկար 10):

Որպես աճխածնի և էներգիայի աղբյուր յուրացնում է մեթանը կամ մեթանոլը (0.05%–0.50% ծ/ծ), իսկ որպես ազոտի աղբյուր՝ նիտրատը, ամոնիակը և N₂: Աճի ջերմաստիճանային տիրույթը լայն է՝ 8–35°C (T_{օպտ} 25–28°C), իսկ pH տիրույթը՝ 5.0–7.5 (pH_{օպտ} 6.4–7.0): Կուլտուրան ունակ է աճելու առանց NaCl-ի LMM սննդամիջավայրում, սակայն օպտիմում աճ է դրսևորում 0.1% NaCl-ի պայմաններում:

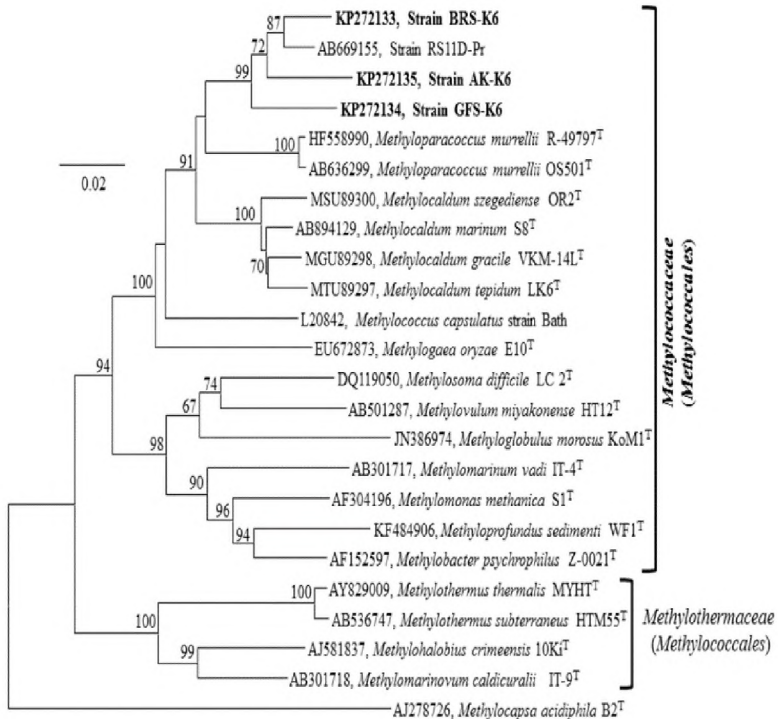


Նկար 10. AK-K6 շտամի ՏԷՄ պատկերը:

Նկատելի են բշտիկային սկավառակները, որոնք բնորոշ են Gammaproteobacteria ֆիլումին պատկանող մեթանատրոֆների ցիտոպլազմային թաղանթների ներփրումներին (ՑԹԼ): ՊԸ, պաշարայնության հատիկներ, և ԲՊ, բջջապատը: Մասշտաբային սանդղակը՝ 1 մկմ:

AK-K6 շտամի 16S *n*-*n*-*n*Թ գենի (1412 նգ) հաջորդականությունների հիման վրա NJ ալգորիթմի կիրառմամբ կառուցվել է ֆիլոգենետիկական ծառ, որում այն հստակ ներկայացնում է նոր կլեյդ *Methylococcus*-*Methylocaldum*-*Methylogaea*-*Methyloparacoccus* կլաստերում (նկար 11):

Ֆիլոգենետիկական վերլուծությունները բացահայտել են 16S *n*-*n*-*n*Թ գենի հաջորդականությունների 90.8–93.2% նմանություն *Methyloparacoccus* (92.9%), *Methylocaldum* (91.1%–93.2%), *Methylococcus* (91.0%) և *Methylogaea* (90.8%) ցեղերի տեսակների հետ: Ֆենոտիպական և ֆիլոգենետիկական վերլուծությունների հիման վրա կարելի է եզրակացնել, որ AK-K6 շտամը ներկայացնում է *Methylococcaceae* ընտանիքի նոր էվրիթերմ տեսակ:



Նկար 11. 16S *n-n*-ԼԹ գեների հաջորդականությունների հիման վրա NJ ալգորիթմով MEGA6 ծրագրային փաթեթով կառուցված ֆիլոգենետիկական ծառ, որում արտացոլված է Ախուրիկի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված AK-K6 շտամի և ազգակից *Gammaproteobacteria* շտամների միջև

ֆիլոգենետիկական կապը:

Տևկության արժեքները ($\geq 60\%$), որոնց հիման վրա ազգակից տեսակները կլաստրացվել են միասին bootstrap վերլուծությանը (1000 կրկնություններով), ներկայացված են ծառի ճյուղերում: *Alphaproteobacteria* ֆիլումին պատկանող II տիպի մեթանատրոֆ *Methylocapsa acidiphila* (AJ278726) 16S *n-n*-ԼԹ գեների հաջորդականությունները կիրառվել են որպես արտախմբային հաջորդականություններ: Մասշտաբային ստեղծվելը՝ 0.02: BRS-K6 մեթանատրոֆ բակտերիական կուլտուրան մեկուսացվել է բրնձի, իսկ GFS-k6-ը՝ մեթանային էմիսիայով ճակի նստվածքներից [Islam et al. 2015]:

Հայկական երկրաջերմային աղբյուրների ջրատղմային նմուշներից հաջողվել է ստանալ նիտրիտօքսիդացնող բակտերիաների կուտակիչ կոլտուրա՝ սննդամիջավայրում որպես էլեկտրոնային դոնոր և էներգիայի աղբյուր կիրառելով 0.1 մՄ նախնական կոնցենտրացիայով NO_2^- ինկուբացնելով 50°C ջերմաստիճանային և միկրոաերոֆիլ պայմաններում: Այդ պայմաններում NO_2^- -ի յուրացումը միավոր ծավալում հասնել է իր առավելագույն արժեքին և աճի lag փուլը ամենակարճն է եղել: Ընդ որում նիտրիտի օքսիդացումը դիտվել է նաև 60°C , բայց ոչ $>65^\circ\text{C}$ ջերմաստիճանային պայմաններում: Կուտակիչ կոլտուրաներից ստացված

կլոնային գենադարաններում հայտնաբերվել են բակտերիաների ֆիլոտիպեր, որոնք ըստ 16S r-ՌՆԹ գենի հաջորդականությունների 96–98% նմանությամբ նույնականացվել են որպես *N. calida* և *N. moscoviensis*: Պարզելու համար, թե այդ համակեցության կոնկրետ տաքսոնները ինչ ակտիվությամբ են մասնակցում նիտրիտի օքսիդացմանը, գեներացվել է *Nitrospira* միավոր բջջի նիտրիտ օքսիդացման ակտիվությունը քանակական ՊՇՌ- մեթոդով՝ օգտագործելով *Nitrospira* մենահատուկ 16S r-ՌՆԹ գենային փրայմերներ: Կուտակիչ կուլտուրան ինկուբացվել է 50°C ջերմաստիճանային պայմաններում, 0.3 մՄ նիտրիտի առկայությամբ: Արդյունքում կուտակիչ կուլտուրայի միավոր ծավալում (1 մլ) հայտնաբերվել է $1.4\text{--}1.6 \times 10^6$ թվով *Nitrospira* 16S r-ՌՆԹ պատճեններ: 1 ժ-ում յուրաքանչյուր բջջի նիտրիտի օքսիդացման տեմպը կազմել է 7.53 ± 1.20 ֆմոլ: Նիտրիտօքսիդացնող բակտերիաների ակտիվության առավելագույն արժեքը դիտվել է NO_2^- -ի 0.5–0.75 մՄ կոնցենտրացիայի պայմաններում, իսկ ավելի պակաս կոնցենտրացիայի դեպքում նկատվել է աճի ավելի կարճ lag փուլ: Թթվածնի և նիտրիտի կոնցենտրացիայի նկատմամբ նիտրիտօքսիդացնող բակտերիաների կուտակիչ կուլտուրաների զգայունությունը հաստատում է այն վարկածը, որ *Nitrospira* տեսակները K-ստրատեգիա կրողներ են, և ընդգծում է NO_2^- -ի ցածր կոնցենտրացիայի (<1 մՄ) անհրաժեշտությունը թերմոֆիլ *Nitrospira* տեսակների աճեցման համար:

Արզականի նմուշներից խմորասնկային մզվածք, դեքստրին և պեպտոն պարունակող սննդամիջավայրում հաջողվել է մեկուսացնել 45–50°C ջերմաստիճանային օպտիմում ունեցող Arz-ANA-2 անվանակոչված անաերոբ կուլտուրա, որը ըստ 16S r-ՌՆԹ գենի հաջորդականության վերլուծության 99% նմանությամբ համընկել է Epsilonproteobacteria ֆիլումին պատկանող *Arcobacter* sp. (HM584709) տեսակի հետ (Գենային բանկում ավանդադրման համարը՝ JQ929025):

Արզականի տղմային նմուշներից հաջողվել է գեներացնել 45°C ջերմաստիճանային պայմաններում աճող հիդրոգենոտրոֆ մեթանագեն արքեաների առաջնային կուտակիչ կուլտուրա, որից ստացվել է կլոնային գենադարան: Ստացված ֆիլոտիպերից 4-ը 96% նմանությամբ համընկել են *Methanoculleus* ցեղի տեսակներին, իսկ 3 հաջորդականություններ՝ 97% նմանությամբ համընկել են արքեաների դեռևս չկուլտիվացված ֆիլոտիպերին և միայն 94% նմանությամբ՝ *Methanoculleus* ցեղի տեսակներին: Հաջորդականությունների միայն <97% նմանությունը հայտնի ֆիլոտիպերին փաստում է նոր արքեային տաքսոնին դրանց պատկանելության մասին:

Մեթանագեն արքեաների կուտակիչ կուլտուրա գեներացվել է նաև Ջերմուկի նմուշներից որպես սուբստրատ ացետատի և H_2/CO_2 -ի կիրառմամբ: Արզականի նմուշներից ևս ացետատի հիմքով ստացվել է մեթանագեն արքեաների կուտակիչ կուլտուրա: Թե՛ ացետակլաստիկ և թե՛ հիդրոգենոտրոֆ մեթանագենեզ արձանագրվել է Ջերմուկի նմուշներից գեներացված առաջնային կուլտուրայում 45 և 55°C պայմաններում, մինչդեռ Արզականի նմուշներից գեներացված առաջնային կուլտուրայում՝ միայն 45°C ջերմաստիճանային պայմաններում (աղյուսակ 3):

Աղյուսակ 3.

