

RESEARCH ARTICLE

UDC 579.852(282.256.341)

Thermophilic facultative anaerobic bacteria of the genus *Geobacillus* from bottom sediments of Lake Baikal

T.A. Khanaeva¹, O.N. Pavlova^{1,2}, S.M. Chernitsyna¹, I.A. Khalzov¹, A.V. Khabuev¹,
A.A. Nikonova¹, A.S. Novikova¹, T. I. Zemskaya¹

¹Limnological Institute of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

²Irkutsk Scientific Center of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

tkhan@lin.irk.ru; pavlova@lin.irk.ru; sveta@lin.irk.ru; i_halz@lin.irk.ru; shok@lin.irk.ru; alenaxis@list.ru;
linka@lin.irk.ru; tzema@lin.irk.ru

Pure culture of thermophilic facultative anaerobic microorganism was isolated from surface sediment of methane seepage Posolsk Bank. New strain *Geobacillus* sp. PB15/Grf7geo does not differ from the typical strains by morphological and physiological-biochemical properties. It is able to withstand of wide temperature range with optimum growth between 55–60 °C. Chemoorganotroph. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA sequence of the strain showed 97 % identity to cultivated strains of this genus. The strain forms a common clade with uncultivated representatives and does not cluster with sequences of cultivated strains within the genus *Geobacillus* in the phylogenetic tree. Strain *Geobacillus* sp. PB15/Grf7geo has been deposited to the collection of the VKM (=VKM B-3150^T).

Key words: Lake Baikal; thermophilic bacteria; methane seepage; Posolsk Bank; *Geobacillus* sp.

Термофильная факультативно анаэробная бактерия р. *Geobacillus* из донных осадков озера Байкал

Т.А. Ханаева¹, О.Н. Павлова^{1,2}, С.М. Черницына¹, И.А. Хальзов¹, А.В. Хабуюев¹,
А.А. Никонова¹, А.С. Новикова¹, Т.И. Земская¹

¹Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук,
Иркутск, Россия

²Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук,
Иркутск, Россия

tkhan@lin.irk.ru; pavlova@lin.irk.ru; sveta@lin.irk.ru; i_halz@lin.irk.ru; shok@lin.irk.ru; alenaxis@list.ru;
linka@lin.irk.ru; tzema@lin.irk.ru

Из поверхностных осадков метанового сипа «Посольская Банка» (Южный Байкал) получена чистая культура термофильного, факультативно анаэробного микроорганизма. Новый штамм *Geobacillus* sp. PB15/Grf7geo по морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам не отличается от типовых штаммов. Способен выдерживать широкий диапазон температур, с оптимумом роста 55–60 °С. Хемоорганогетеротроф. Анализ структуры 16S рРНК этого штамма показал, что он идентичен по структуре культивируемым штаммам на 97 %. На филогенетическом дереве штамм образует общую кладу с некультивируемыми формами и не кластеризуется с последовательностями культивируемых штаммов внутри рода *Geobacillus*. Штамм *Geobacillus* sp. PB15/Grf7geo депонирован в коллекцию VKM (=VKM В-3150^T).

Ключевые слова: озеро Байкал; термофильные бактерии; метановый сип; Посольская Банка; *Geobacillus* sp.

Введение

Термофильные прокариоты – особая группа микроорганизмов, развивающаяся при температурах выше 60 °С. Микробные сообщества высокотемпературных нефтяных месторождений, подземных водных резервуаров, глубинных горнодобывающих шахт, высокотемпературных горизонтов, находящихся под океанической корой в районах современной подводной вулканической активности, значительно отличаются друг от друга по составу, исходному энергетическому субстрату, основным микробиологическим процессам (Ghiorse, Wilson, 1988; Jimenez, 1990; Takai et al., 2001; Bonch-Osmolovskaya et al., 2003; Frank et al., 2016).

Озеро Байкал, донные осадки которого являются объектом исследования, не относится ни к одному из вышеперечисленных биоценозов. Стабильно низкие температуры глубоководных осадков озера Байкал (3.1–5.7 °С) определяют развитие и функционирование психрофильного микробного сообщества, играющего важную роль в круговороте вещества и энергии (Namsaraev, Zemskaya, 2000). Расположение озера Байкал в тектонически активной зоне обуславливает наличие районов геологических аномалий, разгрузок газосодержащих флюидов, грязевых вулканов, залежей газовых гидратов. Минерализованные флюиды могут мигрировать вдоль проницаемых зон и появляться в поверхностных осадках оз. Байкал, приуроченных к тектоническим нарушениям. Очевидно, что вместе с углеводородсодержащими флюидами в поверхностные осадки из глубинной зоны могут поступать и термофильные микроорганизмы. Районом концентрации геологических аномалий является Посольский разлом, и в частности, граничащая с ним подводная возвышенность Посольская Банка, расположенная на границе Южной и Центральной котловин озера Байкал (Naudts et al., 2012).

