



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Mikrobiologijos magistro studijų programos studentė

Monika MASELYTĖ

**TRANSFORMUOJAMŲ TERMOFILINIŲ BAKTERIJŲ ATRANKA IR JŲ  
GENETINĖS TRANSFORMACIJOS OPTIMIZAVIMAS**

Magistro baigiamasis darbas

Darbo vadovas: dr. Arnoldas Kaunietis

Vilnius, 2023

# TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS .....	5
ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1 TERMOFILINĖS BAKTERIJOS .....	8
1.2 TERMOFILINĖS BAKTERIJOS KAIP BIOTECHNOLOGIJŲ ŠEIMININKAS .....	10
1.3 TERMOFILINIŲ BAKTERIJŲ TERMOSTABILUMAS .....	11
1.3.1 Termofilinių bakterijų ląstelės membranos struktūra .....	11
1.3.2 Pritaikymas molekuliniam lygmenyje .....	12
1.3.3 Termostabilių baltymų ypatumai .....	14
1.4 TERMOFILINIŲ BAKTERIJŲ PRITAIKYMAS BIOTECHNOLOGIJOSE .....	15
1.4.1 Termostabilūs baltymai .....	15
1.4.2 Termofilinių bakterijų sintetamos nanodalelės .....	17
1.4.3 Biokuro gamyba .....	17
1.4.4 Termofilinės bakterijos bioremediacijoje .....	18
1.5 GENETINĖS TRANSFORMACIJOS METODAI .....	19
1.5.1 Protoplastų transformacija .....	20
1.5.2 Konjugacija .....	21
1.5.3 Elektroporacija .....	22
1.5.4 Sonoporacija .....	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	26
2.1 DARBE NAUDOTOS MEDŽIAGOS, BAKTERIJŲ KAMIENAI, TERPĖS IR ĮRANGA .....	26
2.1.1 Naudota įranga .....	26
2.1.2 Naudoti bakterijų kamienai .....	26
2.1.3 Naudotos terpės ir buferiai .....	27
2.2 METODAI .....	27

2.2.1	Plazmidžių išskyrimas.....	27
2.2.2	Elektrokompetentinių termofilinių ląstelių paruošimas .....	28
2.2.3	Elektroporacija .....	28
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	30
3.1	<i>PARAGEOBACILLUS THERMOGLUCOSIDASIUS</i> DSM 2542 <sup>T</sup> GENETINĖS TRANSFORMACIJOS SĄLYGŲ OPTIMIZAVIMAS .....	30
3.1.1	Augimo sąlygų įtaka.....	30
3.1.2	Elektrinio lauko stiprio įtaka .....	32
3.1.3	Plazmidės kiekio įtaka.....	33
3.1.4	Regeneracijos sąlygų įtaka .....	36
3.2	<i>P. THERMOGLUCOSIDASIUS</i> DSM 2542 <sup>T</sup> GENETINĖS TRANSFORMACIJOS ĮVERTINIMAS NAUDOJANT STAČIAKAMPIO FORMOS ELEKTRINIO LAUKO BANGŲ ELEKTROPORATORIŲ .....	39
3.3	TRANSFORMUOJAMŲ TERMOFILINIŲ BAKTERIJŲ ATRANKA .....	42
	IŠVADOS .....	45
	SANTRAUKA.....	46
	SUMMARY.....	47
	PADĖKA .....	48
	LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	49
	PRIEDAI.....	59

# **Transformuojamų termofilinių bakterijų atranka ir jų genetinės transformacijos optimizavimas**

Darbas atliktas

Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, Biomokslų instituto Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje

Darbą atliko:

Monika Maselytė

Darbo vadovas:

dr. Arnoldas Kaunietis

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

aps./min – apsisukimai per minutę

EC (angl. *Enzyme Commission number*) – Fermentų komisijos priskirtas numeris

FTMC – Fizinių ir technologijos mokslų centras

g – laisvojo kritimo pagreitis ( $\approx 9,81 \text{ m/s}^2$ )

KFV – kolonijas formuojantys vienetai

kV – kilovoltai

kV/cm – kilovoltai centimetrui

OT – optinis tankis

PAH – policiklinis aromatinis angliavandenilis (angl. *Polycyclic aromatic hydrocarbon*)

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

TGP – triptono glicerolio piruvato terpė

T<sub>opt</sub> – optimali augimo temperatūra

TSA – triptono sojos agaras

val. – valanda

μF – mikrofaradai

VU – Vilniaus universitetas

GMC – Gyvybės mokslų centras

## IVADAS

Ekstremofilai – tai mikroorganizmų grupė, prisitaikiusi gyventi tokiose aplinkos sąlygose, kuriose įprastai kiti organizmai neišgyvena. Aplinkos sąlygos apima kraštutinius parametrus, tokius kaip radiacija, temperatūrą, slėgį, pH ar druskų koncentraciją (Orellana ir kt., 2018). Termofiliniai mikroorganizmai yra vieni geriausiai ištirtų ekstremofilų ir dėl gebėjimo augti aukštoje temperatūroje (>45 °C) yra laikomi įdomiu mokslinių tyrimų objektu (Zeldes ir kt., 2015). Šių mikroorganizmų atradimas nulėmė nemažai tyrimų, siekiančių išaiškinti molekulinės strategijas, kurių pagalba jie geba prisitaikyti ir išgyventi tokioje ekstremalioje aplinkoje (Szilágyi ir Závodszy, 2000; Hickey ir Singer, 2004; Siliakus ir kt., 2017).

Jau ne vieną dešimtmetį termofilinės bakterijos laikomos vienu didžiausiu traukos objektu biotechnologijose dėl turimo potencialo ir privalumų pramonėje (Wiegel, 1980). Šios bakterijos gali būti panaudotos įvairiuose procesuose, tokiuose kaip biokuro gamyba (Scully ir Orlygsson, 2014), bioremediacija (Vishwakarma ir kt., 2020) ar metalų nanodalelių sintezė (Atalah ir kt., 2022). Tai yra įvairių termostabilių fermentų šaltiniai. Termostabilios amilazės, lipazės, ksilanazės ir kiti fermentai, kurie turi nemažai pranašumų prieš mezofilų gaminamus fermentus (Atalah ir kt., 2019). Taip pat biotechnologinių procesų vykdymas aukštesnėje temperatūroje irgi vertas didelio dėmesio: kylant temperatūrai sumažėja mikrobiologinio užterštumo rizika, sumažėja reakcijos klampumas, padidėja substratų tirpumas bei reakcijos greitis (Urbietta ir kt., 2015).

Siekiant išplėsti termofilinių bakterijų pritaikymą biotechnologijoje, atsiranda poreikis kurti genetinės manipuliacijos įrankius, kurie leistų įterpti naujus, pakeisti esamus genus ar atlikti modifikacijas, kurios suteiktų naujų ar pagerintų esamas funkcijas (Taylor ir kt., 2011; Han ir kt., 2019). Genetinės modifikacijos vienas pirmųjų žingsnių yra norimos genetinės medžiagos pernaša į ląsteles. Tačiau termofilinės bakterijos pasižymi sudėtinga genetinė transformacija, transformacijos sistemų kūrimas palyginti su mezofilinėmis bakterijomis pakankamai lėtas, dėl to žinoma gana mažai kamienų, kurie gali būti transformuojami (Lin ir Xu, 2013; Arai ir kt., 2022). Dėl šių priežasčių, jų pritaikymas pramonėje vis dar gana suvaržytas. Dažniausi genų pernašos metodai naudojami transformuoti termofilines bakterijas yra protoplastų transformacija, konjugacija ir elektroporacija (Lin ir Xu, 2013). Elektroporacija – tai vienas paprasčiausių ir dažniausiai taikomų genetinės medžiagos pernašos metodų, tačiau jo pritaikymą apsunkina užtrunkantis proceso sąlygų optimizavimas (Taylor ir kt., 2011; Wada ir Suzuki, 2020).

Šio darbo metu siekiama optimizuoti termofilinių *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> bakterijų genetinę transformaciją naudojant elektroporacijos metodą bei atlikti transformuojamų termofilinių bakterijų kamienų atranką. Atrankos metu siekiama identifikuoti

termofilinių bakterijų kamienus, kurie gali būti transformuojami elektroporacijos metodu ir turinčius potencialą biotechnologijoje.

**Darbo tikslas:**

Optimizuoti genetinę elektrotransformaciją termofilinėms bakterijoms *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup>.

**Darbo uždaviniai:**

1. Įvertinti *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> kamieno elektrotransformacijos efektyvumą nuo kompetentinių ląstelių ruošimo bei transformantų išsėjimo sąlygų.
2. Įvertinti *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> kamieno elektrotransformacijos efektyvumą nuo elektrinio lauko parametrų bei DNR kiekio.
3. Įvertinti *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> genetinę transformaciją naudojant stačiakampio formos elektrinio lauko bangų elektroporatorių keičiant transformacijos elektrinio lauko parametrus.
4. Įvertinti Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros mikroorganizmų kolekcijoje esančių termofilinių bakterijų kamienų elektrotransformacijos efektyvumą optimizuotomis sąlygomis.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Termofilinės bakterijos

Ekstremofilai – tai organizmai, galintys prisitaikyti, išgyventi ar klestėti tokiose sąlygose, kuriose įprastai organizmai neišgyvena. Ekstremofilai skirstomi pagal kraštutines sąlygas, kuriose jie geba augti:

- Termofilai – aukštesnėje nei 45 °C temperatūroje;
- Psichofilai – žemesnėje kaip 10 °C temperatūroje;
- Acidofilai ir alkalifilai – ekstremaliose pH ribose (pH<5 ir pH>9);
- Halofilai – esant didelei druskų koncentracijai (200–5900 mM);
- Sausoje aplinkoje gyvenantys mikroorganizmai (vandens aktyvumas <0,75);
- Radiotolerantiški, kurie yra atsparūs UV spinduliams (Orellana ir kt., 2018).

Termofilai laikomi geriausiai ištirtais ekstremofilais. Termofiliniai mikroorganizmai, atsižvelgiant į optimalios augimo temperatūros ( $T_{opt}$ ) diapozoną, skirstomi į 3 grupes: 1) nuosaikūs termofilai ( $T_{opt}$  45–70 °C), 2) ekstremalūs termofilai ( $T_{opt} \geq 70$  °C) ir 3) hipertermofilai ( $T_{opt} \geq 80$  °C) (Zeldes ir kt., 2015). Yra žinoma, kad gebėjimas augti aukštoje temperatūroje yra labiausiai paplitęs tarp archėjų, mažiau tarp bakterijų, o tarp eukariotų termofilų praktiškai nėra (Hickey ir Singer, 2004).

Termofilinės bakterijos gali būti tiek granteigiamos arba gramneigiamos, tiek aerobai arba anaerobai, bei kai kurios iš jų geba sudaryti endosporas (Mohammad ir kt., 2017). Termofilinės bakterijos priskiriamos įvairioms gentims, pavyzdžiui, *Clostridium* spp., *Thermoanaerobacter* spp., *Caldicellulosiruptor* spp., *Thermococcus* spp., *Geobacillus* spp. (Vavitsas ir kt., 2022), *Anoxybacillus* spp., *Brevibacillus* spp. bei keletai kitų (Boteva ir Kambourova, 2018). Tarp minėtų genčių *Geobacillus* spp. yra vienos iš populiariausių biotechnologijoje naudojamų termofilinių bakterijų. Ši gentis apima termofilinių granteigiamų lazdelės formos bakterijų grupę, kurią sudaro obligatiniai aerobai, denitrifikuojantys ir fakultatyviniai anaerobai. Nors geobacilos yra priskiriamos nuosaikiems termofilams, kurių optimali augimo temperatūra paprastai būna 45–75 °C (Vavitsas ir kt., 2022), tačiau gali siekti ir 35 °C ar 80 °C priklausomai nuo kamieno (Zeigler, 2014).