Հանքային սննդամիջավայրի հիմքով մեթանագեն կուտակիչ կուլտուրայում մեթանի արտադրությունը (որոշվել է գազային քրոմատոգրաֆիայի եղանակով)

Սուբստրատ	Մեթանոլ			Ացետատ			H ₂ +CO ₂		
Աճեցման ջերմաստիճան, °C	45	55	65	45	55	65	45	55	65
Արգական	-	-	-	+++	-	-	+++	-	-
Ջերմուկ	+++	++	-	+++	+	-	+++	++	-

- +++, մեթանի կոնցենտրացիան >5,000 ppm,
- ++, մեթանի կոնցենտրացիան <5,000 ppm, բայց >1,000 ppm,
- +, հայտնաբերվում է մեթան, բայց <1,000 ppm,
- , մեթան չի հայտնաբերվում (որոշման սահմանափակումը՝ 2 ppm):

Մեթիլատորֆային կուտակիչ կուլտուրա հաջողվել է գեներացնել միայն Ջերմուկի նմուշներից, չնայած Արգականի նմուշներից գեներացված մեթիլատորֆ առաջնային կուլտուրան դրական արդյունք է տվել խմորասնկային մզվածքի կիրառման դեպքում, ինչը փաստում է H₂-կախյալ մեթիլատորֆիայի մասին՝ հիմնված խմորասնկային մզվածքի խմորման արդյունքում անջատված H₂-ի յուրացման վրա: Նմանատիպ նյութափոխանակություն նկարագրվել է նաև *Methanomassiliococcus luminyensis* արքեայում, ինչը սովորական չէ մեթանագենների համար (Dridi et al. 2012):

Արգականի երկարաջերմային աղբյուրի նմուշներից ստացված մեթանագեն արքեաների կուտակիչ կուլտուրաներից հաջողվել է մեկուսացնել աճի T_{օպտ} 45°C հիդրոգենոտորֆ մեթանագեն արքեային կուլտուրա՝ անվանակոչված Arz-ArchMG-1 (Գենային բանկում ավանդադրման համարը՝ JQ929040), որի 16S r-ՌՆԹ գենի հաջորդականությունը միայն 96.82% նմանությամբ է համընկնում *Methanoculleus* sp. LH2 (DQ987521) շտամի նմանատիպ հաջորդականությանը՝ փաստելով դրա պատկանելությունը նոր տեսակին:

ԳԼՈՒԽ 5. ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԵՎ ԼԵՌՆԱՅԻՆ ՂԱՐԱԲԱՂԻ ԵՐԿՐԱՋԵՐՄԱՅԻՆ ԱՐՔՅՈՒՐՆԵՐԻ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԷՎՈԼՈՑԻԱԿԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԱԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ընդհանուր առմամբ ջերմաստիճանը որոշիչ գործոն է ռաունասպիրված երկրաջերմային աղբյուրներում բակտերիաների և արքեաների տաքսոնոմիական և նյութափոխանակային բազմազանության համար, ընդ որում աղբյուրի ջրի ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց մանրէների տաքսոնոմիական բազմազանությունը նվազում է: Հայկական երկրաջերմային աղբյուրները բնակեցված են Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria և Firmicutes ֆիլումների պատկանող մանրէներով: Ավելի բարձր ջերմաստիճանային ռեժիմով աղբյուրները, օրինակ՝ Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրը գաղութացված է Actinobacteria, Deinococcus-Thermus և Aquificae ֆիլումին պատկանող տեսակներով: Ուսումնասիրված գրեթե բոլոր աղբյուրներում հանդիպում են Firmicutes ֆիլումի թերմոֆիլ ներկայացուցիչներ:

Ածխածնի և ազոտի սահմանափակ պաշարները, համեմատաբար բարձր հանքանյութային և բարձր ջերմաստիճանային ռեժիմը նպաստում են որոշ թերմոֆիլ մանրէների, մասնավորապես, նյութափոխանակային ճկուն մեխանիզմ ունեցող *Geobacillus*, *Parageobacillus* և *Anoxybacillus* ցեղերին պատկանող տեսակների զարգացմանը: Բացիվները ամենատարածված օրգանիզմներն են և, որպես էվոլյուցիոն օրգանիզմներ, ունակ են կենսագործելու ջերմաստիճանի բավականին լայն տիրույթում: Դրանք, որպես լայն սպեկտրով ածխածնի աղբյուրներ յուրացնող քեմոօրգանատրոֆ հետերոտրոֆներ, ունակ են գոյատևելու ինչպես անոթ, այնպես էլ անաերոբ պայմաններում և բավականին տարածված են հայկական երկրաջերմային աղբյուրներում: Մանրէային համակեցությունները ունակ են յուրացնելու ինչպես ավտոխտոն, այնպես էլ ալլոխտոն ածխածնի օրգանական միացությունները, այդ թվում կենսապոլիմերները՝ բարձր հիդրոլազային ակտիվությամբ օժտված թերմոֆիլ բացիլների առատ ներկայության շնորհիվ:

Երկրաջերմային աղբյուրների ջրի pH-ի չեզոք արժեքները և չափավոր ջերմաստիճանային ռեժիմը նպաստում են դրանցում առաջնային պրոդուկցիա ապահովող ֆոտոտրոֆների լայն տարածվածությանը: Աղբյուրի ելքում, լույսի առատության պայմաններում ֆոտոտրոֆ մանրէները, բուռն աճի շնորհիվ, հաճախ առաջացնում են գույնզգույն մաթային կենսաշերտեր: Ածխածնի ավտոտրոֆ ֆիքսացիան ապահովվում է օքսիգեն ֆոտոտրոֆ *Cyanobacteria*, *Chloroflexi* և անօքսիգեն *Proteobacteria* տեսակներով, իսկ որոշ դեպքերում նաև կանաչ ձմբային *Chlorobi* բակտերիաներով, քեմոլիթոտրոֆ *Nitrospira* spp. և *Proteobacteria* ֆիլումի բազմաթիվ ներկայացուցիչներով:

Լուծված գազային նյութերը (H_2 , CO_2 , H_2S , և CH_4) հնարավոր սահմանափակող գործոններ են բազմաթիվ հետերոտրոֆ մանրէների աճի համար, սակայն նպաստում են քեմոլիթոտրոֆ մանրէների կենսազանգվածի ձևավորմանը: *Proteobacteria* ֆիլումի բազմաթիվ տեսակներ, որոնք հայտնաբերվել են գրեթե բոլոր հետազոտված աղբյուրներում, պատկանել են օբլիգատ կամ ֆակուլտատիվ քեմոլիթոտրոֆներին՝ ունակ օքսիդացնելու ձմբի վերականգնված միացությունները, Fe^{2+} -ը և կամ H_2 -ը որպես էլեկտրոնային դոնորներ:

Չնայած ուսումնասիրված աղբյուրներում արքեաները պրոկարիոտային համակեցության փոքրամասնություն են կազմում, այնուամենայնիվ, մեթանագեն *Euryarchaeota* արքեաները ևս ներգրավված են ածխածնի ֆիքսացիայի գործընթացում վերականգնողական ացետիլ-CoA ուղիով (հիդրոգենտրոֆ մեթանագենեզ): Մեթանի սինթեզի այլ ուղիները (ացետակլաստիկ և մեթիլատրոֆ) ևս ներգրավված են մեթանագենեզի գործընթացում: Այսպիսի մեթանագեն թերմոֆիլ արքեաների առկայությունը հաստատվել է Արզականի և Ջերմուկի երկրաջերմային աղբյուրներից կուտակիչ և/կամ մաքուր կուլտուրաների ստացմամբ, ինչը փաստում է մեթանի և այն արտադրող/յուրացնող մանրէների դերը ածխածնի շրջապտույտում: Անաերոբ *Firmicutes* և *Proteobacteria* ֆիլումներին պատկանող տեսակների, ինչպես նաև *Methanosaeta* spp. առկայությունը ընդգծում է

երկրաջերմային աղբյուրների մթնոլորտային ազոտը ֆիքսելու ներուժը և կարևորությունը ազոտի կենսատերկրաքիմիական շրջապտույտում:

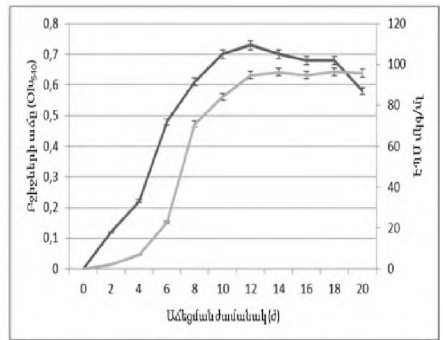
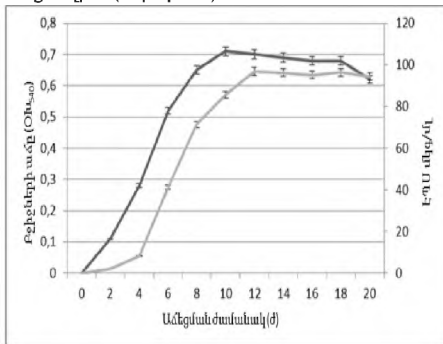
Թթվածնի ցածր լուծելիությունը ջերմային աղբյուրներում նպաստավոր է նաև ազոտի շրջապտույտում առանցքային նշանակություն ունեցող դենիտրիֆիկացնող բակտերիաների կենսագործման համար, որոնք շնչառական շղթայում նիտրիտը կամ նիտրատը վերականգնում են որպես վերջնական ակցեպտոր: Ջերմուկի երկրաջերմային աղբյուրում ամոնիակ օքսիդացնող արքեային (“*Candidatus Nitrososphaera gargensis*” և դեռևս չկուլտիվացված *Thaumarchaeota*) և նիտրիտ օքսիդացնող քեմոլիթոտրոֆ բակտերիական *N. calida* և *N. moscoviensis* ֆիլոտիպերի հայտնաբերումը հաստատում է դրանց դերը ազոտի կենսատերկրաքիմիական շրջապտույտում առանցքային նշանակություն ունեցող գործընթացի՝ նիտրիֆիկացիայի կարևորությունը:

Վերջերս ցույց է տրվել նաև երկրաջերմային աղբյուրների ալլոխտոն միկրոբիոտայի կազմի վրա նաև կենսաշխարհագրական գործոնի և տեղանքի երկրաբանական պատմության դերը [Whitaker et al. 2003, Takacs-Vesbach et al. 2008]: Այս երևույթը դիտվում է մեր հետազոտություններում ևս, երբ դիտարկում ենք ուսումնասիրված աղբյուրները որպես Ալպ-Հիմալայան գեոսինկլինալի մաս: Հայկական երկրաջերմային աղբյուրների և Ալպ-Հիմալայան գեոսինկլինալի գոտու բարձր լեռնային բազմաթիվ երկրաջերմային աղբյուրների, մասնավորապես Նեպալյան Հիմալայան [Arya et al. 2015, Sahay et al. 2017, Yadav et al. 2018], Անատոլիական բարձրավանդակի [Adiguzel et al. 2009, Cihan et al. 2011] և Բուլղարայի Ռոդոպյան լեռներում հայտնաբերված երկրաջերմային աղբյուրների [Derekova et al. 2008] միկրոբիոտայի համեմատությունը փաստում է դրանց միջև առկա նմանությունը: Ենթադրում ենք, որ դեռևս ակտիվ ընթացող սեյսմիկ գործընթացները ազդում են Ալպ-Հիմալայան գոտում տեղակայված աղբյուրների կենսաբազմազանության վրա՝ ընդգծելով կենսաշխարհագրական դետերմինավորվածությունը:

ՊԼՈՒՆ 6. ԹԵՐՄՈՆԻՏԻԼ ԲԱՏԻԼՆԵՐԸ ՈՐՊԵՍ ԷՊՍ ԱՐՏԱԴԻՐԻՉՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ԲԻՄԻԱԿԱՆ ԿԱՉՄԸ

Արզականի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված թերմոֆիլ բացիլների ԷՊՍ արտադրության սկրինինգի արդյունքում ընտրվել են *G. thermodenitrificans* ArzA-6 և *P. toebii* ArzA-8 ակտիվ արտադրիչ շտամներ, ապա կենսազանգվածի և ԷՊՍ-ի արտադրության բարելավման նպատակով ուսումնասիրվել է դրանց աճի կինետիկան՝ կախված աճեցման ժամանակից, ջերմաստիճանից և սննդամիջավայրում ածխածնի աղբյուրից: Մանրէային կենսազանգվածն իր առավելագույն արժեքին հասել է 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում 10-18 ժ ինկուբացնելիս (նկար 12): Երկու շտամների դեպքում էլ ԷՊՍ արտադրությունը կտրուկ աճել է աճի էքսպոնենցիալ փուլում և հասել իր առավելագույն արժեքին (96.8 և 96.28 մկգ/մլ, համապատասխանաբար, *G. thermodenitrificans* ArzA-6-ի և *G. toebii* ArzA-8-ի համար) ստացիոնար փուլում: Այսպիսով, ԷՊՍ-ի ելքը մեծացել է

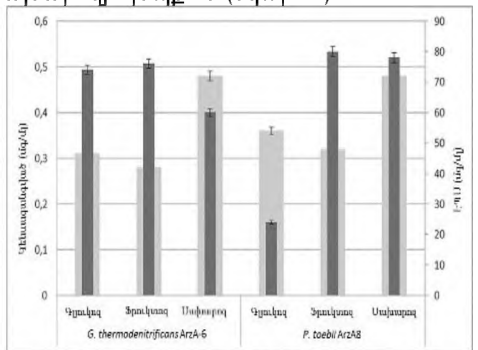
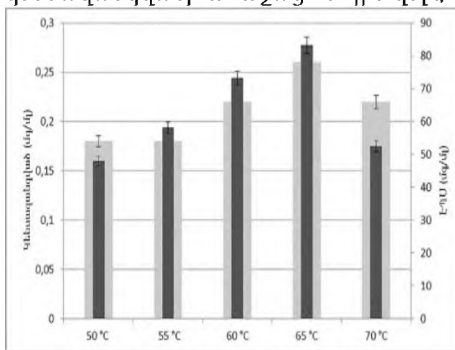
մանրէային կենսազանգվածի աճին զուգընթաց: Մանրէային կենսազանգվածի և ԷՊՍ-ի առավելագույն ելքը դիտվել է 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում աճեցնելիս (նկար 13):



Նկար 12. *G. thermodenitrificans* ArzA6 (ա) և *P. toebii* ArzA8 (բ) շտամների աճի և ԷՊՍ արտադրության ժամանակային կախումը:

(65 °C, pH 7, 240 ս/ր թափահարման պայմաններում սնդամիջավայր Ա-ում աճեցնելիս: Նմուշառումը իրականացվել է 2 ժ պարբերությամբ և որոշվել է բջիջների աճը (գորշ) և ԷՊՍ արտադրությունը (սև)):

Ածխաջրի աղբյուրի ազդեցությունը ուսումնասիրվել է շտամները ինկուբացնելով 65°C ջերմաստիճանային պայմաններում գլյուկոզ, ֆրուկտոզ կամ սախարոզ պարունակող սնդամիջավայրերում: Բոլոր փորձարկված ածխաջրերը նպաստել են մանրէային կենսազանգվածի առաջացմանը, չնայած առավելագույն կենսազանգվածի առաջացում դիտվել է սախարոզի դեպքում (նկար 14):



Նկար 13. Ջերմաստիճանի ազդեցությունը ArzA6 շտամի կենսազանգվածի (գորշ) և ԷՊՍ (սև) արտադրության վրա:

Նկար 14. Ածխաջրերի ազդեցությունը ArzA6 (գորշ) և ArzA8 (սև) շտամների կենսազանգվածի և ԷՊՍ արտադրության վրա:

ԷՊՍ-ի առավելագույն արտադրություն դիտվել է ֆրուկտոզի դեպքում, որն ապահովում է առավելագույն ելք թե ընդհանուր, և թե տեսակարար արտադրության տեսանկյունից: Այսպես, ֆրուկտոզի՝ որպես ածխածնի միակ աղբյուրի յուրացման

դեպքում ԷՊՍ ընդհանուր ելքը *G. thermodenitrificans* ArzA-6 շտամի համար կազմել է 76 մգ/մլ, իսկ տեսակարար արտադրությունը՝ 0.27 գ/գ չոր բջջանքի հաշվարկով: *G. toebii* ArzA-8 շտամի համար ԷՊՍ ընդհանուր արտադրական ելքը կազմել է 80 մգ/մլ, իսկ տեսակարար ելքը՝ 0.22 գ/գ չոր բջջանքի հաշվարկով:

Երկու շտամներից անջատված պոլիմերների քիմիական կառուցվածքները ընդհանուր առմամբ նման են (աղյուսակ 4):

Աղյուսակ 4.

G. thermodenitrificans ArzA-6 և *P. toebii* ArzA-8 շտամներից անջատված ԷՊՍ-ների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները

Ֆիզիկաքիմիական հատկություններ	<i>G. thermodenitrificans</i> ArzA-6	<i>P. toebii</i> ArzA-8
Ածխաջրեր (%)	57	44
Սպիտակուցներ (%)	6,1	7
Ուրոնաթթուներ (%)	5.1	3.3
Մոլեկուլային զանգված (Դա)	5×10^5	6×10^5
Օպտիկական պտույտ	-142,135	-128,645
Ածխաջրերի հարաբերությունը	Man/Gal/Ara/Fru/Glc (1/0.13/0.1/0.06/0.05)	Man/Gal/Glc/Ara (1/0.5/0.2/0.05)

Man, մանոզ; Gal, գալակտոզ; Ara, արաբինոզ; Fru, ֆրուկտոզ; Glc, գլյուկոզ:

G. thermodenitrificans ArzA-6-ից անջատված ԷՊՍ-ում ածխաջրերի պարունակությունը համեմատաբար բարձր է, սպիտակուցների և նուկլեինաթթուների պարունակությունը՝ ցածր, հայտնաբերվում են նաև ուրոնաթթուներ:

ԷՊՍ-ների կառուցվածքի կոմպլեքսային բնույթը հաստատվել է նաև ^1H և ^{13}C միջուկամագնիսային ռեզոնանսային (NMR) վերլուծությամբ: Երկու մոլեկուլների ^1H սպեկտրի անոմերիկ հատվածներում էլ արձանագրվել են *inter alia* չորս հիմնական ազդանշաններ, որոնք հաստատում են մանոզի, գլյուկոզի, գալակտոզի և արաբինոզի առկայությունը:

Իտալիայի, Բուլղարիայի, Չինաստանի և Անտարկտիդայի երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացված *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Aeribacillus* և *Brevibacillus* ցեղերին պատկանող ԷՊՍ արտադրիչ թերմոֆիլ բացիլների համեմատ հայկական երկրաջերմային աղբյուրներից [Nicolaus et al. 2000, Arena et al. 2009, Radchenkova et al. 2013] մեկուսացված *G. thermodenitrificans* ArzA-6 և *P. toebii* strain ArzA-8 շտամների ԷՊՍ-ների արտադրական ելքը ֆրուկտոզի՝ որպես ածխածնի միակ աղբյուրի կիրառման դեպքում չի զիջում և, որոշ դեպքերում, նույնիսկ զգալի գերազանցում է: Թերմոֆիլ բացիլների արտադրած ԷՊՍ-ները համալիր մոլեկուլներ են՝ հետերոպոլիսախարիդներ, որոնք կազմված են մեկից ավելի շաքարային մոնոմերներից՝ առավել հաճախ գլյուկոզից, գալակտոզից և մանոզից: Ուրոնաթթուների պարունակության շնորհիվ ստացված ԷՊՍ-ները օժտված են խոնավածուծ հատկությամբ և հեռանկարային կարող են լինել շպարման պարագանների արտադրություններում:

ՎՈՒՒՆ 7. ԹԵՐՄՈՖԻԼ ԲԱՑԻԼՆԵՐԻ ԹԱՂԱՆԹԱՅԻՆ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ, ԴՐԱՆՑՈՒՄ ՆԵՐԳՐԱՎՎԱԾ ՃԱՐՊԱԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ԵՎ ՈՐԱԿԱԿԱՆ ԿԱԶՄԸ