Состав бактериального сообщества в донных осадках Посольской банки значительно отличается от таковых в других районах разгрузки углеводородсодержащих флюидов. В поверхностных осадках установлено присутствие хемолитотрофных, хемоавтотрофных и анаэробных органотрофных микроорганизмов, участвующих в циклах азота, углерода и серы. Особенности состава микробных сообществ в этом районе обеспечиваются наличием особых путей миграции газосодержащих флюидных потоков с которыми в холодные поверхностные осадки могут поступать глубинные термофильные прокариоты (Naudts et al., 2012; Chernitsyna et al., 2016). Для подтверждения этой гипотезы мы провели поиск термофильных, анаэробных микроорганизмов в районе выхода газосодержащих флюидных потоков района метанового сипа «Посольская Банка». В настоящей работе дается характеристика термофильного, факультативно анаэробного штамма PB15/Grf7geo, отнесенного к *Geobacillus* sp., изолированного из низкотемпературного слоя донных осадков вышеуказанного района.

Материалы и методы исследований

Объект исследования. Бактериальный штамм PB15/Grf7geo выделен из поверхностных донных осадков, отобранных в районе метанового сипа «Посольская Банка» с помощью коробчатого пробоотборника во время экспедиции в июле 2015 года. Глубина водной толщи в точке отбора – 478 метров. Пробы осадка отбирали с соблюдением стерильности.

Условия культивирования. Получение накопительных культур проводили во флаконах (120 мл), содержащих 30 мл модифицированной среды Видделя для пресноводных форм (Widdel, Back, 1992), которая содержит полный набор витаминов и дрожжевой экстракт (0.5 г/л). В качестве восстановителя использовали сульфид натрия (2.5 мМ). Этот же состав среды использовали для поддержания накопительных культур бактерий. Культивирование осуществляли в течение 30 суток, при температуре 60 °С. В качестве контроля служили флаконы с незасеянной средой. Изолирование культуры *Geobacillus* вели путем последовательных пересевов с последующим выделением колоний на твердой среде того же состава с добавлением агара – 15 г/л.

Методы исследования физиологических и ростовых характеристик. Влияние солёности на рост штамма определяли, используя среду Видделя, добавляя соль (NaCl) в концентрации от 0 до 15 г/л при фоновом содержании NaHCO₃ 1 г/л. Определение температуры, оптимальной для роста штамма, проводили с использованием градиентного термостата Binder BD 53 в диапазоне температур от 30 до 100 °С. Значения pH для

роста штамма PB15/Grf7geo определяли на среде Видделя без хлорида натрия, выравняли молярность по натрию с помощью бикарбоната натрия. Различные значения pH устанавливали 10 % раствором соляной кислоты или 10 % раствором едкого натрия. Результат снимали через 3 суток инкубации в термостате при 60 °С. Способность к росту в анаэробных условиях проверена при культивировании во флаконах с бескислородной минеральной средой Видделя с добавлением KNO₃ (1 г/л) в качестве акцептора электронов. В качестве газовой фазы использовали смесь газов H₂:CO₂ в соотношении 4:1. Питательные среды готовили, используя анаэробную технику Хангейта (Hungate, 1969). Исследование физиолого-биохимических характеристик штамма проводили при помощи методов, описанных ранее (Logan et al., 2009). Спектр углеводного питания выявляли с использованием диагностических сред Гисса. Органические кислоты, сахара или пептиды добавляли в концентрации 3 г/л, спирты – 5 мл/л. Посевы инкубировали при 60 °С. Все анализы проводили в 2-х повторностях.