Termofilinės bakterijos yra aptinkamos labai įvairiose ekologinėse nišose, tiek jūrinėse, tiek sausumos. Paprastai paplitusios tokiose vietose kaip, geoterminiai vandenys, karštosios versmės, giliavandenės hidroterminės zonos, vandenys virš geotermiškai aktyvių sluoksnių (Orellana ir kt., 2018). Taip pat gali būti aptinkamos ir žmogaus sukurtoje karštoje aplinkoje, pavyzdžiui, komposto krūvose, vandens šildytuvuose ar įvairiuose pramoninių procesų įrenginiuose (Mehta ir kt., 2016).



Įdomu tai, kad termofilinės bakterijos buvo aptiktos tokios temperatūros aplinkoje, kuri prieštarauja šių ekstremofilų prigimčiai ir jų fiziologiniai aktyvumai tokiomis sąlygomis palaikomi minimaliai arba išvis nepalaikomi (žr. 1.1 lentelė). Ne viename moksliniame šaltinyje aprašyta, kad tiek termofilinės bakterijos, kurios geba formuoti endosporas, tiek jų neformuojančios, aptiktos tokiose vietose, kurių temperatūra gali būti žemesnė nei 25 °C ar net žemiau 0 °C, pavyzdžiui, amžinojo įšalo aplinkoje, šalto vandenyno nuosėdose, vėsiuose dirvožemiuose (Bartholomew ir Paik, 1966; Kelly ir kt., 2010; Rahman ir kt., 2004; Mironov ir kt., 2013; Bendia ir kt., 2018; Milojevic ir kt., 2022).

**1.1 lentelė.** Kelių termofilinių mikroorganizmų, išskirtų iš šaltos aplinkos, pavyzdžiai (Milojevic ir kt., 2022).

<b>Mikroorganizmas</b>	<b>Psichrobiontinės aplinkos ir jos temperatūra</b>	<b>Nuoroda</b>
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Jūros nuosėdos iš žemyninio šlaito baseinų nuo Ensenados, Meksikos iki Santa Catalina salos (~4 °C).	(Bartholomew ir Paik, 1966)
53 termofilinės, aerobinės, sporas formuojančios ir sporų nesudarančios bakterijos; <i>Geobacillus thermoleovorans</i> ; <i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	Dirvožemis Šiaurės Airijoje (iki 25 °C).	(Rahman ir kt., 2004)
Termofilinės sporų nesudarančios <i>Geobacillus</i> genties bakterijos	Amžinasis įšalas iš Apgaulės salos ( <i>angl.</i> Deception island) vulkaninių nuosėdinių uolienu ( $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ )	(Mironov ir kt., 2013)
<i>Geobacillus</i> spp. <i>Thermobacterium</i> spp.	Islandijos bazaltinis ir riolitinis stiklas bei mineralai, subarktinė aplinka (nuo $-20,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $-44,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ )	(Kelly ir kt., 2010)
Termofilinės <i>Geobacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Anoxybacillus</i> , <i>Thermus</i> ir <i>Bacillales</i> spp.	Ledynai, Apgaulės ( <i>angl.</i> Deception) ugnikalnis (0 °C)	(Bendia ir kt., 2018)

Nėra tiksliai aišku, kaip įvyko termofilų išplitimas į psichrobiontinę aplinką bei kokie molekuliniai mechanizmai „įsijungia“ termofilams būnant tokiomis sąlygomis. Tyrimai gana apsunkinti dėl sudėtingo termofilų auginimo laboratorinėmis sąlygomis sukurtoje žemoje temperatūroje (Milojevic ir kt., 2022).

Dar žinoma, kad termofilai geba egzistuoti ne tik karštoje bei šaltoje aplinkoje, bet gali turėti ir daugiau ekstremofilinių savybių. Pavyzdžiui, *Geobacillus* spp. turinčios metalų, slėgio ir radiacijos toleranciją ar *Anoxybacillus flavithermus* – metalų toleranciją ir atsparumą radiacijai. Šie mikroorganizmai dėl išskirtinių poliekstremofilinių savybių mokslininkams išlieka labai įdomiu ir potencialą turinčiu objektu (Milojevic ir kt., 2022).

## 1.2 Termofilinės bakterijos kaip biotechnologijų šeimininkas

Per pastaruosius dešimtmečius termofilinės bakterijos sulaukė itin didelio susidomėjimo biotechnologijose, ypač baltojoje, kuri apima įvairių pramoninių, cheminių medžiagų bei energijos gamybą ir perdirbimą. Termofilinės bakterijos yra labai įdomus tyrimo objektas turintis nemažą biotechnologinę bei ekonominę vertę ir privalumų prieš mezofilinius mikroorganizmus (Urbieta ir kt., 2015).

Termofiliniai mikroorganizmai pasižymi termostabilių metabolitų, makromolekulių ir fermentų gamyba ir yra svarbūs kaip biokatalizatoriai pramoninėje biotechnologijoje. Visų pirma, aukštoje temperatūroje mikroorganizmų augimas žymiai greitesnis. Taip pat dėl didesnio vykstančių biocheminių reakcijų greičio ir geresnio substratų tirpumo, produkto susidarymas vyksta greičiau. Kitas svarbus aspektas yra mažesnė mikrobiologinio užterštumo rizika. Paprastai termofilinės bakterijos yra nepatogeniški mikroorganizmai, o jų augimo sąlygos yra nepalankios kitų mikroorganizmų augimui. Tokios sąlygos nulemia įvairių patogenų žūtį ar jų augimo sustabdymą. Taip pat fermentacija aukštoje temperatūroje palengvina lakiųjų junginių gavimą. Termofilinių mikroorganizmų naudojimas naudingas iš ekonominės pusės. Aukštoje temperatūroje vykstantys procesai reikalauja mažesnių energijos sąnaudų, nes metabolinės reakcijos vyksta greičiau ir papildomai nereikalauja fermentatorių atšaldymo po įvairių gamybos etapų (Urbieta ir kt., 2015).

Tačiau, ar termofilinės bakterijos gali pakeisti mezofilines bakterijas biotechnologijose? Vavitsas ir kt. (2022) į tai žvelgia gana kritiškai ir mano, kad termofilai dar nėra pilnai pasirengę pakeisti mezofilų kaip bendrųjų biotechnologijų šeimininkų dėl kelių priežasčių. Visų pirma, termofilinių bakterijų naudojimas dar gana apsunkintas dėl nepakankamai ištirtos jų genetikos ir metabolinių procesų, genetinei manipuliacijai trūkstamų genų inžinerijos įrankių (Taylor ir kt., 2011; Vavitsas ir kt., 2022). Taip pat didžioji dalis biotechnologijose naudojamų gamybos ar fermentacijos procesų yra paremti mezofiliniais mikroorganizmais (Vavitsas ir kt., 2022). Perėjimas prie termofilinių bakterijų naudojimo kaip pagrindinio šeimininko gali būti sudėtingas, pareikalauti didelių išteklių ne tik procesų ar įrankių kūrimui, bet jų palaikymui ir tolimesniam vystymui. Be to, termofilai nėra laikoma tinkamiausia mezofilinių baltymų heterologinės raiškos sistema dėl galimos baltymų denatūracijos ar žemo fermentinio aktyvumo (Vavitsas ir kt., 2022). Termofiliniai fermentai yra termostabilūs ir pasižymi aukštu kataliziniu aktyvumu aukštoje temperatūroje, tačiau vidutinėje temperatūroje jų katalizinis aktyvumas yra mažesnis nei mezofilinių fermentų analogų. Priešingai, mezofiliniai fermentai yra mažiau stabilūs aukštoje temperatūroje, tačiau pasižymi didesniu kataliziniu aktyvumu vidutinėje temperatūroje (Akanuma ir kt., 2019). Tai yra svarbūs aspektai, kurie apsunkina platų termofilinių bakterijų pritaikymą.

Nors termofilinių bakterijų panaudojimas kaip biotechnologijų šeimininko yra dar gana apribotas, tačiau dėl gebėjimo išgyventi/augti atšiauriomis sąlygomis bei turimų privalumų svarbių gamyboje, tyrėjus skatina tirti šiuos mikroorganizmus ir kurti bioinžinerinius įrankius siekiant išplėsti termofilinių bakterijų panaudojimo galimybes (Vavitsas ir kt., 2022).

### 1.3 Termofilinių bakterijų termostabilumas

Temperatūra tai vienas svarbiausių aplinkos veiksnių, kuris veikia mikroorganizmuose vykstančius ląstelės procesus. Ne visos temperatūros vienodai tinkamos gyviems organizmams augti ir funkcionuoti (Sang ir kt., 2020). Termofilų išgyvenimui ekstremaliomis sąlygomis turi būti palaikomos svarbiausios gyvybinės funkcijos: ląstelės plazminės membranos vientisumas bei visų makromolekulių, tokių kaip DNR, RNR bei baltymų, stabilumas (Hickey ir Singer, 2004).

Termofilams prisitaikyti ir išgyventi aukštoje temperatūroje padeda evoliucijos eigoje išvystytas adaptacijos mechanizmų rinkinys, kuris užtikrina jų fiziologines funkcijas ir stabilumą esant itin aukštai temperatūrai (Hickey ir Singer, 2004). Apie tai plačiau aptariama sekančiuose skyreliuose.

#### 1.3.1 Termofilinių bakterijų ląstelės membranos struktūra

Ląstelės plazminės membranos paskirtis – atskirti vidinę ląstelės dalį nuo išorinės aplinkos. Bakterijų ląstelės membrana susideda iš kelių komponentų: fosfolipidų dvisluoksniu ir jame įsiterpusių įvairių baltymų, atsakingų už signalo ar energijos perdavimą ir medžiagų transportavimą. Mikroorganizmo optimaliomis augimo sąlygomis plazminė membrana būna skystos kristalinės būsenos ir nepraleidžia didelės molekulinės masės junginių ir krūvį turinčių molekulių. Šios funkcijos turi būti palaikomos net esant stresinėms sąlygoms. Tačiau kylant temperatūrai, plazminė membrana patiria tam tikrus pokyčius – fosfolipidų padėtis membranoje tampa netvarkinga, padidėja membranos pralaidumas ir taip sukeliama ląstelės žūtis (Pollo ir kt., 2015). Siekiant to išvengti, termofiliniai mikroorganizmai turi strategijų, skirtų prisitaikyti prie aukštos temperatūros ir palaikyti ląstelės membraną funkcionalią ir nepažeistą (Koga, 2012).

Žinoma, kad membranų, sudarytų iš riebalų rūgščių esterių, pralaidumas labai priklauso nuo temperatūros, o jų fazių pereinamoji temperatūra nuo riebalų rūgščių struktūros. Kintant augimo temperatūrai, greitai reguliuojama membraninių lipidų struktūroje esančių riebalų rūgščių struktūra (Mehta ir kt., 2016), jų ilgis, išsišakojimas ir neprisotinimo laipsnis (Pollo ir kt., 2015). Termofilinės bakterijos daugiausia reguliuoja membranos pralaidumą padidindamos šakotosios grandinės izoriebalų rūgščių, sočiųjų riebalų rūgščių ir ilgos grandinės riebalų rūgščių kiekį. Tokiu būdu bandoma prisitaikyti prie stresinės aplinkos (Siliakus ir kt., 2017). Pavyzdžiui, termofilinių *Bacillus*

spp. kamienų, augančių 45–70 °C temperatūroje, izo-C15 kiekis (30–50 %) visada didesnis nei anteizo-C15 (<10 %). Tai rodo, kad temperatūros prisitaikymas esant karščiui reguliuojamas keičiant izo/anteizo riebalų rūgščių sudėtį (Koga, 2012).