Մեկուսացված թերմոֆիլ բացիլների ջերմաստիճանով մակածված մեմբրանային լիպիդային կազմի փոփոխությունների բացահայտման նպատակով ուսումնասիրվել են *G. caldxylosilyticus* ArzA-3, *G. thermodenitrificans* ArzA-6, *P. toebii* ArzA-8 և *P. toebii* ArzA-33a շտամներում ընդհանուր լիպիդների պարունակությունը: Ցույց է տրվել, որ աճի օպտիմալ ջերմաստիճանում ինկուբացնելիս հետազոտված մանրէներում լիպիդները կազմել են բջջային զանգվածի 2.0-2.5%: Ֆոսֆոլիպիդները կազմել են բջջամեմբրանի լիպիդային զանգվածի զգալի մասը: *G. thermodenitrificans* ArzA-6 շտամի լիպիդային պրոֆիլում զգալի տարբերություն է նկատվել աճի ցածր, օպտիմալ և բարձր ջերմաստիճաններում աճեցնելիս: Աճեցման ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց մեծացել է գլիկոլիպիդների պարունակությունը, իսկ ամինալիպիդների պարունակությունը, ընդհակառակը՝ նվազել է: Գլիկոլիպիդներ չեն հայտնաբերվել աճի նվազագույն ջերմաստիճանում աճեցնելիս (45°C): Աճեցման ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց նվազել է ամինալիպիդների, մասամբ նաև՝ ֆոսֆոլիպիդների պարունակությունը, սակայն աճել է գլիկոլիպիդների պարունակությունը:

Բոլոր ուսումնասիրված շտամներում գերակշռել են իզո- և անթեիզո ճյուղավորված շղթաներով ճարպաթթուները (աղյուսակ 5): Դրանց քանակապես հաջորդել է C16:0 ճարպաթթուն: C15:0 և C17:0 ճարպաթթուները ներկայացված են եղել փոքր քանակներով: Ընդհանուր առմամբ աճի օպտիմալ ջերմաստիճանում գերակշռել են ճյուղավորված ճարպաթթուները՝ կազմելով ընդհանուր ճարպաթթուների 80-89%, մինչդեռ ուղիղ շղթաներով ճարպաթթուները՝ մինորային բաղադրիչներ են (կազմում են 6-8%): Իզո-ճյուղավորված ճարպաթթուներն ամենագերակշռող բաղադրիչներն են եղել բոլոր հետազոտված շտամներում և զգալի գերազանցել են անթեիզո-ճյուղավորված ճարպաթթուներին: Իզո-ճյուղավորված ճարպաթթուները ունեն բարձր հալման ջերմաստիճաններ, մինչդեռ անթեիզո-ճյուղավորված ճարպաթթուները բնութագրվում են համեմատաբար ցածր հալման ջերմաստիճաններով: Ուսումնասիրված թերմոֆիլ մանրէները պարունակել են ավելի փոքր քանակությամբ ցածր հալման ջերմաստիճաններով ճարպաթթուներ (անթեիզո-C15:0, անթեիզո- C17:0) և ավելի մեծ քանակությամբ բարձր հալման ջերմաստիճանով ճարպաթթուներ (իզո-C15:0, իզո-C17:0): Չհագեցած ճարպաթթուներ չեն հայտնաբերվել: *G. thermodenitrificans* ArzA-6 շտամում աճի ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց մակածվել է երկար, իսկ ցածր ջերմաստիճաններում՝ կարճ ածխածնային շղթաներով ճարպաթթուների սինթեզը:

Ցույց է տրվել իզո-C17:0 ճարպաթթուների գերակշռումը բարձր ջերմաստիճաններում աճեցնելիս, մինչդեռ ցածր ջերմաստիճաններում՝ գերակշռել են իզո-C15:0 ճարպաթթուները, համապատասխանաբար, իզո-C15:0/իզո-C17:0 հարաբերությունը նվազել է ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց:

Աղյուսակ 5.

Ուսումնասիրված թերմոֆիլ բացիլների ճարպաթթուների որակական և քնակական կազմը (%)*

Շտամներ	T°C	Ընդհանուր				Ճարպաթթուներ													
		Լիպոլներ [†]	հ-ճյուղ	սի-ճյուղ	n-ուղիղ	Ք15:0/Ք15	Ք15/Ք17	nC14:0	i+C14:0	Ք15:0	nC15:0	σC15:0	Ք16:0	nC16:0	σC16:0	Ք17:0	nC17:0	σC17:0	nC18:0
<i>G. caldoxylosilyticus</i> ArzA-3	65	2.6	83	6	10	24.6	1.01	0.5	1.1	39.4	1.7	1.6	6.3	7.4	0.3	37.2	h	3.8	-
<i>G. toebii</i> ArzA-8.3	65	2.4	81	6	12	23.9	0.94	-	0.5	35.9	1.8	1.5	7.1	8.9	h	37.9	1.1	4.6	h
<i>G. toebii</i> ArzA-33a	65	2.7	80	6	13	21.9	0.93	-	h	35.1	1.8	1.6	6.9	8.2	h	37.8	1.1	4.7	2.1
<i>G. thermodenitrificans</i> ArzA-6	70	2.0	82	7	10		0.99	h	0.5	36.6	1.6	1.2	7.8	6.7	h	36.9	1.4	6.4	h
	65	2.6	83	8	9	37.4	1.17	0.2	h	41.1	1.4	1.1	7.0	6.8	h	34.9	1.0	6.4	-
	60	2.3	82	10	7		1.23	0.6	h	41.0	1.3	1.9	6.9	6.6	1.1	33.2	h	6.5	-
	55	1.4	80	10	9		1.35	1.0	-	42.2	1.1	3.1	7.0	6.1	1.0	31.2	h	6.3	-
	45	1.1	79	11	9		1.49	1.2	-	42.8	0.8	3.8	7.2	5.8	1.3	28.7	h	6.0	-
[‡] <i>G. caldoxylosilyticus</i> DSM 12041 [†]	65	-	90	4	4	51.5	2.1	-	-	56.7	1.7	1.1	6.8	2.2	-	26.7	-	2.5	-
[‡] <i>G. toebii</i> SK-1 [†]	60	-	86	-	-	-	0.97	-	-	34.03	-	-	17.46	-	-	34.86	-	-	-
[‡] <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 [†]	65	-	78	8	13	27.8	1.04	0.4	0.38	35.64	1.79	1.28	8.07	6.77	-	34.23	1.61	6.4	0.55

*Ներկայացված են ամենաքիչը երկու չափումների միջինացված արժեքները:

[†]հաշվարկված է ըստ բջջի չոր զանգվածի:

h, հետքային; -, չհայտնաբերված:

Շա ապփումներ: i, էփո ճյուղավորված; si, անթեիփո ճյուղավորված; n, ուղիղ-երկար ճյուղավորված; C14:0-C18:0, հագեցած ուղիղ շղթաներ:

[‡]Տվյալների աղբյուրը՝ [Fortina et al. 2001]; [‡]Տվյալների աղբյուրը՝ [Sung et al. 2002]; [‡]Տվյալների աղբյուրները՝ [Manachini et al. 2000, Nazina et al. 2001]:

Ջերմաստիճանի բարձրացումը հանգեցնել է նաև կարճ ուղիղ կամ չճյուղավորված շղթաներով C14:0 ճարպաթթուների քանակի նվազմանը և համեմատաբար երկար չճյուղավորված շղթաներով C15:0-C17:0 ճարպաթթուների ավելացմանը: Չնայած հետքային քանակություններին՝ C18:0 ճարպաթթուն հայտնաբերվել է միայն բարձր ջերմաստիճանային պայմաններում աճեցնելիս:

ԳԼՈՒԽ 8. ԹԵՐՄՈՖԻԼ ԲԱՑԻԼՆԵՐԻ Փ-ՌՆԹ-ՆԵՐԻ ՁԵՎԱՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՐԱԿԱԿԱՆ ԵՎ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ԿԱԶՄԸ

Վերլուծվել են *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Paragebacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus Ureibacillus* և *Paenibacillus* ցեղի 13 տեսակների օբլիգատ ($T_{\text{օպտ}} \geq 60^\circ\text{C}$) և չափավոր ($T_{\text{օպտ}} \leq 50^\circ\text{C}$) թերմոֆիլ աերոբ էնդոսպոր առաջացնող բակտերիական շտամների հետտրանսկրիպցիոն փ-ՌՆԹ-ների ձևափոխությունների որակական և քանակական կազմը աճի բարելավված պայմաններում: Հեղուկային քրոմատագրաֆիական մաս-սպեկտրացուցական վերլուծությունների արդյունքում ստացված տվյալների համաձայն փ-ՌՆԹ-ների ձևափոխությունների քանակական և որակական կազմը տեսակից կախված կտրուկ տարբերվել է (աղյուսակ 6):

Որոշ ձևափոխությունների բարձր մակարդակը բնութագրիչ առանձնահատկություն է բացիլների համար: Այսպես, *Geobacillus* ցեղի ներկայացուցիչներում հարաբերականորեն շատ է տարածված փ-ՌՆԹ-ի m^1G ձևափոխությունը, մինչդեռ *Anoxybacillus* ցեղի ներկայացուցիչներում առավել տարածված է Q ձևափոխությունը: Gm ձևափոխությունը հիմնականում առկա է *Geobacillus*, *Parageobacillus* և *Anoxybacillus* ցեղերի ներկայացուցիչներում: Մասնավորապես, *Geobacillus* ցեղի ներկայացուցիչները բնութագրվել են փ-ՌՆԹ-ների Gm ձևափոխության բարձր մակարդակով: Փ-ՌՆԹ-ների i^6A և m^5C ձևափոխությունների համեմատաբար մեծ քանակություն հայտնաբերվել է, համապատասխանաբար, *Paenibacillus* և *Ureibacillus* տեսակներում: m^5C ձևափոխությունը բացակայել է միայն *B. psychrosaccharolyticus* AkhA-14A շտամում: Փ-ՌՆԹ-ների m^1A ձևափոխության բարձր մակարդակ է հայտնաբերվել *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus* և *Bacillus* ցեղերի տեսակներում, մինչդեռ այն *Ureibacillus* և *Brevibacillus* ցեղերի տեսակներում ներկայացված է քիչ քանակություններով: Cm ձևափոխության մեծ քանակություն դիտվել է միայն *U. thermosphaericus* B-119 շտամում:

Ընդհանուր առմամբ բոլոր բացիլներում փ-ՌՆԹ-ների m^6A , i^6A , m^6_2A , m^5C և Cm ձևափոխությունները ցածր արժեքներով են ներկայացված (≤ 7.59): Q ձևափոխության ցածր մակարդակ և m^1G ձևափոխության իսպառ բացակայություն է նկատվել *Brevibacillus* ցեղին պատկանող տեսակում: Ավելին, m^1G և ms^2i^6A ձևափոխությունները ներկայացված են բոլոր հետազոտված շտամներում, բացառությամբ *Brevibacillus* և *Ureibacillus* տեսակների: Միայն *U. thermosphaericus* B-119 շտամում են հայտնաբերվել Am և m^2_2G ձևափոխությունները:

Փ-ՌՆԹ-ների m^6_2A և m^5C ձևափոխությունները առավել շատ տարածված են *Ureibacillus* և *Brevibacillus* տեսակներում: Հաստատվել է m^2A և m^7G ձևափոխությունների լայն տարածվածությունը ուսումնասիրված բացիլներում:

Աղյուսակ 6.