Морфология бактерий исследована с помощью сканирующего электронного микроскопа Quanta 200 (FEI Company, США) с ускоряющим напряжением в 20 киловольт на базе ЦКП «Электронная микроскопия» Объединенного ЦКП «Ультрамикрoанализ» Лимнологического института СО РАН. Суспензию клеток фиксировали 4 % раствором параформальдегида в 0.066 М буфере Соренсена при комнатной температуре в течение ночи. Далее клетки отфильтровывали на поликарбонатные фильтры (диаметр пор 0.2 мкм) и проводили обезвоживание в серии растворов этанола (30 %, 50 %, 70 %, 96 %, 100 %) и ацетоне (100 %). Затем проводили сушку в критической точке на приборе CPD 030 Critical Point Dryer (BALZERS, Лихтенштейн). Фильтры были помещены на алюминиевые столики и напылены золотом на установке SCD 004 (BalzersUnion, Лихтенштейн).

Анализ Г+Ц состава. Выделение и очистку высокополимерной ДНК для определения Г+Ц состава проводили по ранее описанной методике (Marmur, 1961; Heats et al., 1986). Содержание Г+Ц в ДНК находили по температуре плавления комплекса, используя саморегистрирующий спектрофотометр PyeUnicum SP1800 со скоростью подогрева 0.5 град./мин. Плавление проводили в растворе 0.1 SSC. Нуклеотидный состав рассчитывали согласно формуле, описанной ранее (Owen et al., 1969).

Метод анализа жирных кислот. Анализ состава жирных кислот проводили на хромато-масс спектрометре «6890B GC System, 7000C GC/MS Triple Quad» (Agilent, США) с колонкой «Optima-17MS» (MACHERY-NAGEL, Германия). Детектирование и идентификацию пиков метиловых эфиров жирных кислот проводили в режиме регистрации полного масс-спектра с помощью программного обеспечения «NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (Version 2.2)». Количественный анализ МЭЖК проводили методом внутреннего стандарта, в качестве которого использовали стандартный раствор дидецилового эфира в н-гексане (C=2.6 мг/мл). Калибровку МЭЖК проводили с использованием стандартных растворов «Methylcis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic ester 10 mg/ml in heptane» (Supelco, США) и «F.A.M.E. Mix, C4-C24, 100 mg, Neat» с аттестованными концентрациями компонентов смеси (Supelco, США). При количественном анализе использовали значения калибровочных коэффициентов, полученные для индивидуальных соединений МЭЖК, а также средние значения для групп МЭЖК: насыщенных и мононенасыщенных.

Выделение ДНК, амплификация гена 16S рРНК и секвенирование. Выделение ДНК штамма проводили по модифицированной методике ферментативного лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией (Sambrook et al., 1989). Амплификацию ДНК проводили в следующем режиме: 94 °С – 2' (1 цикл); денатурация 94 °С – 45", отжиг – 52 °С – 45", элонгация – 72 °С – 60" (30 циклов); финальная элонгация – 72 °С – 10' (1 цикл). В работе были использованы праймеры, комплементарные наиболее консервативным участкам гена 16S рРНК: 27L-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, 500L-CGTGCCAGCAGCCGCGTAA, 1350R- GACGGGCGGTGTGTACAAG (Brosius J. et al., 1981, Denisova et al., 1999). Секвенирование проводили на геномном анализаторе ABI 3130XL Genetic Analyser («Applied Biosystems») с использованием реактива BigDye Terminator Kit v.3.1 (Applied Biosystems) в ЦКП «Геномика», Новосибирск. Последовательности, полученные в результате секвенирования, сравнивали с последовательностями из международного банка данных NCBI с помощью программы BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Структуры были проанализированы с использованием программы ClustalW V 1.4 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Сравнение последовательностей и построение филогенетических древ осуществляли с помощью пакета программ MEGA 5.01 (<http://www.megafiler.co>) с использованием алгоритмов группирования «Neighbor-joining», модели «Kimura-2-parameters». Статистическая достоверность ветвления оценивалась с помощью "bootstrap-анализа", с использованием соответствующей функции той же программы. Последовательность штамма PB15/Grf7geo депонирована в GenBank под регистрационным номером KY55292.

Результаты и их обсуждение

Чистая культура факультативно анаэробной термофильной бактерии (PB15/Grf7geo) получена при культивировании образца донных осадков, отобранных в экспедиции в июле 2015 года. Исследование фенотипических и физиолого-биохимических характеристик показало принадлежность штамма к роду *Geobacillus*.

Культуральные свойства. Морфология клеток штамма PB15/Grf7geo варьировала в зависимости от возраста культуры. В суточной культуре клетки представлены одиночными длинными прямыми или слегка изогнутыми палочками (рис. 1 а, б). Деление с образованием перетяжек (бинарное деление).