Taip pat pastebėta, kad termofilinės bakterijos, gebančios augti aukštesnėje nei 70 °C temperatūroje, turi tokias lipidų rūšis, kurios primena tipiškus archėjų plazminės membranos lipidus – tetraeterius, dieterius ir tetraesterius. Pavyzdžiui, tetraesterių lipidai aptikti keliose termofilinėse *Thermoanaerobacter* spp. bakterijose ( $T_{\max}$  75–78 °C) bei tetraeterių lipidai – termofilinėse anaerobinėse *Thermotogales* genties bakterijose ( $T_{\max}$  90 °C) (Siliakus ir kt., 2017).

Kalbant apie termofilų membranos struktūrą, ją stabilizuoti padeda dar tokie junginiai, kaip hopanoidai (Ranawat ir Rawat, 2017). Šie junginiai yra svarbūs mikroorganizmų prisitaikymui prie ekstremalių sąlygų, įskaitant aukštą temperatūrą. Hopanoidai – tai pentaciklinių triterpenoidinių lipidų grupė (Zarzycki ir kt., 2017), kuri atlieka panašias funkcijas kaip steroliai esantys eukariotų membranose – kontroliuoja ląstelės membranos takumą. Šie junginiai geba įsiterpti į membranos dvisluoksnį ir sąveikaudami su kitais membranos komponentais suteikti stabilumo (Belin ir kt., 2018). Parodyta, kad *Alicyclobacillus acidocaldarius* bakterijų plazminėje membranoje gausu hopanoidinio junginio – tetrolio 1,2,3,4-tetrahidroksipentan-29-hopano. Nustatyta, kad temperatūrai pakilus nuo 60 iki 65 °C, šio junginio kiekis *A. acidocaldarius* bakterijose padidėja apie septynis kartus (Kolouchová ir kt., 2021). Taip pat žinoma, kad hopanoidų kiekis bakterijų plazminėje membranoje yra labai individualus ir priklauso nuo mikroorganizmo rūšies bei augimo sąlygų. Jų kiekis gali svyruoti nuo <1 % iki 90 % (Belin et al., 2018).

### 1.3.2 Prisitaikymas molekuliniam lygmenyje

Termofilams yra svarbu ne tik atlaikyti aukštą temperatūrą, bet tokioje aplinkoje išgyventi ir funkcionuoti. Norėdami išgyventi aukštos temperatūros žalingą poveikį, šie mikroorganizmai turi apsaugoti itin jautrias išoriniam stresui makromolekules, tokias kaip DNR ir RNR, nuo pažeidimų (Pollo ir kt., 2015).

Ilgą laiką buvo manoma, kad termofiliniai organizmai gyvenantys aukštoje temperatūroje pasižymi didesniu G+C kiekiu DNR struktūroje ir prisitaikymą prie tokių sąlygų nulemia padidėjęs vandenilinių jungčių skaičius. Šio gana logiško paaiškinimo patvirtinti nepavyko. Atlikus termofilinių ir mezofilinių bakterijų genomų sekoskaitą, nebuvo aptikta koreliacija tarp G+C kiekio genome ir optimalios augimo temperatūros. Nustatyta, kad termofilinių ir mezofilinių bakterijų G+C kiekis gali būti panašus, pavyzdžiui, termofilinių *Methanobacterium thermoautotrophicum* G+C kiekis 50,46 % (Hurst ir Merchant, 2001), *Geobacillus kaustophilus* – 52,1 % (Wang ir kt., 2015), tuo tarpu mezofilinės *Escherichia coli* bakterijos G+C kiekis siekia 51,37 % (Hurst ir Merchant,

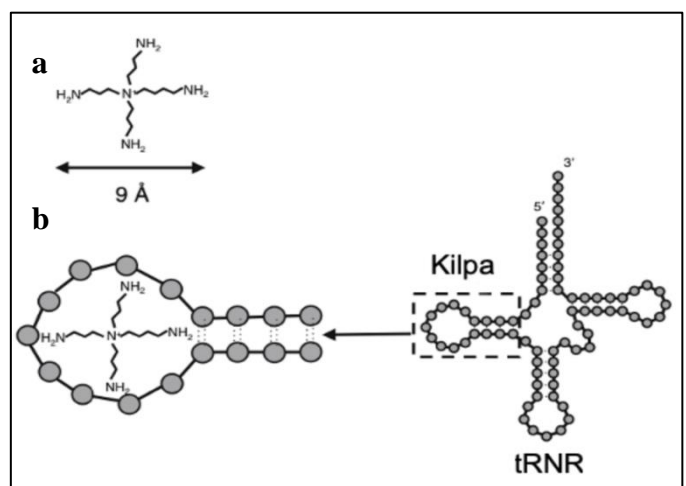
2001). Yra atvejų, kuomet termofilinių bakterijų G+C kiekis gali būti net gerokai mažesnis už mezofilinių, pavyzdžiui, *Caldicellulosiruptor hydrothermalis*, kurių  $T_{opt} = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , G+C kiekis siekia tik 35 % (Wang ir kt., 2015). Tad galima teigti, kad didelis G+C kiekis nėra termofiliškumo rodiklis (Galtier ir Lobry, 1997, Hurst ir Merchant, 2001).

Tačiau parodyta, kad G+C kiekis termofiluose yra reikšmingas dvigrandėse RNR (tRNR ir rRNR) molekulės srityse, kuriose tarp guanino ir citozino susidarę vandeniniai ryšiai šias sritis stabilizuoja (Galtier ir Lobry, 1997). Tačiau, kodėl koreliacija matoma dvigrandėse RNR molekulės regionuose, bet ne dvigrandėje DNR? Manoma, kad tai turi daug didesnę poveikį RNR molekulės stabilumui, nei dvigrandei DNR, kadangi suporuotos RNR molekulės sritys yra ženkliai trumpesnės (Hickey ir Singer, 2004).

Taip pat svarbūs yra fermentai suteikiantys DNR molekulės stabilumą (Urbietė ir kt., 2015). Literatūroje teigiama, kad atvirkštinė girazė yra reikšmingas fermentas prisidedantis prie termofilinių mikroorganizmų makromolekulių stabilumo. Tai yra nuo ATP priklausomas fermentas, sukeliantis teigiamą superspiralinį DNR susisukimą ir užkertantis kelią makromolekulės denatūracijai. Nors minima, kad šis fermentas labiausiai paplitęs tarp termofilų, kurių optimali augimo temperatūra yra aukštesnė nei  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tačiau aptinkamas ir žemesnėje temperatūroje augančiuose termofiluose. Atvirkštinė girazė laikomas išskirtiniu termofilinių bakterijų ir archėjų bruožu, nes šis fermentas nebuvo aptiktas jokiuose mezofiliniuose organizmuose (Lipscomb ir kt., 2017).

Dar žinoma, kad tiek DNR, tiek RNR stabilumui palaikyti aukštoje temperatūroje padeda poliaminai. Šie junginiai savo struktūroje turi daugiau nei vieną amino grupę, kurios jungiasi su neigiamai įkrautomis DNR ir RNR molekulėms fosfatų grupėmis, taip apsaugodamos nuo terminės denatūracijos. Poliaminai pagal struktūrą skirstomi į: 1) ilguosius, kurie stabilizuoja dvigrandės DNR ir RNR stiebų fragmentus, ir 2) šakotuosius poliaminus, kurie stabilizuoja RNR kilpas (žr. 1.1 pav.) Poliaminai taip pat svarbūs ir kitose funkcijose, pavyzdžiui, dalyvauja translacijoje aukštoje temperatūroje. Nustatyta, kad termofilų kamienuose, kuriuose buvo pašalinti genai atsakingi už poliaminų sintezę, ląstelių augimas ir termostabilumas ženkliai sumažėjo (Fujiwara et al., 2015).

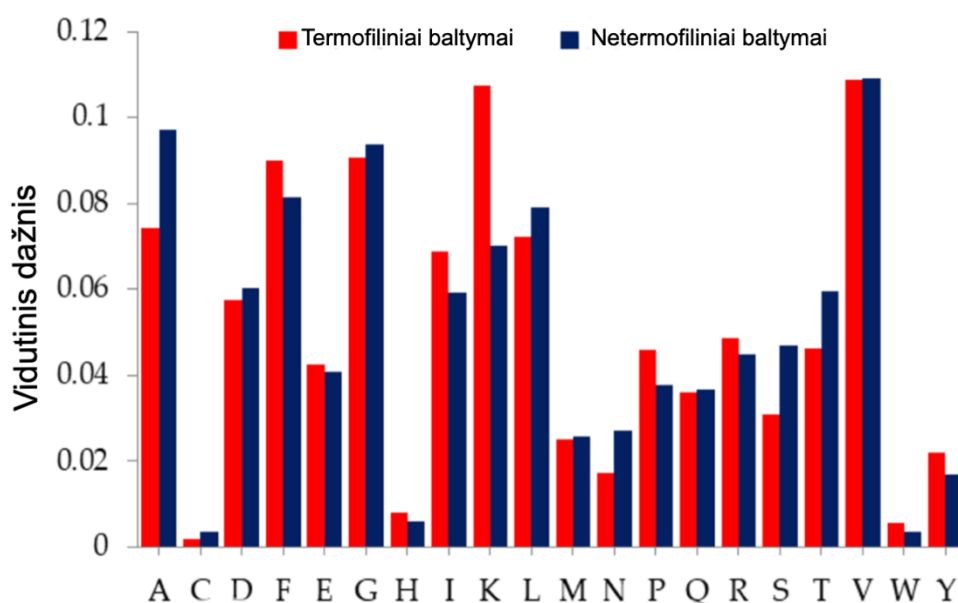
**1.1 pav.** a) Šakotosios grandinės poliaminas – N4 bis(aminopropil) spermidinas; b) Galimas surišimo būdas tarp šakotosios grandinės poliaminų ir tRNR kilpos (Fujiwara ir kt., 2015).



### 1.3.3 Termostabilių baltymų ypatumai

Termofilinių mikroorganizmų baltymai, kaip ir kitos makromolekulės, turi išlaikyti savo natūralias struktūras ekstremaliomis sąlygomis, kuriomis paprastai denatūruojasi mezofiliniai baltymai. Nors žinoma, kad tiek termofiliniai, tiek mezofiliniai baltymų homologai turi panašias aminorūgščių sekas ir katalizinius mechanizmus, tačiau ilgai nebuvo aišku, kas nulemia termofilinių baltymų stabilumą aukštoje temperatūroje (Hollien ir Marqusee, 1999). Atlikta nemažai palyginamųjų mezofilinių ir termofilinių baltymų tyrimų siekiant identifikuoti baltymų stabilizavimo mechanizmus (Szilágyi ir Závodszy, 2000; Gromiha ir kt., 2013; Ahmed ir kt., 2022).