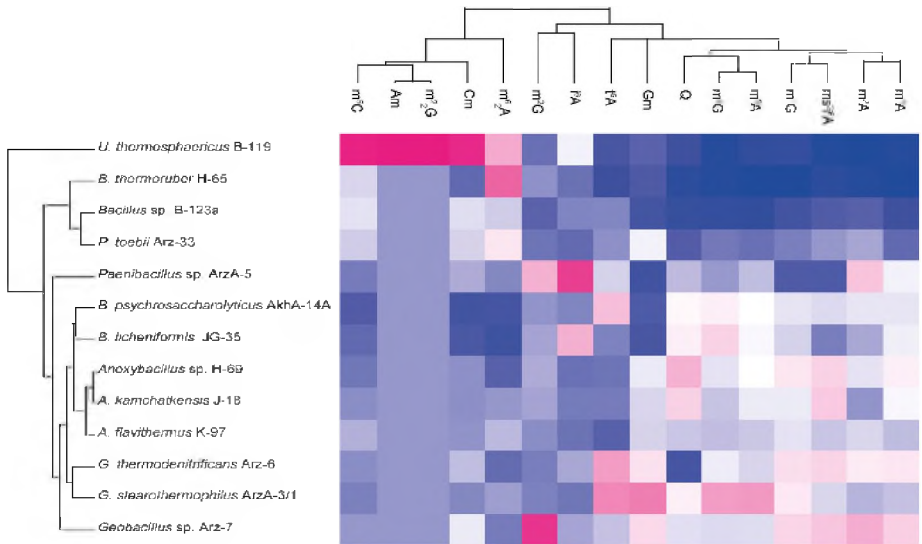
Ուսումնասիրված թերմոֆիլ բացիլներում փ-Ռ-ԼԹ-ների ձևափոխությունների որակական և քանակական կազմը աճի օպտիմում ջերմաստիճանում

Բացիլների շտամները	Փ-Ռ-ԼԹ-ների ձևափոխությունների մակարդակները*															
	m ¹ A	m ⁶ A	m ⁶ 2A	m ² A	1 ⁶ A	1 ⁶ A	ms ² 1 ⁶ A	m ¹ G	m ² G	m ⁷ G	m ² 2G	Q	m ² C	Am	Cm	Gm
<i>A. flavithermus</i> K-97	15.67	1.23	1.20	281.08	5.66	0.23	7.50	13.60	5.52	28.90	0.00	13.30	1.55	0.00	1.58	26.27
<i>A. kamchatkensis</i> J-18	19.34	1.39	0.91	215.72	6.39	0.37	12.07	13.94	6.82	29.46	0.00	19.76	0.94	0.00	1.53	26.74
<i>Anoxybacillus</i> sp. H-69	20.79	1.49	0.46	293.94	6.21	0.20	11.69	16.48	7.50	32.74	0.00	21.74	0.56	0.00	1.54	29.99
<i>G. stearothermophilus</i> ArzA-3/1	16.07	1.97	0.97	247.34	12.88	0.30	8.25	16.41	4.72	46.41	0.00	17.82	0.71	0.00	1.45	55.13
<i>G. thermodenitrificans</i> Arz-6	21.34	1.29	0.56	342.97	12.20	1.04	11.59	16.88	4.53	33.93	0.00	5.55	0.94	0.00	2.00	38.55
<i>Geobacillus</i> sp. Arz-7	22.78	1.33	0.71	406.71	8.10	1.00	12.26	17.39	27.80	31.97	0.00	14.90	1.07	0.00	2.47	39.48
<i>P. toebii</i> Arz-33	10.79	0.84	2.01	231.17	6.86	0.09	5.70	8.30	3.88	21.93	0.00	6.76	2.06	0.00	2.22	31.37
<i>B. licheniformis</i> JG-35	18.83	1.46	0.15	231.83	6.56	3.85	4.72	12.60	6.82	40.50	0.00	17.90	0.29	0.00	0.87	4.43
<i>B. psychrosaccharolyticus</i> AkhA-14A	18.23	1.48	0.26	296.35	11.35	0.53	8.39	13.62	5.94	37.28	0.00	17.31	0.00	0.00	0.69	6.31
<i>Bacillus</i> sp. B-123a	7.56	0.49	1.37	162.80	6.64	0.50	3.25	4.72	2.70	13.66	0.00	3.91	2.43	0.00	2.35	3.29
<i>Paenibacillus</i> sp. ArzA-5	19.03	1.18	0.79	383.03	8.51	5.96	3.03	6.13	18.16	25.18	0.00	12.57	0.64	0.00	1.83	2.36
<i>B. thermoruber</i> H-65	2.66	0.24	3.18	78.25	4.55	0.22	0.76	0.00	5.68	10.43	0.00	2.78	2.21	0.00	1.15	6.48
<i>U. thermosphaericus</i> B-119	5.00	0.48	2.53	37.59	5.08	2.31	0.00	3.62	3.61	10.75	1.47	4.49	7.59	3.62	5.19	8.34

* Փ-Ռ-ԼԹ-ների ձևափոխությունները քանակապես արտահայտվել են ըստ ձևափոխությունների քանակների (մոլ) և A եուկլեոզիդների քանակների (մոլ) հարաբերությամբ 1000 փ-Ռ-ԼԹ-ների կտրվածքով:

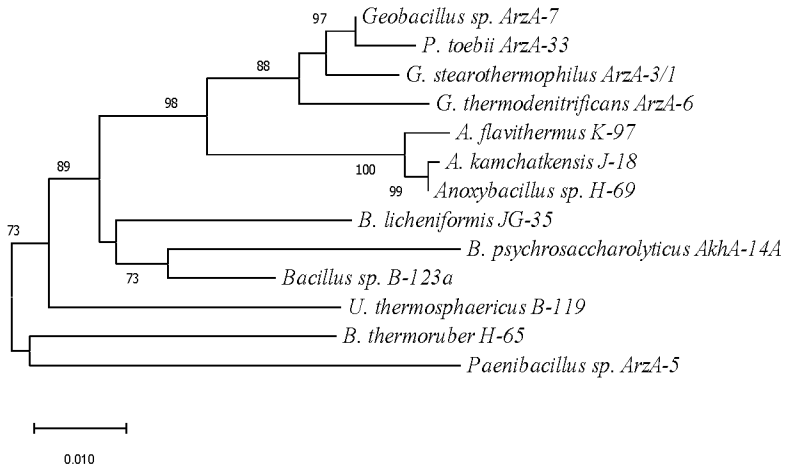
Այլ ձևափոխություններ, օրինակ՝ m¹A, Q և Gm ևս ներկայացված են համեմատաբար բարձր մակարդակով և մի շարք այլ ձևափոխությունների հետ մեկտեղ (t⁶A, m⁶A, i⁶A, m⁶₂A, m²G, Cm), հայտնաբերվել են ուսումնասիրված բոլոր յոթ ցեղերի ներկայացուցիչներում: Այսպիսով, եզրակացրել ենք, որ թվարկված ձևափոխությունները, որոնք բոլոր հետազոտված շտամներում հանդիպում են մեծ քանակներով, պատկանում են հնագույն փ-Ռ-ԼԹ ձևափոխություններին, որոնք, հավանաբար, ձևավորվել են էնդոսպոր առաջացնող բակտերիաների զարգացման վաղ փուլերում: Փ-Ռ-ԼԹ-ների m¹A, m⁶A, m¹G, t⁶A, i⁶A, ms²i⁶A, Q, m²G, Gm, m²A և m⁷G ձևափոխությունների բարձր պարունակությունը առավել բնութագրական են օբլիգատ թերմոֆիլ շտամներին: Ի հակադրություն այս դիտարկմանը, փ-Ռ-ԼԹ-ների m¹A, m⁶A, m¹G, t⁶A, ms²i⁶A, Q, m⁶₂A, m²G, Cm, Gm, m²A m⁷G և m⁵C ձևափոխությունների ցածր պարունակություն հայտնաբերվում են միայն չափավոր թերմոֆիլ բացիլներում (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Ureibacillus* և *Paenibacillus*):

Տարբեր բացիլների փ-Ռ-ԼԹ-ների ձևափոխությունների քանակական արժեքները ենթարկվել են համեմատական վերլուծության՝ բացահայտելու համար փ-Ռ-ԼԹ-ների ձևափոխությունների փոփոխման օրինաչափությունները և ֆիլոգենետիկական հիմքերը: Այդ նպատակով համեմատվել են հետազոտված շտամների ֆիլոգենետիկական ծառը և փ-Ռ-ԼԹ-ների ձևափոխությունների հիերարխիային կլաստերացմամբ ստացված դիագրամը (նկար 15 և 16):



Նկար 15. Տեսակների և փ-Ռ-ԼԹ-ների ձևափոխությունների հիերարխիային կլաստերացման դիագրամ:

Տեսակների և փ-Ռ-ԼԹ-ների ձևափոխությունների համար էվկլիդեսյան հեռավորությունը հաշվարկվել է՝ հիմնված նորմալիզացված փ-Ռ-ԼԹ ձևափոխությունների Z-բազմությունների վրա: Z-բազմության արժեքները տատանվում են 1.91-ից (մուգ կապույտից) մինչև 3.33 (վառ բուրգազույն):



Նկար 16. *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Paragebacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Ureibacillus* և *Paenibacillus* ցեղերին պատկանող շտամների միջև ազգակցական կապն արտացոլող ֆիլոգենետիկական ծառը՝ հիմնված 16S r-ՌՆԹ-ի գեների վերլուծության վրա:

Տոկոսային արժեքները ($\geq 73\%$), որոնց հիման վրա ազգակից տեսակները կլաստրացվել են միասին bootstrap վերլուծությամբ (1000 կրկնություններով), ներկայացված են ծառի ճյուղերում: Մասշտաբային սանդղակը՝ 0.01:

Ըստ հիերարխետային դիագրամի *U. thermosphaericus* B-119 շտամը հստակ տարբերվում է այլ բացիլներից: Առկա է նաև հստակ տարբերություն օբլիգատ թերմոֆիլ (*Anoxybacillus* *Geobacillus* և *Paragebacillus*) և չափավոր թերմոֆիլ կամ թերմոտոլերանտ (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Ureibacillus* և *Paenibacillus*) բացիլների միջև: Օբլիգատ թերմոֆիլ բացիլների կլաստրացումը ըստ փ-ՌՆԹ-ների ձևափոխությունների, ցույց է տալիս նմանություն ֆիլոգենետիկական խմբավորմանը: Բացառություն է չափավոր թերմոֆիլ *B. thermoruber* H-65 շտամը, որն ըստ փ-ՌՆԹ-ների ձևափոխությունների խմբավորվել է օբլիգատ թերմոֆիլների հետ, այլ ոչ թե ֆիլոգենետիկորեն ազգակից չափավոր թերմոֆիլ *Paenibacillus* ցեղի տեսակների հետ՝ այդպիսով ընդգծելով իր երկիմաստ բնույթը: Այնուամենայնիվ, մոտ ազգակից ցեղերը՝ *Bacillus* և *Paenibacillus* ըստ այդ ցուցանիշի հստակ տարբերակվել են:

Ստացված արդյունքները հիմք են տալիս առաջ քաշելու օբլիգատ և չափավոր թերմոֆիլ բացիլների տարբերակման նոր վարկած: Չնայած թե՛ օբլիգատ, թե՛ չափավոր թերմոֆիլ բացիլները պարունակել են Gm, m¹G և ms²i⁶A ձևափոխություններ, դրանց մեծ քանակություններ (հատկապես Gm և ms²i⁶A) հայտնաբերվել են օբլիգատ թերմոֆիլներում (*Geobacillus*, *Paragebacillus* և *Anoxybacillus*): i⁶A ձևափոխության մեծ քանակներ հայտնաբերվել են չափավոր թերմոֆիլներում:

ԳԻՏԱԳՈՐԾՆԱԿԱՆ ԵՐԱՇԽԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ ԿԱՄ ԱՌԱՋԱՐԿՆԵՐ

1. Ստեղծված թերմոֆիլ մանրէների կուլտուրաների արժեքավոր հավաքածուն երաշխավորվում է որպես նոր բարձրակտիվ միացությունների և ջերմակայուն ֆերմենտների ակտիվ արտադրիչների ընտրության շտեմարան:
2. Հիդրոլազային ակտիվությամբ օժտված թերմոֆիլ մանրէների կուլտուրաները առաջարկվում են կիրառել կենսապոլիմերների ֆերմենտային քայքայման փուլեր ներառող արտադրական գործընթացներում:
3. *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 և *Parageobacillus toebii* ArzA-8 շտամները առաջարկվում են որպես համեմատաբար բարձր մոլեկուլային զանգվածներով հետերոպոլիսախարիդային էՊՍ-ի արտադրության հեռանկարային շտամ-արտադրիչներ:
4. Փ-ՌՆԹ-ների որոշ ձևափոխությունների քանակական և որակական վերլուծությունների հիման վրա առաջարկվել է նոր վարկած օբլիգատ և չափավոր թերմոֆիլ բացիլների տարբերակման համար:

ԵՋՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Ցույց է տրվել, որ Հայաստանի և Լեռնային Ղարաբաղի երկրաջերմային աղբյուրների պրոկարիոտային միկրոբիոտան հիմնականում ներկայացված է Proteobacteria, Firmicutes, Nitrospirae, Deinococcus-Thermus բակտերիական ու Euryarchaeota, Crenarchaeota, Thaumarchaeota արքեային ֆիլումներին պատկանող ֆիլոտիպերով, որոնց մեծամասնությունը Գենային բանկում <97% նմանությամբ նույնականացվում են չկուլտիվացվող մանրէներին՝ փաստելով այդ աղբյուրների նոր և ինքնատիպ տեսակներով գաղութացված լինելը:
2. Բացահայտվել է կենսածին տարրերի կենսատերկրաքիմիական շրջապտույտն ապահովող առանձին մանրէների դերը, և դրանց բազմազանության ու երկրաջերմային աղբյուրի ջերմաստիճանի հակադարձ կապը:
3. Մեկուսացվել և պոլիֆազային մոտեցմամբ նույնականացվել են *Bacillus*, *Geobacillus*, *Parageobacillus*, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aeribacillus*, *Ureibacillus*, *Thermoactinomyces*, *Thermus*, *Methylocaldum*, *Arcobacter* և *Methanoculleus* ցեղերի 28 տեսակներին պատկանող թերմոֆիլ մանրէների 114 կուլտուրաներ, որոնց հիմքով ստեղծվել է թերմոֆիլ մանրէների կուլտուրաների արժեքավոր հավաքածու:
4. Հատնաբերվել է *Anoxybacillus* ցեղին պատկանող թերմոֆիլ բակտերիայի նոր տեսակ, որն անվանակոչվել է *Anoxybacillus karvacharensis* sp. nov. (=DSM 106524^T =KCTC 15807^T), և *Methylocaldum* ցեղին պատկանող էվրիթերմ արեոբ մեթանատրոֆ բակտերիայի նոր տեսակ:
5. Ցույց է տրվել, որ *Nitrospira calida* և *Nitrospira moscoviensis* տեսակներին $\geq 97\%$ նմանությամբ բակտերիաներ պարունակող նիտրիտօքսիդացնող բակտերիաների կուտակիչ կուլտուրայում 60°C ջերմաստիճանային պայմաններում NO₂⁻-ը օքսիդանում է 7.53±1.20 ֆմոլ/բջիջ/ժ արագությամբ:

6. Ցույց է տրվել, որ մեկուսացված թերմոֆիլ բացիլային շտամների 71%-ը ջերմակայուն պրոտեազների, լիպազների կամ ամիլազների, իսկ դրանց 28.6%-ը՝ միաժամանակ այդ հիդրոլազների ակտիվ արտադրիչներ են:
7. *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 և *Paragebacillus toebii* ArzA-8 շտամների համար ածխածնի միակ աղբյուր ֆրուկտոզի կիրառմամբ 65°C և pH 7.0 աճեցման պայմաններում որպես հիմնական մոնոմեր մանուզ պարունակող և $5-6 \times 10^5$ Դա մոլեկուլային զանգվածներով հետերոպոլիսախարիդային ԷՊՍ-ների արտադրական ելքը կազմել է, համապատասխանաբար, 0.27 գ/գ և 0.22 գ/գ չոր բջջային զանգվածի հաշվարկով:
8. Հաստատվել է, որ թերմոֆիլ բացիլներում աճի ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց գլիկոլիպիդների, երկար ածխածնային շղթաներով (C15-C17) չճյուղավորված և իզո-ճյուղավորված հագեցած ճարպաթթուների քանակը ավելանում է, իսկ ամինալիպիդների, կարճ ածխածնային շղթաներով (C14:0) չճյուղավորված և անթեիզո-ճյուղավորված ճարպաթթուների քանակը, ինչպես նաև իզո-C15:0/իզո-C17:0 հարաբերությունը՝ նվազում է:
9. Ցույց է տրվել օբլիգատ թերմոֆիլ բացիլներում ψ -ՌՆԹ-ի Gm և ms^2i^6A , իսկ չափավոր թերմոֆիլ բացիլներում՝ i^6A ձևափոխությունների լայն տարածվածությունը, ինչը հաստատում է օբլիգատ և չափավոր թերմոֆիլ բացիլների տարբերակման համար առաջարկված վարկածը:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՑՈՒՑԱԿ (ԸՆՏՐԱՆԻ)

1. **Паносян О.А.** Термофильные бациллы термальных источников Армении. Биолог. журн. Армении, 2008, 60 (3):19-24.
2. **Panosyan H., Traube F.R., Brandmayr C., Wagner M., Carell T.** tRNA modiication proiles in obligate and moderate thermophilic bacilli. *Extremophiles*, 2022, 26(1):11.
3. **Panosyan H., Margaryan A., Birkeland N.K.** *Noxybacillus karvacharensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from the Karvachar geothermal spring in Nagorno-Karabakh. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2021, 71(10):005035.
4. **Saghatelyan A., Panosyan H., Trchounian A., Birkeland N.K.** Characteristics of DNA polymerase I from an extreme thermophile, *Thermus scotoductus* strain K1 *MicrobiologyOpen*, 2021, 10e1149.
5. **Saghatelyan A., Margaryan A., Panosyan H., Birkeland N.K.** Microbial Diversity of Terrestrial Geothermal Springs in Armenia and Nagorno-Karabakh: A Review. *Microorganisms*, 2021, 9(7):1473.
6. **Saghatelyan A., Panosyan H., Birkeland N.K.** The Genus *Thermus*: A Brief History of Cosmopolitan Extreme Thermophiles: Diversity, Distribution, Biotechnological Potential and Applications. In: Egamberdieva D., Birkeland N.K., Li W.J., Panosyan H. (eds) *Microbial Communities and their Interactions in the Extreme Environment. Microorganisms for Sustainability*, Springer, Singapore, 2021, 32:141-175.