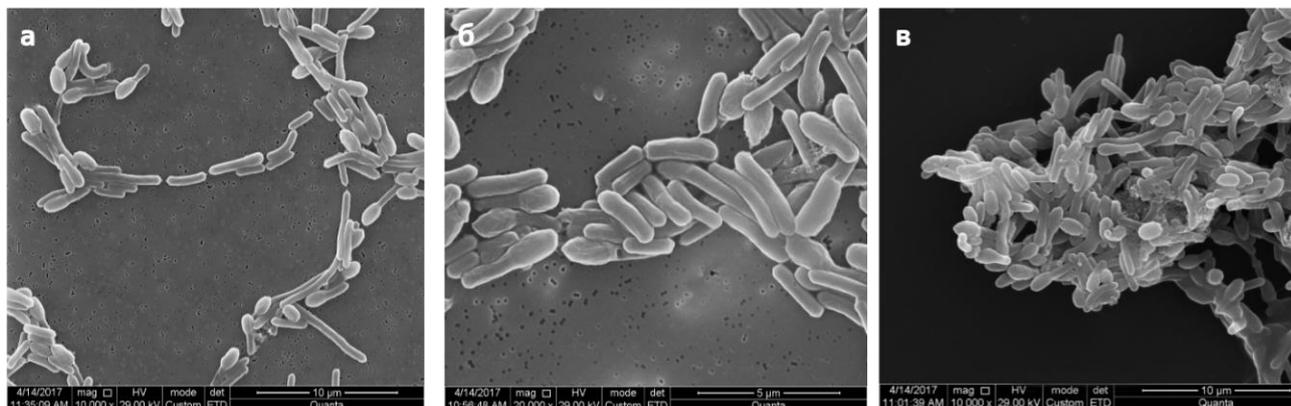


Рис. 1. Морфология клеток штамма PB15/Grf7geo на плотной питательной среде: суточная культура (а), трехсуточная культура (б, в). Масштаб: а, в – 10 мкм, б – 5 мкм

Микроорганизм подвижный за счет перитрихально расположенных жгутиков. Клетки при окраске по Граму – положительные. Организм споровый. Спора овальная, локализована терминально. Споры клетки выбрасывает только на твердой среде (рис. 1 в). Культура терморезистентная. Споры выдерживают прогрев при 100 °С в течение 5 мин. Колонии штамма лишены пигмента, имеют округлую форму, плоские, непрозрачные, края неровные, консистенция плотная. При росте на жидкой среде наблюдается однородное помутнение среды с образованием рыхлого осадка в конце роста.

Физиологические свойства. Штамм термофильный, оптимум роста – 55–60 °С. Верхняя граница роста – 80 °С, нижняя – 46 °С. Нейтрофил. При pH 5.0 и pH 8.6 – рост отсутствовал. Область pH для роста 6.8–8.2, с оптимумом 7.0–7.2. При росте штамм нуждается в нитрате (нитрат калия) и не нуждается в хлориде натрия. Аэроб, факультативный анаэроб. Каталазоположительный. Оксидазоотрицательный. Штамм нуждается в восстановителе, в качестве которого использовали сульфид натрия (2.5 мМ). При более высоких концентрациях сульфида (10, 12.5 и 15 мМ) рост ухудшается, при концентрации 20–25 мМ прекращается полностью. В качестве источника энергии и углерода использует глюкозу, фруктозу, рамнозу, маннозу, мальтозу, сахарозу. Растет на агаре с эскулином, гидролизует крахмал. Для роста необходимы дрожжевой экстракт и витамины. Не использует ксилозу, арабинозу, галактозу, лактозу, рафинозу, салицин, сорбит, инозит, дульцит, адонит, цитрат, ацетат, малонат натрия, пируват, сукцинат лактат, мочевины, желатину, метанол, этанол, бутанол, пропанол.