Visų pirma, termiškai stabilūs baltymai į pirminę aminorūgščių struktūrą įveda tam tikras papildomas aminorūgštis. Ahmed et al. (2022) atlikta termofilinių ir netermofilinių baltymų analogų struktūrų palyginamoji analizė parodė (žr. 1.2 pav.), kad termofiliniuose baltymuose gausiau aptinkama **įkrautų** (lizinas (K), argininas (R), glutamo rūgštis (E), histidinas (H)) ir **aromatinių** (fenilalaninas (F), triptofanas (W), tirozinas (Y)) aminorūgščių. Taip pat matoma, kad kai kurių **hidrofobinių** aminorūgščių (izoleucinas (I) ir prolinas (P)) yra daugiau termofilinių baltymų struktūroje. Dėl šių aminorūgščių sukūriama didesnio hidrofobiškumo susiformuoja sandari, kompaktiška ir stabili baltymo branduolio struktūra. Teigiama, kad hidrofobiškumas yra pagrindinis baltymų termostabilumo kriterijus (Gromiha ir kt., 2013). Termostabilių baltymų struktūroje aptikta mažiau **termolabilių** (cisteinas (C), leucinas (L), serinas (S), glutaminas (Q), asparaginas (N)) bei **trumpos šoninės grandinės** (alaninas (A) ir glicinas (G)) aminorūgščių. Manoma, kad pastarosios dėl savo struktūros ypatybių yra per daug „lanksčios“ ir nėra tinkamos standžiai baltymo struktūrai sudaryti (Ahmed ir kt., 2022).



**1.2 pav.** Vidutiniai aminorūgščių dažniai termofiliniuose baltymuose ir jų netermofiliniuose analoguose (Ahmed ir kt., 2022).

Kitas svarbus aspektas – tarpmolekulinės sąveikos. Padidėjęs krūvį turinčių aminorūgščių kiekis suformuoja įvairias tarpmolekulinės sąveikas, t. y. papildomus vandenilinius ryšius, jonines sąveikas, tiek baltymo išorinėje dalyje, tiek šerdyje ir taip padeda suformuoti kompaktišką struktūrą. Taip pat stebimas padidėjęs aromatinių sąveikų skaičius dėl papildomų aromatinių aminorūgščių įvedimo į struktūrą (Ahmed ir kt., 2022).

Termostabilumui įtakos turi ne tik susidariusios papildomos sąveikos, bet ir šių ryšių cheminės savybės. Nustatyta, kad termofilų baltymuose ryšiai pasižymi trumpesniu jungčių ilgiu ir platesniu jungties kampu, kuris suteikia baltymui terminio stabilumo (Ahmed ir kt., 2022). Pavyzdžiui, termofiliniams baltymams yra būdingas didesnis jonų porų, pasižyminčiu mažesniu atstumu ( $<4 \text{ \AA}$ ), kiekis. Mažesnis atstumas tarp jonų porų sustiprina jų ryšį. Tuo tarpu, mezofiliniuose baltymuose atstumas tarp jonų porų paprastai siekia nuo 6 iki 8  $\text{Å}$  (Szilágyi ir Závodszy, 2000). Taip pat prie termostabilumo prisideda paviršiaus kilpų sutrumpinimas, kilpų stabilizavimas metalo jonais bei įvairios papildomos konstrukcijos (spiralių ir klosčių struktūros), kurios užpildo baltymo ertmę ir padidina sandarumą (Ahmed ir kt., 2022).

Prie termofilinių baltymų struktūros palaikymo aukštoje temperatūroje prisideda šaperonai. Šie baltymai reaguoja į karščio šoką ir apsaugo ląstelę nuo aukštos temperatūros sukeliamų pažeidimų. Taip pat yra atsakingi už baltymų stabilizavimą bei tinkamą jų sulankstymą. Termofilinėse bakterijose svarbūs tokie šaperonai, kaip ClpB, ClpA, ClpC, HslU, DnaK, GroEL, GroES, HtpG ir kiti (Mangrola ir kt., 2022). Šių šaperoninių baltymų padidėjimas esant temperatūros pokyčiams buvo pastebėtas termofilinėse *Thermoanaerobacter tengcongensis* ir *Thermotoga maritima* bakterijose (Wang ir kt., 2015).

Šie veiksniai, kurie naudojami skirtingų termofilinių baltymų ir fermentų, suteikia didesnę termostabilumą ir atsparumą cheminei denatūracijai. Dėl pakitusios aminorūgščių sekos, susidariusių stipresnių molekulinų sąveikų bei kompaktiškesnės struktūros, termofiliniai baltymai geba išsilaikyti aukštesnėje temperatūroje, likti atsparūs ir išlaikyti fermentinį aktyvumą tirpikliuose bei paviršinio aktyvumo medžiagose (Ahmed ir kt., 2022; Mangrola ir kt., 2022).

## 1.4 Termofilinių bakterijų pritaikymas biotechnologijose

### 1.4.1 Termostabilūs baltymai

Termostabilūs baltymai dėl savo pavydėtinių savybių yra svarbūs tiek pramoniniuose procesuose, tiek mokslinių ir klinikinių laboratorijų veikloje. Laboratorijose tokius baltymus patogiau saugoti bei galima naudoti eksperimentuose, kuriuose yra reikalinga aukšta temperatūra (Moon ir kt., 2019). Vienas iš geriausiai žinomų pavyzdžių – termofilinės *Thermus aquaticus* bakterijos *Taq* DNR

polimerazė, kuri naudojama PGR (Chien ir kt., 1976). Pramonėje, kaip ir buvo minėta 1.2 skyriuje, termostabilūs baltymai svarbūs dėl geresnių kinetinių savybių ir didesnio atsparumo įvairiems organiniams tirpikliams (Moon ir kt., 2019; Mangrola ir kt., 2022). Termofilinių bakterijų baltymus galima pritaikyti labai įvairiose pramonės šakose, tokiose kaip farmacijos, ploviklių, maisto, tekstilės, popieriaus, odos ir pašarų gamyba (Atalah ir kt., 2019). Žemiau pateikiamos pagrindinės fermentų grupės gaunamos iš termofilinių bakterijų, kurios plačiai naudojamos pramonėje:

- **Amilazės (EC 3.2.1.1).** Iš termofilinių bakterijų gaunamos  $\alpha$  tipo amilazės, kurių funkcija – skaidyti  $\alpha$ -(1-4) glikozidinius ryšius krakmolo molekulėse. Amilazės yra svarbios įvairiose maisto, fermentacijos, tekstilės, popieriaus ar farmacijos šakose. Taip pat tai vieni pagrindinių fermentų naudojamų pramoniniame krakmolo perdirbime. Krakmolo perdirbimas apima pagrindinius du etapus, kurie vykdomi esant aukštai temperatūrai: krakmolo granulių skystinimą ir cukrinimą, o šie procesai vyksta esant 95 °C ir 60 °C temperatūrai (Rigoldi ir kt., 2018). Nustatyta, kad amilazės aktyvumu pasižymi termofilinės *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus* (Elyasi Far ir kt., 2020), *Bacillus subtilis* JS-2004 (Asgher ir kt., 2007).
- **Lipazės (EC 3.1.1.3).** Tai karboksilesterazės, kurios katalizuoja ilgos grandinės acilglicerolių hidrolizę, sudarydamos digliceridus, monogliceridus, riebalų rūgštis ir glicerolį. Lipazės naudojamos maisto pramonėje, ploviklių, popieriaus, odos gamyboje, riebalų bei aliejaus perdirbime (Rigoldi ir kt., 2018). Lipaziniu aktyvumu pasižymi tokie termofilai kaip *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee ir kt., 2001), *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1 (Yu ir kt., 2010), *Bacillus coagulans* BTS-3 (Kumar ir kt., 2005), *Geobacillus* sp. SBS-4S (Tayyab, 2011), *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134 (Bakir ir Metin, 2016).
- **Ksilanazės (EC 3.2.1.8).** Šie fermentai dalyvauja hemiceliuliozės skaidyme iki monomerinių cukrų. Ksilanazių panaudojimas yra gana platus: nuo popieriaus, maisto, gyvulių pašarų gamybos iki farmacijos pramonės (Rigoldi ir kt., 2018). Termofilinės bakterijos yra puikus termofilinių ksilanazių šaltinis, o bakterijos priklausančios *Geobacillus* genčiai laikomos plačiausiai aprašytu termostabilių ksilanazių šaltiniu (Chadha ir kt., 2019).
- **Kiti fermentai:** transaminazės (EC 2.6.1.X), glutamato dehidrogenazės (EC 1.4.1.2/1.4.1.3/1.4.1.4), nitrilazės (EC 3.5.5.1) ir lakazės (EC 1.3.10.2) (Atalah ir kt., 2019).

Šiandien daugelis biotechnologinių įmonių nuolat ieško naujų ir pritaiko esamus genetinės manipuliacijos įrankius, siekiant gauti didesnius kiekius bei geresnio katalizinio veikimo fermentus (Han ir kt., 2019).



### 1.4.2 Termofilinių bakterijų sintetinės nanodalelės

Metalų nanodalelės tai nanometrinių dydžio medžiagos, pasižyminčios unikaliomis fizikinėmis, cheminėmis ir biologinėmis savybėmis. Šios medžiagos turi didžiulį pritaikomumo potencialą labai įvairiose srityse, pavyzdžiui, energetikoje, farmacijoje, medicinoje bei elektronikoje (Iravani, 2014). Metalų nanodalelių sintezei naudojami įvairūs cheminiai ir fiziniai metodai. Tačiau šie metodai yra gana problematiški, pasižymintys dideliu energijos suvartojimu ir kaina, o jų sintezė apima toksiškų tirpiklių naudojimą ir kenksmingų šalutinių produktų susidarymą. Siekiant sukurti ekonomiškas, aplinkai ir žmogui netoksiškas metalų nanodaleles, jų sintezei pasitelkiami mikroorganizmai (Atalah ir kt., 2022). Per pastaruosius metus pateikta nemažai termofilinių bakterijų pavyzdžių, pritaikytų metalų nanodalelių, tokių kaip sidabro ar aukso, sintezėje (Correa-Llantén ir kt., 2013; Erasmus ir kt., 2014; Deljou ir Goudarzi, 2016; Rehman ir kt., 2019; Cekuolyte ir kt., 2023).

Termofilinės bakterijos geba sintetinti metalų nanodaleles iš įvairių neorganinių junginių, pasitelkiant ekstraląstelinius arba tarpląstelinius procesus. Mikroorganizmai absorbuoja metalo jonus, esančius aplinkoje, ir redukcijos metu paverčia juos į elementinę formą (Koul ir kt., 2021). Vienos iš plačiausiai aprašytų termofilinių bakterijų, kurios gali būti pritaikytos ekologiškoje metalų nanodalelių sintezėje – *Geobacillus* spp. bakterijos. Nustatyta, kad termofilinis *Geobacillus* sp. ID17 kamienas geba sintetinti aukso nanodaleles tarpląsteliniu būdu ir biosintezės procesui naudoja NADH kaip kofaktorių. Gautos nanodalelės būna stabilios 65 °C temperatūroje (Correa-Llantén ir kt., 2013). Kitas tyrimas atskleidė didelį *Geobacillus* spp. potencialą sidabro nanodalelių sintezėje. Buvo parodyta, kad keturi *Geobacillus* spp. kamienai 18, 25, 95 ir 612 vykdo ekstraląstelinę sidabro nanodalelių sintezę. Procese dalyvauja nitratų reduktazės, kurios yra pagrindiniai fermentai, tarpininkaujantys sidabro nanodalelių biosintezėje iš AgNO<sub>3</sub> (Cekuolyte ir kt., 2023).

Taip pat žinoma kitų termofilinių bakterijų gebančių sintetinti metalų nanodaleles, pavyzdžiui, *Bacillus haynesii* geba sintetinti ZnO nanodaleles (Rehman ir kt., 2019), *Bacillus* sp. AZ1 – sidabro nanodaleles (Deljou ir Goudarzi, 2016), o *Thermus scotoductus* SA-01 – aukso nanodaleles (Erasmus ir kt., 2014).