7. **Panosyan H.**, Margaryan A. Extremophiles Thriving in Extreme Ecosystems of Armenia. In: Pandey A., Sharma A. (eds) Extreme Environments Unique Ecosystems – Amazing Microbes, CRC Press. Taylor & Francis Group LLC, 2021, 234-251.
8. **Panosyan H., Margaryan A., Birkeland N.K. Geothermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh: potential sources of hydrolase-producing thermophilic bacilli.** *Extremophiles*, 2020, 24(4):519-536.
9. **Panosyan H.** Bacterial profiles of Karvachar hot spring identified by combination of different molecular approaches. Proceedings of the Yerevan State University, Chemistry and Biology, 2020, 54 (2):147-153.
10. **Panosyan H.** Thermophilic and Halophilic Prokaryotes Isolated from Extreme Environments of Armenia and Their Biotechnological Potential. In: Singh R., Manchanda G., Murya I., Wei Y. (eds) Microbial Versatility in Varied Environments, Springer, Singapore, 2020, 13-34.
11. **Panosyan H.** Diversity and biotechnological potential of thermophiles and halophiles isolated from Armenian extreme ecosystems. Abstract Book of "Microbes and their viruses: Ecology, diversity, applications", Tbilisi, Georgia, 2019, 38.
12. Panosyan H., Trchounian A. Polar lipid pattern and fatty acid composition of geobacilli and their temperature induced changes. Reports of NAS of Armenia, 2019, 119 (1):86-94.
13. **Panosyan H. Thermoactinomycetes isolated from geothermal springs in Armenia capable of producing extracellular hydrolases.** *Environmental Sustainability*, 2019, 2:219-226.
14. Arora N.K., Panosyan H. Extremophiles: applications and roles in environmental sustainability. *Environmental Sustainability*, 2019, 2:217-218.
15. **Panosyan H., Di Donato P., Poli A., Nicolaus B. Production and characterization of exopolysaccharides by *Geobacillus thermodenitrificans* Arza-6 and *Geobacillus toebii* Arza-8 strains isolated from an Armenian geothermal spring.** *Extremophiles*, 2018, 22(5):725-737.
16. **Panosyan H., Margaryan A., Poghosyan L., Saghatelyan A., Gabashvili E., Jaiani E., Birkeland N.K.** Microbial Diversity of Terrestrial Geothermal Springs in Lesser Caucasus. In: Egamberdieva D., Birkeland N.K., Panosyan H., Li W.J. (eds) Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications. Microorganisms for Sustainability, Springer, Singapore, 2018, 8:81-117.
17. Margaryan A., Shahinyan G., Hovhannisyanyan P., **Panosyan H.**, Birkeland N.K., Trchounian A. *Geobacillus* and *Anoxybacillus* spp. from Terrestrial Geothermal Springs Worldwide: Diversity and Biotechnological Applications. In: Egamberdieva D., Birkeland N.K., Panosyan H., Li W.J. (eds) Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications. Microorganisms for Sustainability, Springer, Singapore, 2018, 8:119-166.
18. **Panosyan H., Azaryan A., Birkeland N.K.** Microbiome structure of Karvachar (Nagorno-Karabakh) geothermal spring. Abstract book of 17th International Symposium on Microbial Ecology ISME17, Leipzig, Germany, 2018, 748.
19. Hovhannisyanyan P., **Panosyan H.**, Trchounian A., Birkeland N.K. Heterologous expression of alpha-amylase and alpha-glucosidase genes from the thermophile, *Anoxybacillus* sp. K1. Abstract book of 12th International Congress of Extremophiles, Ischia, Naples, Italy, 2018, P 61.
20. **Shahinyan G., Margaryan A., Panosyan H., Trchounian A. Identification and sequence analyses of novel lipase encoding novel thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs.** *BMC Microbiol*, 2017, 17(1):103.
21. **Panosyan H.H.** Thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs and their potential for production of hydrolytic enzymes. *Int J biotech & bioeng*, 2017, 3(8):239-244.

22. **Panosyan H.H.**, Margaryan A.A., Trchounian A.H. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles of the partial 16S rRNA genes defined bacterial population inhabiting in Armenian geothermal springs. *Biolog J Armenia*, 2017, 69(3):102-109.
23. **Panosyan H.H.** Phylogenetic diversity of thermophilic bacilli isolated from geothermal springs of Nagorno Karabakh. *Proceedings of the Yerevan State University, Chemistry and Biology*, 2017, 51 (3):179–185.
24. **Panosyan H.** Geothermal springs as a source of thermophiles with biotechnological potential. *Abstract Book of World Congress & Expo on Biotechnology and Bioengineering, BioCore Exploring Scientific Community, Dubai, UAE, 2017*, P 63.
25. **Panosyan H.** Microbial diversity of Armenian geothermal springs and its biotechnological potential. *Abstract Book of International conference on microbial Biotechnology “Microcon2017 – Microbes for the sustainable development” & “Punjab start-up fest”*, Chandigarh, India, 2017, 14-15.
26. Hovhannisyan P., Turabyan A., **Panosyan H.**, Trchounian A. Thermostable amylase producing bacilli isolated from Armenian geothermal springs. *Biolog J Armenia*, 2016, 68:68-73.
27. **Panosyan H.** Thermophiles harbored in Armenian geothermal springs and their biotechnological potential. *Abstract Book of International conference Diversity and Biotechnology of Extremophiles, Sofia, Bulgaria, 2016*, 7.
28. **Panosyan H.** Thermophilic bacilli of Armenian geothermal springs. *Collection of scientific articles of GSU*, 2015, 2:79-83.
29. Shahinyan G.S., **Panosyan H.**, Trchounian A.H. Characterization of lipase producing thermophilic bacilli isolated from Armenian geothermal springs. *Reports of NAS of Armenia*, 2015, 115 (1):59-68.
30. Shahinyan G.S., Margaryan A.A., **Panosyan H.**, Trchounian A.H. Isolation and characterization of lipase-producing thermophilic bacilli from geothermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh. *Biolog J Armenia*, 2015, 67 (2):6-15.
31. Islam T., Larsen Ø., Torsvik V., Øvreås L., **Panosyan H.**, Murrell J.C., Birkeland N.K., Bodrossy L. Novel Methanotrophs of the Family *Methylococcaceae* from Different Geographical Regions and Habitats. *Microorganisms*, 2015, 3 (3):484-99.
32. Saghatelian A., Poghosyan L., **Panosyan H.**, Birkeland N.K. Draft Genome Sequence of *Thermus scotoductus* Strain K1, Isolated from a Geothermal Spring in Karvachar, Nagorno Karabakh. *Genome Announc.* 2015, 3(6):e01346-15.
33. **Panosyan H.**, Saghatelian A., Margaryan A., Birkeland N.K., Trchounian A. Diversity of thermophiles in Armenian geothermal springs. 13th International Meeting Thermophiles 2015, Santiago, Chile, 149.
34. **Panosyan H.**, Birkeland N.K. Microbial diversity in an Armenian geothermal spring assessed by molecular and culture-based methods. *J Basic Microbiol*, 2014, 54 (11):1240-50.
35. **Panosyan H.**, Anzelmo G., Nicolau B. Production and characterization of exopolysaccharides synthesized by geobacilli isolated from an Armenian geothermal spring. *FEBS Journal* 281 (Suppl 1), Abstracts of the 39th FEBS Congress, Paris, France, 2014, 667.
36. **Panosyan H.**, Wagner M., Brandmayr C., Carell T. Differentiation of bacilli on genera level based on tRNA modification profiles. *FEBS Journal* 281 (Suppl 1), Abstracts of the 39th FEBS Congress, Paris, France, 2014, 655-656.
37. **Panosyan H.** Thermophiles harbored in Armenian geothermal springs. *Abstracts Book of International Scientific Workshop on “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology”*, Yerevan, Armenia, YSU press, 2014, 32.

38. **Panosyan H.**, Poghosyan L., Birkeland N.K. Bacterial diversity of geothermal springs of Armenia and Nagorno-Karabakh. Book of Abstracts 10th International Congress on Extremophiles, Extremophiles 2014, Saint Petersburg, Russia, 2014, 143.
39. **Panosyan H.** Moderate thermophilic paenibacilli strain isolated from Arzakan (Armenia) geothermal spring. Collection of scientific articles of GSU, 2014, 1:94-101.
40. Hedlund B.P., Dodsworth J.A., Cole J.K., **Panosyan H.H.** An integrated study reveals diverse methanogens, Thaumarchaeota, and yet-uncultivated archaeal lineages in Armenian hot springs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013. 104:71–82.
41. Edwards T.A., Calica N.A., Huang D.A., Manoharan N., Hou W., Huang L., **Panosyan H.**, Dong H., Hedlund B.P. Cultivation and characterization of thermophilic *Nitrospira* species from geothermal springs in the US Great Basin, China, and Armenia. *FEMS Microbiol Ecol*, 2013, 85 (2):283-92.
42. **Panosyan H.** Distribution of *Geobacillus* species in Arzakan (Armenia) geothermal mineral spring. *Transactions of GSU*, 2013, 15:95-98.
43. **Panosyan H.**, Birkeland N.K. Phylogenetic diversity of endospore-forming thermophilic bacilli isolated from geothermal springs in Armenia. Abstract book of 12th International Meeting Thermophiles 2013, Regensburg, Germany, 2013, 86.
44. **Panosyan H.H.**, Dodsworth J.A., Cole J.K., Hedlund B.P. Archaeal diversity in Armenian geothermal springs detected by molecular and culture-based approaches. Abstract book of 12th International Meeting Thermophiles 2013, Regensburg, Germany, 2013, 85.
45. **Panosyan H.H.** Phylogenetic diversity based on 16S rRNA gene sequence analysis of aerobic thermophilic endospore-forming bacteria isolated from geothermal springs in Armenia. *Biolog. J. Armenia*, 2010, 62 (4):73-80.
46. **Panosyan H.**, Birkeland N.K. Study of thermophilic microbial diversity in a hot mineral spring of Armenia using molecular and culture-based methods. Book of Abstracts. 8th International Congress on Extremophiles, Ponta Delgada, Azores, Portugal, 2010, 204.
47. **Panosyan H.** Microbial Community in Warm and Hot Springs of Armenia. 3rd Congress of European Microbiologists FEMS2009 “Microbes and Man-interdependence and future challenges”, Gothenburg, Sweden, 2009, pn 261.
48. **Panosyan H.** Distribution of Thermophilic Bacilli in Warm and Hot Springs of Armenia. Abstract Book. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Microbes: “Then, now and hereafter” IUMS2008. Istanbul, Turkey, 2008, 344-345.
49. Panosyan H., Tozalakyan P.V., Popov Yu.G. Thermophilic microbial diversity in Warm and Hot Springs of Armenia. Abstract book of 7th International Symposium for Subsurface Microbiology ISSM2008, Shizuoka, Japan. 2008, 61.
50. **Panosyan H.** Membrane lipids role in thermophily formation. *The FEBS Journal* 274 (Supl 1), Abstracts of the 32nd FEBS Congress, Vienna, Austria, 2007, 195.
51. **Panosyan H.H.** Diversity of Extremophilic Bacilli Isolated From Terrain Sites of Geothermal Anomalies and Hot Springs of Armenia. Book of Abstract: The 6th International Congress on Extremophiles, Brest, Brittany, France, 2006, 154.