Анализ состава жирных кислот. У большинства микроорганизмов рода *Geobacillus* идентифицируются насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты с длиной цепи от 15 до 20 атомов углерода. На хроматограммах экстрактов метилированных эфиров жирных кислот (ЖК) идентифицированы 15 пиков. Из них 5 метиловых эфиров (МЭ) насыщенных жирных кислот (НЖК), 7 метиловых эфиров разветвленных НЖК, 2 метиловых эфира мононенасыщенных ЖК и один МЭ разветвленной мононенасыщенной ЖК. Анализ пиков показал преобладание метиловых эфиров жирных кислот iso-C15:0 – 33 %; iso-C16:0 – 13.6 %; iso-C17:0 – 32.3 %; iso-C17:1 n-11 – 7.3 %. Остальные жирные кислоты содержатся в минорных количествах (табл.1). Известно, что жирные кислоты определяют физико-химические свойства клеточных стенок микроорганизмов, такие как текучесть, устойчивость к температурам, гидрофобность. Разветвленные или алициклические жирные кислоты, благодаря особенностям химического строения у грамположительных бактерий выполняют адаптивную функцию, придавая пластичность и текучесть мембране (Budnikov, 2010; Zakharova, Sukhikh, 2015).

Анализ структуры гена 16S рРНК. На основании филогенетического анализа структуры гена 16S рРНК (1293 п.н.) установлено, что полученная последовательность образует отдельную кладу с некультивируемыми формами и не группируется с другими кластерами культивируемых видов рода *Geobacillus* (рис. 2). Для уточнения его таксономического положения, проведено сравнение штамма PB15/Grf7geo с известными представителями фенотипических групп термофильных *Geobacillus*. В работе использовали последовательности типовых штаммов референтных видов, отнесенных к этому роду. Процент идентичности последовательностей гена 16S рРНК штамма *Geobacillus* sp. PB15/Grf7geo с другими последовательностями этого кластера составляет 97 %. Наиболее близкие последовательности – некультивируемые *Geobacillus* sp. clone SHBZ (97 %), *Bacillales* bacterium clone DR938CH110701SACH41 (97 %).

Содержание Г + Ц пар в ДНК у штамма PB15/Grf7geo – 53.0 мол. %, что соответствует содержанию Г + Ц пар в ДНК внутри рода *Geobacillus* (от 42.4 до 54.5 мол. %) (Nazina et al., 2001).

Таблица 1. Состав метиловых эфиров жирных кислот штамма *Geobacillus* sp. (PB15/Grf7geo) и представителей других групп геобацилл (% от общего содержания МЭЖК в 1 г сухой биомассы; жирным шрифтом выделены доминирующие жирные кислоты; н.д. – нет данных)

Жирная кислота	<i>Geobacillus</i> sp. B-3150 ^T	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> 15366 ^T (Nazina et al., 2001)	<i>Geobacillus thermoglucosidatus</i> (Kämpfer, 1994)	<i>Geobacillus caldoliticus</i> DSM 405 (Andersson et al., 1995)	<i>Geobacillus smithii</i> DSM 459 ^T (Andersson et al., 1995)
i14:0	0,29	1	н.д.	н.д.	н.д.
14:0	0,27	1,4	0,6	н.д.	н.д.
i 15:0	33	22,6	22,0	22,0	19,0
15:0	0,23	2,1	н.д.	1,0	н.д.
i16:0	13,6	21,0	10,4	37,0	6,0
16:0	3,49	11,2	11,6	5,0	8,0
i17:0	32,3	18,5	30,3	22,0	11,0
17:0	0,29	1,3	0,8	1,0	
a 17:0	1,0	4,6	16,6	8,0	42,0
i17:1 n-11	7,3	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
i18:0	0,8	0,9	н.д.	2,0	н.д.
18:0	1,73	3,4	0,5	н.д.	н.д.
other	6	12	7.2	2	14