### 1.4.3 Biokuro gamyba

Ne vienerius metus pasaulis patiria energetikos bei aplinkosaugos krizę ir vis didėja susirūpinimas klimato kaita ir mažėjančiomis iškastinio kuro atsargomis. Siekiant tokią situaciją sušvelninti, daug dėmesio skiriama bioenergetikai ir iškastinio kuro alternatyvai – biokurui. Biokuras gali būti gaunamas 2 būdais: 1) fermentuojant krakmolą ar lignoceliuliozės biomasę arba 2) atliekant lipidų ekstrakciją iš augalų ar mikroorganizmų. Geriausiai žinomos biokuro rūšys yra bioetanolis, biodyzelinas, biobutanolis, biožibalas ir biovandenilis (Ahmad ir Qazi, 2014; Urbietta ir kt., 2015;

Jiang ir kt., 2017). Biokuro gamyboje bakterijos yra svarbi mikroorganizmų grupė, dėl turimo plataus substratų spektro. Jos yra itin geras pasirinkimas gaminant bioetanolį iš sudėtingesnės biomasės, pavyzdžiui, pentozų, heksozų, disacharidų ir kai kuriais atvejais net polimerų, tokių kaip celiuliozė, pektinas ir ksilanas (Jiang ir kt., 2017).

Biokuro gamyba tai dar viena sritis, kurioje termofilai lenkia mezofilinius mikroorganizmus. Visų pirma, dėl savo savybių tokių kaip, gebėjimo toleruoti pH ar temperatūros svyravimus, žymiai greitesnio augimo. Sprendimas biokuro gamybai naudoti termofilinius mikroorganizmus ir gamybos procesus atlikti aukštoje temperatūroje laikomas tvaresniu lyginant su mezofiliniais mikroorganizmais. Pirmiausia, nereikalingas aušinimas po pirminio žaliavos apdorojimo ir pofermentinio distiliavimo proceso. Kitas svarbus aspektas – dujų tirpumas. Žinoma, kad aukštesnėje temperatūroje sumažėja dujų tirpumas, o tai padeda palaikyti anaerobinę aplinką, kuri būtina fermentacijos procesui ir tuo pačiu sumažina užteršimo riziką aerobiniais mikroorganizmais. Palaikant tokias ekstremalias sąlygas iš esmės procesas nereikalauja papildomo sterilinimo prieš gamybos procesą, todėl taip dar sutaupoma išlaidų. Pagrindinės termofilinių bakterijų gentys naudojamos biokuro gamyboje yra šios: *Geobacillus* spp., *Thermoanaerobacter* spp., *Thermoanaerobacterium* spp., termofilinės *Clostridia* spp., *Caldicellulosiruptor* spp. (Sveinsdottir ir kt., 2011; Ahmad ir Qazi, 2014).

Tačiau plačiam termofilinių bakterijų panaudojimui bioetanolio gamybai trūksta genų inžinerijos įrankių bei mokslinių tyrimų siekiant išspręsti tokias problemas, kaip mažą bakterijų etanolio toleravimą, gamybos išėigas ar fermentacijos metu susidarantių dideliais kiekiais šalutinių produktų mažinimą (Sveinsdottir ir kt., 2011; Ahmad ir Qazi, 2014).

#### 1.4.4 Termofilinės bakterijos bioremediacijoje

Dėl nuolat besiplečiančios pramoninės veiklos didėja užterštumas sunkiaisiais metalais, naftos produktais, plastikais ir kitais kenksmingais bei sunkiai skaidomais junginiais. Šie teršalai patenka į dirvožemį, vandenį bei orą, o šių ekosistemų užteršimas sukelia įvairias visuomenės ir aplinkos sveikatos problemas. Įprasti fiziniai ir cheminiai aplinkos valymo procesai nėra pakankamai veiksmingi, reikalauja didelių išteklių, todėl pasitelkiami ekologiški bei pigesni biologinio valymo metodai. Vienas iš jų – bioremediacija, kurios metu mikroorganizmų pagalba įvairūs cheminiai junginiai yra neutralizuojami (Vishwakarma ir kt., 2020).

Ankstesniame skyrelyje buvo paminėta, kad termofilinės bakterijos yra poliekstremofilai, kurie prisitaikę gyventi su įvairiais nepalankiais aplinkos parametrais. Šie mikroorganizmai gali būti aptinkami tokioje natūralioje aplinkoje, kuri turtinga sunkiaisiais metalais. Šios bakterijos pasižymi ypatingomis metabolinėmis strategijomis, kurios toksiškų metalų junginius verčia į mažiau toksišką

formą. Termofilinės bakterijos geba neutralizuoti įvairius metalus (Mn (IV), Cr (VI), Co (III), Mo (VI), Au (I, III) ir Hg (II)) (Abo-Alkasem ir kt., 2023) ir radionuklidus (U (VI), Tc (VII), Am, Pu) (Kaushik ir kt., 2021).

Termofilinės bakterijos geba skaidyti įvairius naftos junginius. Pastebėta, kad termofiliniai *Bacillaceae* šeimos nariai geba naudoti žalią, neapdorotą naftą (PAH ir NOS-asfalteno junginius) kaip vienintelį anglies šaltinį, augimui ir ląstelių dauginimuisi (Rajkumari ir kt., 2019). Nustatyta, kad *Bacillus licheniformis* MN6, *Geobacillus stearothermophilus* IR4, *Geobacillus thermoparaffinivorans* IR2 kamienai pasižymi dideliu angliavandenilinių junginių biologinio skaidymo efektyvumu (82–94 %). Parodyta, kad šios bakterijos kaip vienintelį anglies šaltinį naudoja angliavandenilius ir stebimas padidėjęs ekstraląstelinis medžiagų tokių kaip, alkano hidroksilazių, alkoholio dehidrogenazių ir lipazių padidėjimas (Elumalai ir kt., 2019).

Plastikas laikomas vienu didžiausiu aplinkos taršos šaltiniu, kuris ateina iš kasdienio žmonių gyvenimo ir pramoninės veiklos. Nustatyta, kad termofilinės bakterijos yra potencialios plastiko skaidytojos. Parodyta, kad termofilinis *Anoxybacillus rupiensis* Ir3 kamienas skaido nailoną 6. Šios bakterijos nailoną naudoja kaip vienintelį anglies ir azoto šaltinį augant minimalios sudėties terpėje 65 °C temperatūroje. *Geobacillus pallidus* 26 kamienas geba ardyti net sudėtingesnės struktūros nailoną, pavyzdžiui, nailoną 12, esant 60 °C temperatūrai (Atanasova ir kt., 2021). Taip pat nustatyta, kad *Anoxybacillus flavithermus* Gecek4s ir termofilinis *Bacillus sp.* BCBT21 kamienai geba skaidyti polietileną (Akarsu ir kt., 2022).

## 1.5 Genetinės transformacijos metodai

Atliekant genetines manipuliacijas ne modeliniuose organizmuose, tokiuose kaip, *E. coli* ar *Saccharomyces cerevisiae*, susiduriama su keturiomis pagrindinėmis problemomis. Tai apima: 1) svetimos DNR įsisavinimą į ląstelę; 2) vietines imunines sistemas, kurios degradouoja svetimą DNR 3) transformantų atranką ir 4) stabilų svetimos DNR palaikymą ląstelėje šeimininkėje. Pirmas svarbus žingsnis, norint sėkmingai genetiškai modifikuoti ląstelę, yra efektyvus svetimos genetinės medžiagos pernešimas į tikslinį mikroorganizmą (Riley ir Guss, 2021). Termofilinės bakterijos pasižymi unikaliomis fiziologinėmis savybėmis, kurios šį procesą apsunkina. Mažo efektyvumo genetinę transformaciją nulemia palyginti sudėtinga ląstelės sienelės struktūra, silpnas jos pralaidumas ir endosporų formavimas (Lin ir Xu, 2013).

Pagrindinės genetinės medžiagos pernešimo strategijos naudojamos termofilinėms bakterijoms yra protoplastų transformacija, konjugacija ir elektroporacija (Riley ir Guss, 2021). Yra žinoma, kad bakterijų, įskaitant termofilinių, gebėjimas efektyviai transformuoti ir priimti išorinę DNR yra individualus rūšiai ir kamienui, todėl transformuojamų kamienų paieška bei nuolatinis

transformacijos protokolų tobulinimas yra itin svarbūs (Drejer ir kt., 2018). 1 priede yra pateikiami literatūroje aprašyti transformuojamų termofilinių bakterijų kamienų pavyzdžiai bei jų transformacijos charakteristikos.

### 1.5.1 Protoplastų transformacija

Nors protoplastų transformacija dabar dažniausiai naudojama eukariotinių ląstelių, ypač augalų, transfekcijai atlikti (Songstad ir kt., 1995), tačiau tai vienas pirmųjų genetinės medžiagos pernešimo būdų pradėtas taikyti termofilinėms *Geobacillus* spp. bakterijoms (Wu ir Welker, 1989).

Protoplastų transformacija apima tris etapus: 1) protoplastų paruošimą, 2) protoplastų transformaciją naudojant polietilenglikolį bei 3) ląstelių regeneraciją (Chang ir Cohen, 1979). Visų pirma, protoplastai paruošiami naudojant lizocimą. Bakterijų ląstelės sienelės pagrindinis komponentas yra peptidoglikanas, kuris ląstelei suformuoja itin stiprų fizinį barjerą. Siekiant palengvinti genetinės medžiagos pernašą į ląsteles, ląstelės sienelė su peptidoglikanu turi būti pašalinta. Tam naudojamas antimikrobinis fermentas lizocimas, kuris skaido pagrindinę glikozidinę jungtį esančią bakterijų ląstelių sienelių peptidoglikane (Songstad ir kt., 1995). Sekantis etapas – protoplastų transformacija. Paruošti protoplastai sumaišomi su plazmidine DNR ir atliekama transformacija. Tam naudojamas polietilenglikolis (PEG), kuris palengvina išorinės DNR patekimą į ląstelės vidų. Po transformacijos ląstelės regeneruojamos ir užsėjamos ant selektyvios terpės (Chang ir Cohen, 1979). Pirmasis protoplastų transformacijos protokolas sėkmingai pritaikytas mezofilinėms *Bacillus subtilis* bakterijoms (Chang ir Cohen, 1979), vėliau pritaikytas ir kitiems *Bacillus* spp. kamienams (Akasmatsu ir Sekiguchi, 1984; Vehmaanperä, 1989).

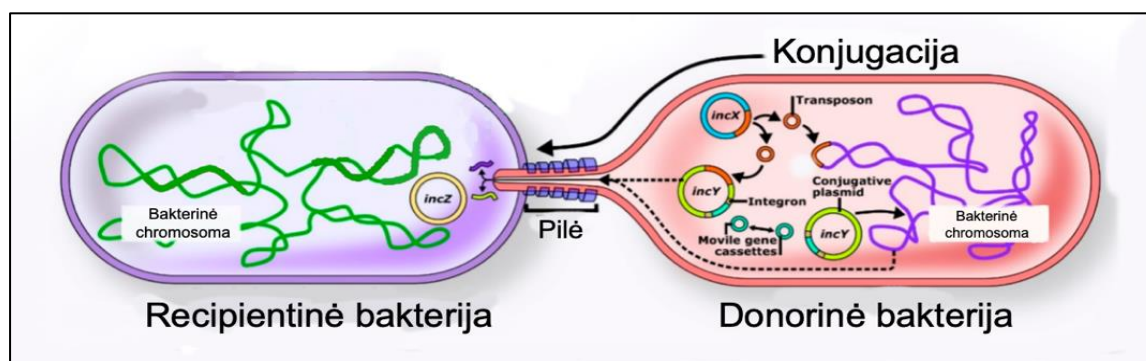
Remiantis Chang ir Cohen (1979) sukurtu protoplastų transformacijos protokolu, pirmą sykį sėkmingai transformuoti termofilinės *Geobacillus stearothermophilus* bakterijos CU21 ir SIC1 kamienai (Imanaka ir kt., 1982; M. Zhang ir kt., 1988). Nustatyta, kad transformacijos efektyvumas priklauso nuo naudotos plazmidinės DNR kilmės. Naudojant plazmidės, išskirtas iš *G. stearothermophilus* CU21 kamieno, transformacijos efektyvumas siekė nuo  $10^5$  –  $10^7$  KfV/ $\mu$ g DNR. Mažesnis transformacijos efektyvumas buvo gautas naudojant plazmidės išskirtas iš *B. subtilis* –  $10^3$  –  $10^5$  KfV/ $\mu$ g DNR (Imanaka ir kt., 1982). Zhang ir kt., (1988) sėkmingai atliko *G. stearothermophilus* SIC1 kamieno protoplastų transformaciją. Transformacijos efektyvumas naudojant repB ir repA plazmidės gautas maždaug  $2$ – $5 \times 10^6$  ir  $5 \times 10^4$  KfV/ $\mu$ g DNR (Zhang ir kt., 1988).