ПАНОСЯН ОВИК АРУТЮНОВИЧ
РАЗНООБРАЗИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
ПОТЕНЦИАЛ МИКРООРГАНИЗМОВ ГЕОТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ АРМЕНИИ
И НАГОРНОГО КАРАБАХА
РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: термофильные бактерии, микробиота геотермальных источников, метагеномные исследования, *Anoxybacillus karvacharensis*, метанотрофные бактерии, метаногенные археи, нитрит-окисляющие бактерии, ЭПС продуцирующие бациллы, мембранные липиды и жирные кислоты, модификации rPHK.

Изучено биоразнообразие термофильных бактерий и архей геотермальных источников Армении и Нагорного Карабаха, закономерности их распространения и роль в биогеохимическом круговороте биогенных элементов. Комбинирование культурально-независимых методов (ДГГЭ, конструирование библиотеки генов 16S рPHK, пиросеквенирование 454, Illumina HiSeq) и методов культивирования показало, что преобладающими бактериальными филотипами микробиоты геотермальных источников Армении и Нагорного Карабаха являются представители филумов Proteobacteria, Firmicutes, Nitrospiraea и Deinococcus-Thermus, в то время как архейные филотипы (составляют менее 1% прокариотического сообщества) представлены филумами Euryarchaeota, Crenarchaeota и Thaumarchaeota. Подавляющее большинство обнаруженных филотипов в Генбанке имеет менее 97 % сходства с еще некультивируемыми микробами, что доказывает заселенность данных источников новыми и уникальными видами. Установлена обратная связь между температурой и таксономическим разнообразием микробиоты. Всего из изученных геотермальных источников было выделено 114 штаммов, принадлежащих к родам *Bacillus*, *Geobacillus*, *Parageobacillus*, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aeribacillus*, *Ureibacillus*, *Thermoactinomyces*, *Methylocaldum* и *Methanoculleus*. Создана ценная коллекция термофильных культур.

Полифазная идентификация штамма *Anoxybacillus* sp. K1, выделенного из геотермального источника Карвачар, позволила открыть новый вид рода *Anoxybacillus*, названный *Anoxybacillus karvachariensis* sp. nov. (=DSM 106524^T =KCTC 15807^T).

На основании фенотипического и филогенетического анализа штамм АК-К6, выделенный из геотермального источника Ахурик, был идентифицирован как аэробный метанотрофный термотолерантный вид в составе рода *Methylocaldum* и предложен в качестве отдельной таксономической единицы в группе *Methylocaldum-Methylococcus-Methyloparacoccus-Methylogaea*. Из проб донных отложений Джермукского геотермального источника получена также накопительная культура нитрит-окисляющих бактерий. Согласно анализу последовательности генов 16S рPHK накопительная культура содержит филотипы с высокой идентичностью

(≥97%) с нитрит-окисляющими бактериями, принадлежащими к видам *Nitrospira calida* и *Nitrospira moscoviensis*. Окисление NO_2^- со скоростью 7.53 ± 1.20 фмоль клетка⁻¹ ч⁻¹ подтвердило ключевую роль этих бактерий в биогеохимическом круговороте азота при высоких температурах.

Штаммы термофильных бацилл и термоактиномицетов, выделенные из изученных геотермальных источников, являются перспективными продуцентами термостабильных гидролаз. Показано, что 71% выделенных штаммов термофильных бацилл являются активными продуцентами термостабильных протеаз, липаз или амилаз, а 28,6% - активными продуцентами всех трех ферментов одновременно.

Наибольший удельный выход ЭПС у двух штаммов *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 и *Geobacillus toebii* ArzA-8 ($0,27 \text{ г}^{-1}$ и $0,22 \text{ г}^{-1}$ сухих клеток, соответственно), выделенных из геотермального источника Арзакан, наблюдался через 24 ч при использовании фруктозы в качестве единственного источника углерода при 65°C и pH 7.0. Химический состав и структура биополимеров, определенные с помощью ГХ-МС и ЯМР, показали, что оба ЭПС являются гетерополимерами, состоящими из маннозы в качестве основного мономера, которые имеют высокую молекулярную массу: 5×10^5 Да для *G. thermodenitrificans* ArzA-6 и 6×10^5 Да для *G. toebii* ArzA-8.

Адаптацию выделенных термофильных бацилл к тепловому стрессу за счет изменения количественного и качественного состава мембранных липидов изучали комбинированием методов ТСХ и ГХ-МС. С повышением температуры наблюдалось уменьшение содержания аминолипидов и коротких неразветвленных C14:0 жирных кислот с низкими температурами плавления и увеличение содержания гликолипидов, длинных неразветвленных C15:0-C17:0 и разветвленных (изо-C15:0, изо-C17:0) жирных кислот с высокими температурами плавления. Соотношение isoC15:0/isoC17:0 уменьшалось параллельно росту температуры.

Количественный и качественный состав нуклеозидных модификаций тРНК термофильных бацилл изучали методом ЖХ-ЭСИ-МС с использованием как природных, так и изотопно-меченых (дейтерий ¹³C и ¹⁵N) стандартов модифицированных нуклеозидов. Установлено, что облигатные и умеренно термофильные бациллы различаются по качественному и количественному составу некоторых нуклеозидных модификаций тРНК. Предложена новая гипотеза для дифференциации облигатных и умеренно термофильных бацилл, которая основана на широком распространении модификации Gm и ms²i⁶A у облигатных термофилов и i⁶A - у умеренных термофилов.

PANOSYAN HOVIK HARUTYUN
DIVERSITY, BIOLOGICAL FEATURES AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL
OF MICROBES OF THE GEOTHERMAL SPRINGS IN ARMENIA
AND NAGORNO-KARABAKH
SUMMARY

Keywords: thermophilic microbes, microbiota of geothermal springs, metagenomic studies, *Anoxybacillus karvacharensis*, methanotrophic bacteria, methanogenic archaea, nitrite-oxidizing bacteria, EPS producing bacilli, membrane lipids and fatty acids, tRNA modifications

The biodiversity of thermophilic bacteria and archaea of the geothermal springs in Armenia and Nagorno-Karabakh, the patterns of their distribution and role in the biogeochemical cycles of biogenic elements have been studied. By combination of culture-independent (DGGE, 16S rRNA gene library construction, 454 pyrosequencing, and Illumina HiSeq) and cultivation methods it has been revealed that predominant bacterial phylotypes were representatives of Proteobacteria, Firmicutes, Nitrospiraea and Deinococcus-Thermus, while archaeal phylotypes (comprise less than 1% of the prokaryotic community) were representatives of Euryarchaeota, Crenarchaeota and Thaumarchaeota. The vast majority of phylotypes found in the GeneBank had less than 97% similarity to yet uncultivated bacteria, proving that these springs are colonized by new and unique species. The inverse relationship between temperature and taxonomic diversity of the microbiota has been established. In total 114 strains belonging to *Bacillus*, *Geobacillus*, *Parageobacillus*, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aeribacillus*, *Ureibacillus*, *Thermoactinomyces*, *Methylocaldum* and *Methanoculleus* bacterial and archaeal genera have been isolated from studied geothermal springs. A valuable collection of thermophilic cultures has been established.

The polyphasic identification of strain K1 isolated from Karvachar geothermal spring has allowed to discover a new species of the genus *Anoxybacillus*, named *Anoxybacillus karvachariensis* sp. nov. (=DSM 106524^T =KCTC 15807^T).

The AK-K6 strain isolated from the Akhurik geothermal spring based on phenotypic and phylogenetic characteristics was identified as an aerobic methanotrophic thermotolerant species within the genus *Methylocaldum* and has been suggested as a separate taxonomic unit in the group *Methylocaldum-Methylococcus-Methyloparacoccus-Methylogaea*.

The enrichment of nitrite-oxidizing bacteria has been generated from the sediment samples of Jermuk geothermal spring. Bacteria showing high 16S rRNA gene sequence similarity ($\geq 97\%$) with nitrite-oxidizing bacteria belonging to *Nitrospira calida* and *Nitrospira moscoviensis* were dominate in obtained enrichments. The oxidation of NO_2^- at a rate of 7.53 ± 1.20 fmoles cell⁻¹ h⁻¹ confirmed the key role of these bacteria in the biogeochemical cycle of nitrogen at high temperatures.

The strains of thermophilic bacilli and thermoactinomycetes isolated from the studied geothermal sources are promising producers of thermostable hydrolase. It was shown that 71% of isolated thermophilic bacilli strains are active producers of heat-resistant proteases, lipases or amylases, and 28.6% of them are simultaneously active producers of these three enzymes.

The highest specific EPSs production yield of two selected strains *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 and *Geobacillus toebii* ArzA-8 (0.27 g g⁻¹ and 0.22 g g⁻¹ dry cells, respectively) isolated from Arzakan geothermal spring was observed after 24 h when fructose was used as sole carbon source at 65°C and pH 7.0. Chemical composition and structure of the biopolymers, determined by GC-MS and NMR, showed that EPSs from both bacteria are heteropolymers composed by mannose as major monomer and displayed a high molecular mass: 5×10⁵ Da for *G. thermodenitrificans* ArzA-6 and 6×10⁵ Da for *G. toebii* ArzA-8.

The quantitative and qualitative changes of membrane lipids of thermophilic bacilli as heat stress response was studied by combining TLC and GC-MS methods. With increasing temperature, a decrease of aminolipids and short unbranched C14:0 fatty acids with low melting points, and an increase of glycolipids and long unbranched C15:0-C17:0 and branched (iso-C15:0, iso-C17:0) fatty acids with high melting points, were observed. The ratio of isoC15:0/isoC17:0 was decreased along with the temperature rise.

The quantitative and qualitative composition of tRNAs nucleoside modifications of thermophilic bacilli was studied by LC-ESI-MS analysis using by both natural and isotopically labeled (deuterium ¹³C and ¹⁵N) standards of modified nucleosides. It was shown that obligate and moderate thermophilic bacilli are differ based on collective set of modified tRNA bases. An hypothesis to distinguish obligate thermophilic bacilli from moderate ones based on the widespread prevalence of modification of Gm and ms²i⁶A in obligate thermophiles and i⁶A in moderate ones was proposed.