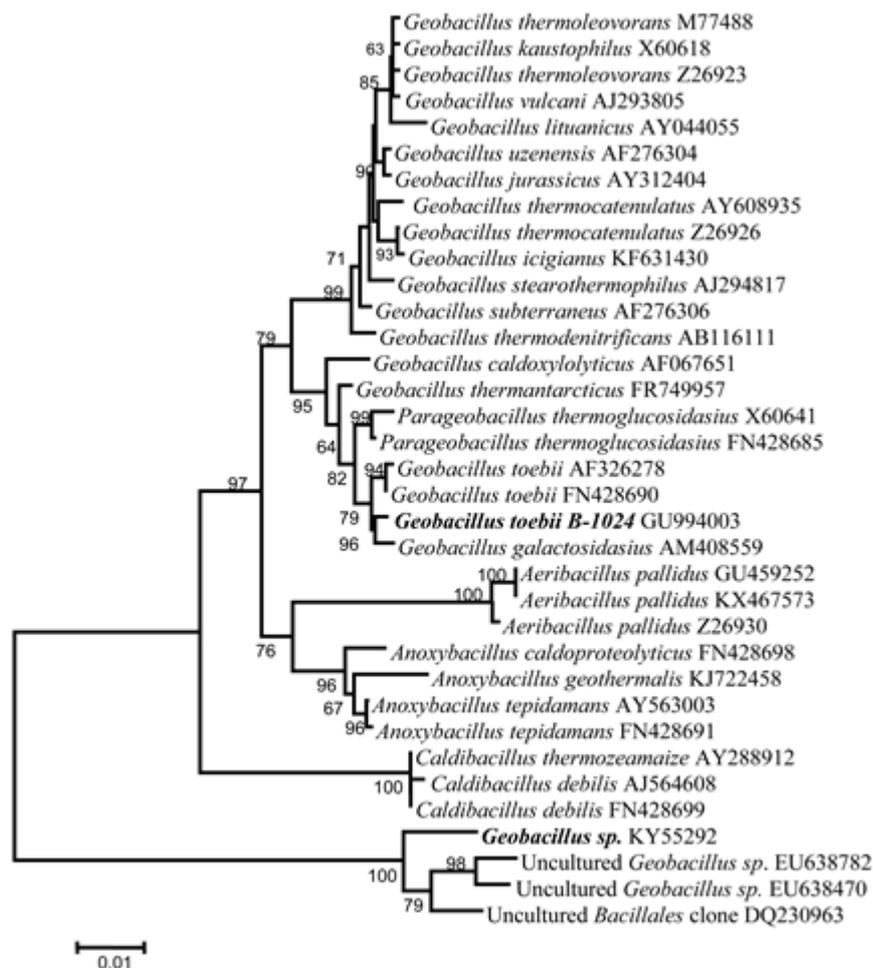


Рис 2. Филогенетическое древо нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК штамма *Geobacillus* sp. и родственных последовательностей рода *Geobacillus*.

Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью "bootstrap"- анализа 100 альтернативных деревьев; жирным шрифтом выделен штамм, исследованный в данной работе и штамм B-1024, который был выделен из горячих источников Байкальской рифтовой зоны (Tourova et al., 2010)

Род *Geobacillus* был выделен в самостоятельный род с таксономическим описанием в 2001 г. Т.Н. Назиной с соавторами, первоначально к нему относили 6 видов термофильных бацилл, изолированных из нефтяных месторождений Западной Сибири и Казахстана (Nazina et al, 2001). В 2010–2012 годах на основании анализа фрагментов гена 16S рРНК была начата новая ревизия рода. Часть видов перенесена в новые роды (*Aeribacillus*, *Caldibacillus*), ряд видов объединены в подроды (Dinsdale et al., 2011; Coorevits et al., 2012). В настоящее время род *Geobacillus* объединяет термофильные, пресноводные и галофильные, ацидофильные и алкалофильные бактерии, которые используют широкий спектр источников углерода для роста. Экологический диапазон геобацилл очень широк, это род-космополит. Известно, что представители рода *Geobacillus* обладают уникальными гемицеллюлолитическими системами, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных источников высокоактивных и термостабильных ферментов для эффективного гидролиза биомассы. Данные микроорганизмы также обладают высокой скоростью роста и способностью утилизировать широкий круг субстратов, включая пентасакхара (Brock et al., 1978; Bonch-Osmolovskaya, 2005; Rozanov et al., 2013).

Ранее проведенные исследования состава микробных сообществ донных осадков, в приразломных областях озера Байкал (подводные грязевые вулканы, метановые сипы, залежи газовых гидратов), показали, что филум *Firmicutes* не является доминирующим таксоном. В исследованных библиотеках генов 16S рРНК представители этого филума составляли не более 2 % от общего количества последовательностей (Kadnikov et al., 2012; Zemskaya et al., 2015). Лишь в поверхностных осадках метанового сипа «Посольская Банка» содержание представителей филума *Firmicutes* составляло 4.2 %, в глубинных – 8.9 % от общего количества последовательностей (Chernitsyna et al., 2016). Появление в поверхностных психрофильных осадках озера Байкал термофильных микроорганизмов р. *Geobacillus* может быть следствием миграции газонасыщенных минерализованных флюидов, которые увлекают с собой из глубинных в поверхностные слои осадков не только диатомовые водоросли (Klerx et al., 2003), но и жизнеспособные микроорганизмы с неизвестным метаболизмом.