Tačiau šis metodas termofilinių bakterijų genetinei transformacijai atlikti taikomas labai retai, dėl gana sudėtingos procedūros ir didelių laiko sąnaudų (Rattanachakunsoon ir Phumkhachorn,

2009). Termofilinėms bakterijoms dažniau naudojama konjugacija arba elektroporacija. Šie metodai plačiau aprašomi sekančiuose skyriuose.

### 1.5.2 Konjugacija

Konjugacija tai vienas iš horizontalaus genų perdavimo mechanizmų, kurio principas – genetinės medžiagos perdavimas per tiesioginį fizinį kontaktą iš ląstelės į ląstelę. Ląstelės – ląstelės kontaktui sudaryti yra naudojama speciali struktūra – pilė. Tokios tarp ląstelių sąveikos metu genetinė medžiaga perduodama viena kryptimi, t. y. iš donorinės ląstelės į recipientinę ląstelę. Sąveikos metu yra suformuojamas tiltelis arba konjuguojanti pora, kuri skirta ląstelių ryšiui palaikyti. Recipientinei ląstelei priėmus genetinę medžiagą iš donorinės ląstelės, ji įgyja visas genetines ir fenotipines savybes, kurios būna užkoduotos gautoje genetinėje medžiagoje (žr. 1.3 pav.). Tai plačiai naudojamas metodas genetinės medžiagos perdavimui tarp gramneigiamų, gramteigiamų ir tarp abiejų grupių bakterijų (Bello-López ir kt., 2019).



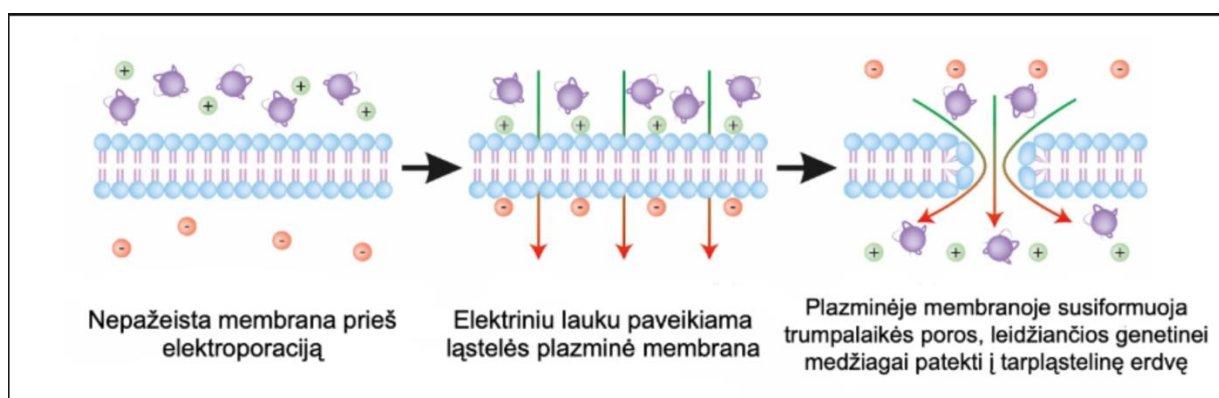
**1.3 pav.** Genetinės medžiagos perdavimas iš donorinės į recipientinę bakteriją per pilę konjugacijos metu (adaptuota pagal Bello-López ir kt., 2019).

Šis genų pernašos metodas labai pasiteisinęs termofiliniams *Bacillus* ir *Geobacillus* spp. kamienams. Literatūroje pateikiama nemažai konjugacijos protokolų šių genčių bakterijoms (žr. 1 priedas). Tominaga ir kt. (2016) atliko konjugaciją, kurios metu sėkmingai perkelta pUCG18T šaudyklinė plazmidė iš donorinių *E. coli* kamienų į 16 įvairių termofilinių recipientinių *Bacillus* ir *Geobacillus* spp. kamienų. Transformacijos efektyvumas siekė nuo  $4,1 \times 10^{-7}$  iki  $3,8 \times 10^{-2}$  vienam recipientui. Kitas sėkmingas pavyzdys – ilgų chromosomų segmentų perkėlimas iš *Bacillus subtilis* į *Geobacillus kaustophilus*. Transformacijos efektyvumas siekė  $1,4 \times 10^{-10}$  vienam recipientui (Mori ir kt., 2022). Tai parodo, kad konjugacija yra lankstus ir turintis savų pranašumų genetinės medžiagos pernešimo metodas. Elektroporacijos atveju DNR dydis dažniausiai neigiamai paveikia transformacijos efektyvumą (Peng ir kt., 2009), tuo tarpu konjugacijai tai nėra kliūtis.

Konjugacija gali būti geras metodas genetinės medžiagos pernešimui, kai kamienas yra sunkiai transformuojamas, t. y. jis yra atsparus kitiems metodams, pavyzdžiui, elektroporacijai ar protoplastų transformacijai (Samperio ir kt., 2021).

### 1.5.3 Elektroporacija

Elektroporacija tai vienas plačiausiai ir daugiau nei keturis dešimtmečius naudojamas metodas, genetinės medžiagos įnešimui į įvairaus tipo ląsteles: bakterijas, mieles ar žinduolių kultūrų ląsteles. Metodas pagrįstas elektriniu lauku, kuris laikinai destabilizuoja ląstelės plazminę membraną. Membranoje susiformuoja poros ir pro jas gali praeiti makromolekulės, kurios įprastai pro plazminę membraną nėra praleidžiamos (žr. 1.4 pav.) (Young ir Dean, 2015). Elektroporacija sėkmingai naudojama nuo 1982 m., kai Neumann ir jo kolegoms pavyko elektroporaciją pritaikyti žinduolių ląstelėms ir atlikti efektyvią plazmidinės DNR transfekciją į pelių liomos ląsteles. Tokia liomos ląstelių plazminės membranos būseną buvo pasiekta panaudojant 5–10 kV/cm ir 5–10  $\mu$ s elektrinio lauko impulsus (Neumann ir kt., 1982).



**1.4 pav.** Elektroporacijos veikimo mechanizmas (Chau ir kt., 2020).

Elektroporacija tai metodas leidžiantis pasiekti aukštą transformacijos efektyvumą, tačiau efektyvi transformacija priklauso nuo mikroorganizmo tipo ir fiziologinių savybių. Žinoma, kad gramteigiamos bakterijos yra atsparesnės plazmidinės DNR transformacijai nei gramneigiamos bakterijos. Tai nulemia struktūriniai ląstelių sienelės skirtumai tarp dviejų bakterijų grupių. Gramneigiamos bakterijos turi dvigubą membranos struktūrą, atskirtą plonu peptidoglikano sluoksniu jų ląstelės sienelėje. Palyginimui, gramteigiamų bakterijų ląstelių sienelė yra žymiai storesnė, su viena membrana ir storu išoriniu peptidoglikano sluoksniu, kuris veikia kaip fizinis barjeras DNR patekimui ir apsunkina veiksmingą gramteigiamų bakterijų transformaciją (Löfblom ir kt., 2007). Tad didžiausias efektyvumas gaunamas elektroporuoiant gramneigiamas bakterijas ( $10^7$ – $10^{10}$  KFV/ $\mu$ g DNR), mažesnis gramteigiamų bakterijų ir archėjų ( $10^5$ – $10^7$  KFV/ $\mu$ g DNR), dar mažesnis – mikrodumblių ir mielių  $10^4$ – $10^7$  KFV/ $\mu$ g DNR) (Kotnik ir kt., 2015).

Elektroporacijos efektyvumas taip pat priklauso nuo tinkamai optimizuoto elektroporacijos protokolo, kadangi šis metodas priklauso nuo daugelio faktorių tokių kaip, kompetentinių ląstelių paruošimas (Zhang ir kt., 2015), elektroporatoriaus parametrai (impulso formos, stiprumo ar impulsų skaičiaus) (Jeon ir kt., 2019), elektroporacijos buferis (Kananavičiūtė ir kt., 2015), plazmidės forma (Kotnik ir kt., 2015), dydis (Peng ir kt., 2009), koncentracija (Zhang ir kt., 2015) ir druskos kiekis terpėje (Kotnik ir kt., 2015). Nors metodo optimizavimas gana sudėtingas ir reikalaujantis daug laiko, tačiau tai atlikus galima gauti gana aukštą elektroporacijos efektyvumą. Elektroporacijos metodas plačiai naudojamas termofilinių bakterijų genetinei transformacijai atlikti ir yra pateikta nemažai sėkmingų variantų (žr. 1 priedas).

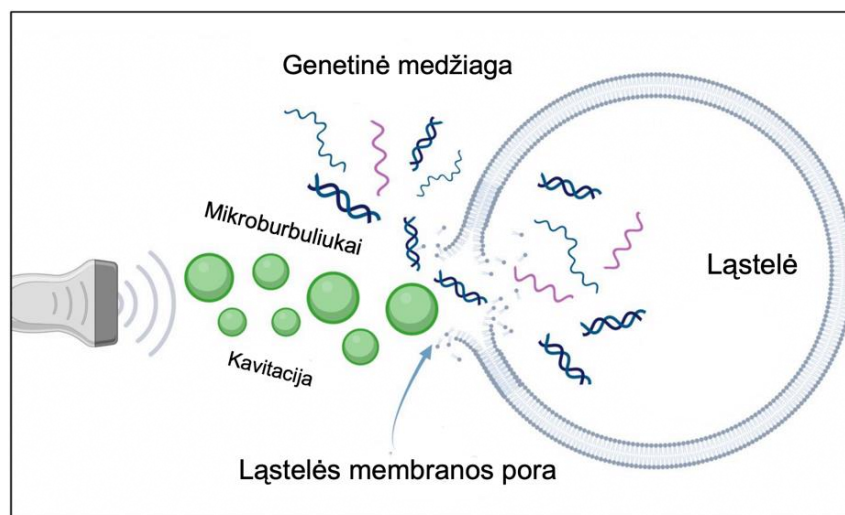
Literatūroje pateikiami elektrotransformacijos protokolai *Geobacillus* spp. kamienams. Elektroporacijos protokolas sėkmingai optimizuotas termofiliniam *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R kamienui ir gautas transformacijos efektyvumas siekė  $10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR. Nustatytos tokios transformacijos sąlygos: augimo fazė (1,1–1,3 OD<sub>590</sub>), elektroporacijos buferis (0,5 M manitolis, 0,5 M sorbitolis ir 10 % glicerolis) bei elektrinio lauko stipris (20–22 kV/cm) (Kananavičiūtė ir kt., 2015). Kitas pavyzdys – parinkus aukšto osmoliariškumo buferį (0,5 M manitolio, 0,5 M sorbitolio ir 10 % glicerolis), plazmidinės DNR kiekį (50–500  $\mu$ g) ir elektroporatoriaus parametrus (10 mF, 600  $\Omega$ /cm, 25 kV), transformuoti *Geobacillus thermoglucosidasius* NCIMB 11955 ir DL33 kamienai. Transformacijos efektyvumas siekė  $10^3$ – $10^4$  KfV/ $\mu$ g DNR (Cripps ir kt., 2009). Šis transformacijos būdas pasiteisino anaerobinėms gramteigiamoms termofilinėms *Clostridium thermocellum* bakterijų kamienams. Pirmiausia buvo optimizuotas *C. thermocellum* DSM 1313 kamieno transformacijos protokolas. Veiksniai, padedantys pasiekti aukštą transformacijos efektyvumą: speciali kiuvetė, elektrinio lauko stipris (25 V/cm), regeneracijos trukmė (4 val.), plazmidinės DNR kiekis (2,5  $\mu$ g 90  $\mu$ L kompetentinių ląstelių suspensijai), elektrokompetentinių ląstelių šaldymas ruošimo metu. Optimizuotas protokolas leido gauti  $2,2 \times 10^5$  KfV/ $\mu$ g DNR transformacijos efektyvumą. Pritaikant šį protokolą, pirmą sykį sėkmingai transformuoti ir kiti *C. thermocellum* kamienai: DSM 4150, 7072 ir ATCC 27405 (Tyurin ir kt., 2004).

Buvo minėta, kad transformacijos efektyvumui gali turėti įtakos elektrinio lauko impulso forma. Pagal formuojamas elektrinio lauko bangas elektroporatoriai skirstomi į dvi rūšis: eksponentinio nykimo ir stačiakampio formos bangas. Eksponentinio nykimo bangų elektroporatorius yra paprastos ir pigios konstrukcijos, tačiau dažniausiai leidžia valdyti tik vieną parametą – elektrinio lauko stiprį. Stačiakampio formos bangų elektroporatoriai leidžia keisti ir valdyti daugiau parametru: stiprį, impulsų trukmę, impulsų skaičių ar intervalą tarp impulsų (Lv ir kt., 2020). Literatūroje teigiama, kad stačiakampio formos bangų elektroporatoriaus impulsai laikomi

efektyvesniais už eksponentinio nykimo impulsus (Novickij ir kt., 2022), nes tokio tipo bangos nesukelia itin didelio kenksmingo poveikio ląstelėms (Tryfona ir Bustard, 2006). Transformacijos efektyvumui svarbų vaidmenį turi elektrinio lauko impulsų skaičius. Parodyta, kad didesnis impulsų skaičius gali padidinti transformacijos efektyvumą, nes ląstelės membranoje susiformuoja daugiau porų, pro kurias į ląstelės vidų gali patekti išorėje esanti DNR (Mahmood ir kt., 2008). Tačiau teigiamas efektas gaunamas iki tam tikros ribos. Per didelis elektrinio lauko impulsų skaičius gali padidinti ląstelių mirtingumą dėl sukeltos apoptozės (Liang ir Lee, 1998). Taip pat svarbus parametras – impulso trukmė. Nors literatūroje pateikiama gana mažai pranešimų, tačiau Kim ir kt. (2005) atliktas tyrimas, parodė, kad impulso trukmė turi įtakos bakterijų *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 kamieno elektrotransformacijos efektyvumui. Buvo išbandytos trys skirtingos impulso trukmės: 100; 500; 1000 ms. Atlikti bandymai parodė, kad 500 ms trukmės impulsas yra optimalus variantas, duodantis didžiausią elektrotransformacijos efektyvumą (Kim ir kt., 2005).

#### 1.5.4 Sonoporacija

Sonoporacija gali būti laikomas kaip alternatyvus termofilinių bakterijų transformacijos metodas, kuris pagrįstas ultragarso bangomis sukelta transformacija, t. y. sukliamas ląstelių membranos porų susidarymas dėl akustinių bangų. Ultragarso vandeniniuose tirpaluose formuoja mikroburbuliukus (kavitacijos burbuliukus), kurie laikinai pakeičia ląstelės membranos pralaidumą, sukurdami trumpalaikes poras. Pro šias poras į ląstelės vidų patenka išorėje esančios makromolekulės (žr. 1.5 pav.) (Aune ir Aachmann, 2010).



**1.5 pav.** Porų susidarymas membranoje mikroburbuliukų kavitacijos būdu ir genetinės medžiagos difundavimas į ląstelės vidų (pagal Krut ir kt., 2022).

Sonoporacijos efektyvumas priklauso nuo intensyvumo, ekspozicijos laiko, centrinio dažnio, taikymo tipo (nuolatinis arba impulsinis), impulsų pasikartojimo dažnio ir darbo ciklo. Šio metodo



pranašumas lyginant su elektroporacija: 1) didesnis transformacijos efektyvumas; 2) mažiau priklausoma nuo įtampos, sutaupoma energijos; 3) išlaikomas didesnis ląstelių gyvybingumas (Lin ir Xu, 2013, Loske AM, 2014). Nors sonoporacija kaip transformacijos metodas turi didelį potencialą, tačiau literatūroje pateikiama labai mažai pritaikytų protokolų.

Vienas pirmų sėkmingų sonoporacijos pritaikymo tyrimų buvo atlikta perkeliant pBBR1MCS2 plazmidę į mezofilines gramneigiamas bakterijas ir transformacija pasižymėjo dideliu efektyvumu. *Pseudomonas putida* UWC1 ultragarsinio DNR pristatymo (UDD) efektyvumas gautas 9 kartus didesnis nei taikant konjugacijos metodą. *Escherichia coli* DH5α ir *Pseudomonas fluorescens* SBW25 ultragarsinio DNR pristatymo efektyvumas gautas 4 kartus didesnis nei taikant elektroporacijos metodą (Song ir kt., 2007)

Sonoporacija buvo pritaikyta termofilinių bakterijų transformacijai. Lin ir kt. (2010) atliko gramteigiamų termofilinių anaerobinių bakterijų *Thermoanaerobacter* sp. X514 transformaciją. Optimizuotas transformacijos protokolas buvo sėkmingas, paprastas, susidedantis iš minimalių žingsnių skaičiaus siekiant išsaugoti anaerobines sąlygas ir transformacijos efektyvumas gautas aukštesnis ( $6 \times 10^2$  KSV/ $\mu\text{g}$  DNR) nei taikant elektroporaciją ( $1 \times 10^2$  KSV/ $\mu\text{g}$  DNR). Sonoporacijos naudojimas turi privalumą transformuojant anaerobines bakterijas, nes transformacija vykdoma sandariame augimo terpės mėgintuvėlyje, nereikia bakterijų perkelti į elektroporacijos kiuvetę. Tad šis metodas turi platesnio pritaikymo potencialą dėl proceso paprastumo, anaerobinių sąlygų palaikymo ir didesnio transformacijos efektyvumo (Lin ir kt., 2010).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Darbe naudotos medžiagos, bakterijų kamienai, terpės ir įranga

#### 2.1.1 Naudota įranga

- Laminaras (SCANLAF Mars)
- Svarstyklės (KERN ADB)
- Termostatas (BINDER)
- Stalinė centrifuga (Fast Gene)
- Autoklavas AMA260NT (Astell)
- Terminė purtyklė TS-100C Thermo-Shaker (Biosan)
- Elektroporatorius (Eppendorf)
- Magnetinė maišyklė (Fisher Scientific)
- Elektroporatorius (Sukurtas FTMC mokslininkų, Novickij ir kt., 2018)
- Spektrofotometras (WPA Biowave)

#### 2.1.2 Naudoti bakterijų kamienai

Darbe naudoti termofilinių gramteigiamų bakterijų kamienai, saugomi Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros mikroorganizmų kultūrų kolekcijoje:

- *Anoxybacillus tepidamans* DSM 16325<sup>T</sup>
- *Geobacillus jurassicus* DSM 15726<sup>T</sup>
- *Geobacillus sp.* 15
- *Geobacillus thermocatenulatus* DSM 730<sup>T</sup>
- *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>
- *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup>
- *Parageobacillus thermoglucosidasus* DSM 2542<sup>T</sup>
- *Parageobacillus toebii* DSM 14590<sup>T</sup>

Naudoti mezofiliniai bakterijų kamienai:

- *Escherichia coli* DH5a

### 2.1.3 Naudotos terpės ir buferiai

Termofilinių bakterijų kultūros augintos TGP ir 2SPYNG terpėse, *E. coli* kultūros plazmidžių skyrimui augintos TGP terpėje. Terpių ir buferių, naudotų darbe, sudėtis pateikta 2.1 lentelėje.

#### 2.1 lentelė. Darbe naudotos terpės/buferiai ir jų sudėtys

Terpė/Buferis	Sudėtis
TGP	17 g/L triptonas (Gibco; Carl Roth; Organo Technie); 3 g/L sojų peptonas (Gibco); 5 g/L NaCl (Carl Roth); 2,5 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Carl Roth); 4 g/L glicerolis (Acros Organics); 4 g/L natrio piruvatas (Merck)
2SPYNG	16 g/L sojų peptonas (Gibco); 10 g/L mielių ekstraktas (Gibco); 5 g/L NaCl (Carl Roth)
2SPY	16 g/L sojų peptonas (Gibco); 10 g/L mielių ekstraktas (Gibco); 5 g/L NaCl (Carl Roth); 10 g/L glicerolis (Acros Organics)
TSA	17 g/L triptonas (Carl Roth); 3 g/L sojų peptonas (Carl Roth); 2,5 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Carl Roth); 5 g/L NaCl (Carl Roth); 2,5 g/L gliukozė (Carl Roth)
GSM	10 % glicerolis (Acros Organics); 0,5 M sorbitolis (Carl Roth); 0,5 M manitolis (Carl Roth)

Po autoklavavimo į TGP terpę pridedamas 4 g/L glicerolis ir 4 g/L natrio piruvatas. Šios medžiagos prieš tai sterilizuojamos filtruojant 0,2 µm filtrais. Taip pat TGP terpė papildoma druskų tirpalu: MnSO<sub>4</sub> (0,47 µmol/L), ZnSO<sub>4</sub> (0,91 µmol/L), KCl (0,07 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> (1,1 mmol/L), CaCl<sub>2</sub> (2,3 mmol/L).

Agarizuotos terpės buvo gaminamos pridedant į jas agarą (Oxoid) (15 g/L). Antibiotikas naudotas kaip atrankos žymuo ir į terpę dedamas atitinkamomis koncentracijomis pagal poreikį:

- Kanamicinas (Roth): *E. coli* – 50 µg/mL, termofilinėms bakterijoms – 12,5 µg/mL
- Chloramfenikolis (Roth): *E. coli* – 34 µg/mL, termofilinėms bakterijoms – 7 µg/mL

## 2.2 Metodai

### 2.2.1 Plazmidžių išskyrimas

*E. coli* DH5α kamienas, turintis pG2K arba pG1C (Reeve ir kt., 2016) plazmidę, auginamas apie 16 val. TGP terpėje su atitinkamos koncentracijos antibiotiku 37 °C temperatūroje ir esant 180 aps./min. pG2K ir pG1C plazmidės išskirtos iš *E. coli* DH5α kamieno naudojant GeneJET plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį ir laikantis gamintojo pateikto protokolu.