Не смотря на то, что термофильный, факультативно анаэробный штамм *Geobacillus* sp. PB15/Grf7geo выделен из низкотемпературного биотопа, его физиолого-биохимические свойства не отличаются от свойств типовых термофильных штаммов этого рода. Вместе с тем, анализ структуры гена 16S рРНК штамма PB15/Grf7geo свидетельствует о его неполной идентичности типовым культивируемым штаммам (97 %) и обособленном филогенетическом положении внутри кластера последовательностей типовых видов. Последние результаты являются основанием для отнесения полученного штамма к новому виду. Также очевидно, что для валидации его в качестве нового вида рода *Geobacillus* необходимо уточнение фенотипических признаков, в части его целлюлолитических свойств, полное филогенетическое описание, в том числе и анализ его генома. Все эти аспекты будут предметом детальных исследований в дальнейшем.

Благодарности

Авторы выражают благодарность к.б.н. Е.Н. Детковой за анализ Г+Ц состава, проведенный в лаборатории реликтовых микробных сообществ Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Микробиологические исследования выполнены в рамках гранта РФФИ № 16-04-00181 «Глубинные микроорганизмы донных осадков оз. Байкал...», секвенирование гена 16S рРНК выполнено в рамках темы Интеграционного проекта 4.1.2 ИИЦ СО РАН «Применение методов NGS-BD (Next Generation Sequencing – Big Data) для решения вопросов экологии».

References

- Andersson, M., Laukkanen, M., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Rainey, F.A., Niemelä, S.I., Salkinoja-Salonen, M. (1995). *Bacillus thermosphaericus* sp. nov., a new thermophilic ureolytic bacillus isolated from air. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(2), 203–220.
- Bonch-Osmolovskaya, E.A., Miroshnichenko, M.L., Lebedinsky, A.V., Chernyh, N.A., Nazina, T.N., Ivoilov, V.S., Belyaev, S.S., Boulygina, E.S., Lysov Y.P., Perov, A.N., Mirzabekov, A.D., Hippe, H., Strackebandt, E., L'Haridon, S., Jeanthon, C. (2003). Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6143–6151.
- Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2005). Phylogenetic and metabolic diversity of thermophilic prokaryotes with different types of anaerobic respiration. *Microbial diversity: current perspectives and potential application*. New Delhi: International Publishing House.
- Brock, T.D. (1978). *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. US: Springer-Verlag.
- Brosius, J., Ullrich, A., Paker, M.A., Gray, A., Dull, T.J., Gutell, R.R., Noller, H.F. (1981). Construction and fine mapping for recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli*. *Plasmid*, 6, 112–118.
- Budnikov, G.K. (2010). *Himicheskij analiz v medicinskoj diagnostike*. Moscow: Nauka. (in Russian)
- Chernitsyna, S.M., Mamaeva, E.V., Lomakina, A.V., Pogodaeva T.V., Galach'yants Yu.P., Bukin S.V., Pimenov N.V., Khlystov O.M., Zemskaya, T.I. (2016). Phylogenetic diversity of microbial communities of the Posolsk Bank bottom sediments, Lake Baikal. *Microbiology*, 85(6), 672–680.

Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Halke, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., Logan, N.A. (2012). Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly '*thermoglucosidasius*'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1470–1485.

Denisova, L.Ya., Belkova, N.L., Tulokhonov, I.I., Zaichikov, E.F. (1999). Bacterial diversity at various depths in the southern part of Lake Baikal as revealed by 16S rDNA sequencing. *Microbiology*, 68(4), 457–483.

Dinsdale, A.E., Halket, G., Coorevits, A., Van Landschoot, A., Busse, H.J., De Vos, P., Logan, N.A. (2011). Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenulatus*. *International J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1802–1810.

Frank, Y.A., Kadnikov, V.V., Gavrilov, S.N., Banks, D., Gerasimchuk, A.L., Podosokorskaya, O.A., Merkel, A.Y., Chernyh, N.A., Mardanov, A.V., Ravin, N.V., Karnachuk, O.V. Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2016). Stable and variable parts of microbial community in siberian deep subsurface thermal aquifer system revealed in a long-term monitoring study. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2101. doi: [10.3389/fmicb.2016.02101](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02101).

Ghiorse, W.C., Wilson, J.T. (1988). Microbial ecology of the terrestrial subsurface. *Advances in Applied Microbiology*, 33, 107–173.

Heats, L.S., Sloan, G.L., Heath, H.E. (1986). A simple and generally applicable procedure for releasing DNA from bacterial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1138–1140.

Hungate, R.E. (1969). A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiology*. US: Academic Press.

Jiménez, L. (1990). Molecular analysis of deep-subsurface Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2108–2113.

Kadnikov, V.V., Mardanov, A.V., Beletsky, A.V., Shubenkova, O.V., Pogodaeva, T.V., Zemskaya, T.I. (2012). Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 348–358.

Kämpfer, P. (1994). Limits and possibilities of total fatty acid analysis for classification and identification of *Bacillus* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(1), 86–98.

Klerx, J., Zemskaya, T.I., Matveeva, T.V., Khlystov, O.M., Namsaraev, B.B., Dagurova, O.P., Golobokova, L.P., Vorob'eva, S.S., Pogodaeva, T.V., Granin, N.G., Kalmychkov, G.V., Ponomarchuk, V.A., Shoji, H., Mazurenko, L.L., Kaulio, V.V., Solov'ev, V.A., Grachev, M.A. 2003. Methane hydrates in the surface layer of deep water Lake Baikal sediments. *Doklady Akademii Nauk*, 393, 1342–1346. (In Russian)

Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation DNA from microorganisms. *J. Molecular Biology*, 3, 208–218.

Logan, N.A., Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.-J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M.S., Seldin, L. Ventosa, A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International J. Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2114–2121.

Namsaraev, B.B., Zemskaya, T.I. (2000). Microbial processes of carbon circulation in bottom sediments of Lake Baikal. Novosibirsk: Geo. (In Russian)

Naudts, L., Khlystov, O., Granin, N., Chensky, A., Poort, J., De Batist, M. (2012). Stratigraphic and structural control on the distribution of gas hydrates and active gas seeps on the Posolsky Bank, Lake Baikal. *Geo-Marine Letters*, 32, 395–406.

Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., & Ivanov, M.B. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the New combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 433–446.

Owen, R.J., Hill, L.R., Lapage, S.P. (1969). Determination of DNA base compositions from melting profiles in dilute buffers. *Biopolymers*, 7, 503–516.

Rozanov, A.S., Ivanisenko, T.V., Bryanskaya, A.V., Shekhovtsov, S.V., Logacheva, M.D., Saik, O.V., Malup, T.K., Demenkov, P.S., Goryachkovskaya, T.N., Ivanisenko, V.A., Peltek, S.E. (2014). Bioinformatic analysis of the genome of the *Geobacillus stearothermophilus* 22 strain isolated from the Garga hot springs, Baikal region. *Russian J. Genetics: Applied Research*, 4, 267–272.

Sambrook, J., First, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. US: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Takai, K., Moser, D.P., DeFlaun, M., Onstott T.C., Fredrickson, J.K. (2001). Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5750–5760.

Tourova, T.P., Sokolova, D.S., Semenova, E.M., Shumkova, E.S., Korshunova, A.V., Babich, T.L., Nazina, T.N., Poltarau, A.B. (2016). Detection of n-alkane biodegradation genes *alkB* and *ladA* in the thermophilic hydrocarbon-oxidizing bacteria of the genera *Aeribacillus* and *Geobacillus*. *Microbiology*, 85(6), 693–707.

Widdel, F., Back, F. (1992). *The Prokaryotes. Ecophysiology and Biogeochemistry*. US: Springer.

Zakharova, Y.V., Sukhikh, A.S. (2015) Chromatographic analyses of membrane fatty acid Bifidobacterium with different hydrophobicity. *Sorbchionnye I chromatographicheskie processi*, 15(6), 776–783. (in Russian)

Zemskaya, T., Lomakina, A., Mamaeva, E., Zakharenko, A., Pogodaeva, T., Petrova D. (2015). Bacterial communities in sediments of Lake Baikal from areas with oil and gas discharge. *Aquatic Microbial Ecology*, 76, 95–109.

Citation:

Khanaeva, T.A., Pavlova, O.N., Chernitsyna, S.M., Khalzov, I.A., Khabuev, A.V., Nikonova, A.A., Novikova, A.S., Zemskaya, T. I. (2017). Thermophilic facultative anaerobic bacteria of the genus *Geobacillus* from bottom sediments of Lake Baikal. *Acta Biologica Sibirica*, 3 (3), 39–46.

Submitted: 03.06.2016. **Accepted:** 18.08.2017

crossref <http://dx.doi.org/10.14258/abs.v3i3.3614>



© 2017 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).