### 2.2.2 Elektrokompentinių termofilinių ląstelių paruošimas

Bakterijų kultūros auginamos per naktį skystoje terpėje 55 °C temperatūroje su aeracija esant 200 aps./min. Ryte 1 mL (2%) bakterijų kultūros buvo persėjamos į 50 mL skystos terpės 500 ml talpos kolboje toliau ląstelės auginamos 55 °C temperatūroje su aeracija esant 200 aps./min. Baigus auginimą ląstelės atšaldomos ledo vonioje ~15 min. ir surenkamos centrifuguojant 4 °C temperatūroje 4000×g 15 min. Toliau, ląstelės praplaunamos keturis kartus šaltu 10 % glicerolio plovimo tirpalu skirtingomis centrifugavimo sąlygomis:

- Pirmą kartą ląstelės suspenduojamos 30 mL plovimo tirpalu ir centrifuguojamos 15 min. 5000×g;
- Antrą kartą suspenduojamos 30 mL plovimo tirpalu ir centrifuguojamos 15 min. 5500×g;
- Trečią kartą ląstelės suspenduojamos 30 mL plovimo tirpalu ir centrifuguojamos 15 min. 6000×g.;
- Ketvirtą kartą ląstelės suspenduojamos 30 mL plovimo tirpalu ir centrifuguojamos 15 min. 6500×g.

Toliau ląstelės suspenduojamos 1 mL GSM elektroporacijos buferyje ir centrifuguojamos 7000×g 5 min. Supernatantas pašalinamas ir ląstelės praskiedžiamos GSM elektroporacijos buferiu iki OT<sub>600</sub> būtų lygus 100.

Visi paruošimo etapai atliekami esant +4 °C temperatūrai arba laikant ląsteles ledo vonioje. Paruoštos ląstelės naudojamos elektrotransformacijai iš karto arba laikomos -70 °C šaldiklyje iki panaudojimo.

### 2.2.3 Elektroporacija

Atšildomos elektrokompentinės ląstelės ledukuose ir 50/80 µL ląstelių sumaišoma su ~100 ng plazmidinės DNR (1 µL) ir perkeliama į atšaldytą elektroporacijos kiuvetę (1 mm tarpo). Elektroporacija vykdoma naudojant eksponentinio nykimo bangų elektroporatorių (Eppendorf) bei taikant 23 kV/cm elektrinio lauko stiprį. Po elektrinio lauko impulso ląstelės iš karto suspenduojamos ir regeneruojamos 1 mL TGP terpėje. Ląstelės regeneruojamos 1,5 valandos terminėje purtyklėje 52 °C temperatūroje esant 1000 aps./min. Vėliau užsėjamos ant agarizuotos terpės su atitinkamu antibiotiku. Kolonijos suskaičiuojamos po 12–24 valandų inkubacijos 55 °C temperatūroje.

Transformacijos efektyvumas įvertinamas kolonijas formuojančiais vienetais vienam mikrogramui DNR (KFV/µg DNR). Efektyvumas įvertintas pagal vidutinį kolonijų skaičių, gautą iš

trijų pakartojimų. Pakartojimams naudotos skirtingo ruošimo kompetentinės ląstelės, o vienam parametrui įvertinti naudotos to paties ruošimo kompetentinės ląstelės.

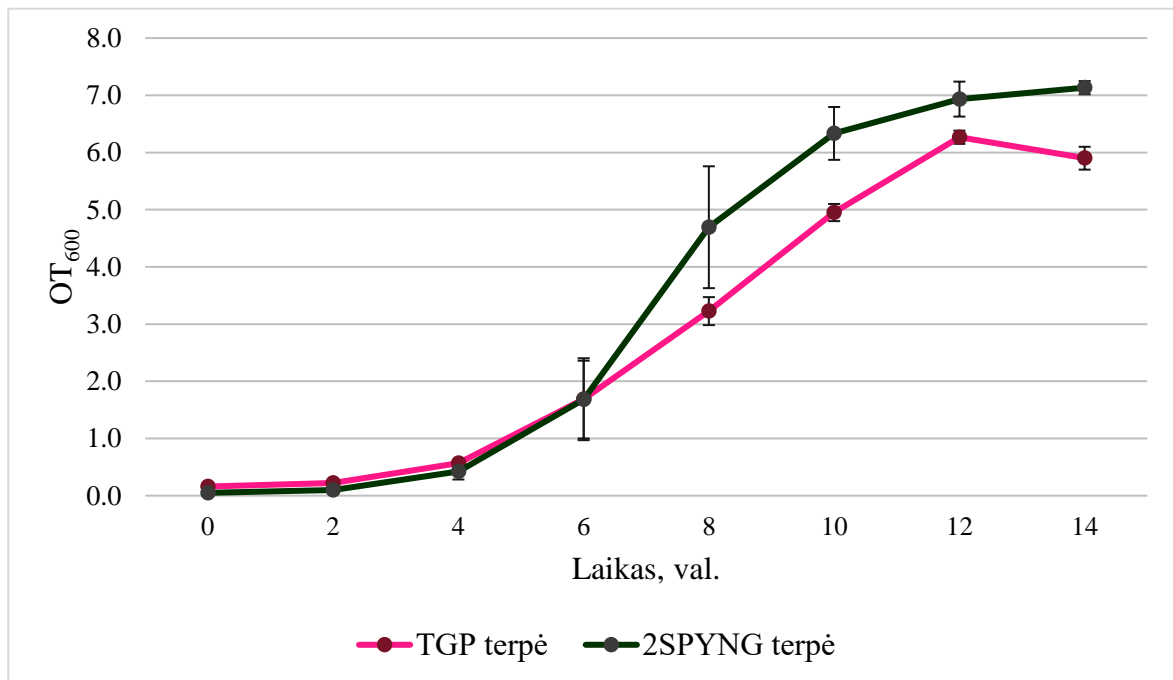
### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> genetinės transformacijos sąlygų optimizavimas

##### 3.1.1 Augimo sąlygų įtaka

Pirmiausiai tyrimo metu buvo vertinama augimo terpės ir augimo fazės įtaka elektrotransformacijos efektyvumui. Norint iširti augimo terpės įtaką elektrotransformacijos efektyvumui, *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> kompetentinės ląstelės buvo ruošiamos jas auginant dvejose terpėse: TGP ir 2SPYNG. Augimo fazės įtakos transformacijai nustatymui, kompetentinės ląstelės buvo ruošiamos auginant iki skirtingų OT<sub>600</sub> verčių, kurios atitinka eksponentinės fazės pradžią, vidurį ir stacionarios fazės pradžią. OT<sub>600</sub> vertės parinktos remiantis sudarytomis *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> augimo kreivėmis (žr. 3.1 pav.).

Kompetentinės ląstelės elektroporuotos naudojant eksponentinio nykimo bangų elektroporatorių. Pirmieji bandymai buvo pradėti naudojant 50 µL elektrokompetentinių ląstelių, 1 µL pG2K plazmidinės DNR (100 ng/µL) ir elektroporuojant 23 kV/cm elektrinio lauko stipriu. Transformuotos ląstelės toliau regeneruotos 52 °C temperatūroje 1,5 val. TGP terpėje, išsėtos ant TGP agarizuotos terpės ir auginamos termostate 55 °C temperatūroje. Sekančią dieną suskaičiuotos transformantų kolonijos ir įvertintas transformacijos efektyvumas.



**3.1 pav.** *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> augimo kreivės TGP ir 2SPYNG terpėse.

Atlikus elektrotransformaciją su paruoštomis ląstelėmis gauti rezultatai parodė (žr. 3.1 lentelė), kad ląsteles auginant TGP terpėje iki eksponentinės fazės pradžios (OT<sub>600</sub> – 1,5), elektrotransformacijos efektyvumas gaunamas  $3,1 (\pm 0,5) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR, o auginant 2SPYNG terpėje ir vertinant tris eksponentinės augimo fazės pradžios taškus (OT<sub>600</sub> – 1,5, 2,0 ir 2,5) elektrotransformacijos efektyvumas gautas  $2,1 (\pm 1,7) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR,  $3,9 (\pm 2,1) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR ir  $1,7 (\pm 0,6) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR. Tuo tarpu, bakterijas auginant TGP terpėje iki eksponentinės fazės vidurio (OT<sub>600</sub> – 3,5) gaunama  $8,0 (\pm 3,6) \times 10^1$  KfV/ $\mu$ g DNR, o 2SPYNG terpėje (OT<sub>600</sub> – 4,0) rezultatas siekia  $5,2 (\pm 5,0) \times 10^1$  KfV/ $\mu$ g DNR. Taip pat elektrotransformacijos efektyvumas įvertintas bakterijų kultūrą auginant iki stacionarios fazės pradžios. TGP terpėje (OT<sub>600</sub> – 4,0) gautas  $6,6 (\pm 2,5) \times 10^2$  KfV/ $\mu$ g DNR transformacijos efektyvumas, o auginant 2SPYNG terpėje iki stacionarios fazės pradžios, negaunama nė viena transformanto kolonija.

**3.1 lentelė.** *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> transformacijos efektyvumo priklausomybė nuo augimo fazės ir augimo terpės. Ląstelės auginamos TGP ir 2SPYNG terpėse iki skirtingų OT<sub>600</sub> reikšmių. Kompetentinės ląstelės sumaišomos su 1  $\mu$ L pG2K plazmidine DNR (100 ng/ $\mu$ L), elektroporacijai naudotas 23 kV/cm elektrinio lauko stipris. Transformuotos ląstelės regeneruotos 52 °C temperatūroje 1,5 val. TGP terpėje ir išsėtos ant TGP agarizuotos terpės.

Augimo terpė	Optinis tankis, OT <sub>600</sub>	Transformacijos efektyvumas (KfV/ $\mu$ g DNR)
TGP	1,5	$3,1 (\pm 0,5) \times 10^3$
	3,5	$8,0 (\pm 3,6) \times 10^1$
	5,5	$6,6 (\pm 2,5) \times 10^2$
2SPYNG	1,5	$2,1 (\pm 1,7) \times 10^3$
	2,0	$3,9 (\pm 2,1) \times 10^3$
	2,5	$1,7 (\pm 0,6) \times 10^3$
	4,0	$5,2 (\pm 5,0) \times 10^1$
	6,0	0,0

Vertinant rezultatus galima teigti, kad efektyvesnė transformacija gaunama bakterijų kultūrą auginant iki eksponentinės fazės pradžios. Taip pat nustatyta, kad kompetentines ląsteles ruošiant 2SPYNG terpėje yra gaunamas didesnis transformacijos efektyvumas ( $3,9 (\pm 2,1) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR) negu TGP terpėje ( $3,1 (\pm 0,5) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR). Lyginant tyrimus su mezofiliniais *Bacillus* spp. kamienais, pavyzdžiui, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ir *B. mycoides*, rezultatai gaunami panašūs. Parodyta, kad mezofilinių *Bacillus* spp. kamienų ląstelės surinktos ankstyvoje eksponentinėje fazėje

irgi duoda geriausią elektrotransformacijos efektyvumo rezultatą (Turgeon ir kt., 2006; Peng ir kt., 2009; Yi ir Kuipers, 2017). Tuo tarpu, lyginant su termofilinėmis *G. stearothermophilus* NUB3621R bakterijomis gaunami priešingi rezultatai. Šių bakterijų didžiausias transformacijos efektyvumas gaunamas bakterijų kultūrą surenkant eksponentinės augimo fazės viduryje (Kananavičiūtė ir kt., 2015). Gautus rezultatus lyginant su kitų tyrėjų rezultatais matoma, kad augimo fazė gali turėti didelės įtakos efektyviai bakterijų elektrotransformacijai.

Taip pat augimo terpės parinkimas yra itin svarbus veiksnys. Gauti rezultatai rodo, kad *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> auginant terpėje (2SPYNG), kuri turi mažiau papildomų mitybinių elementų ir mažesnę druskų koncentraciją, duoda geresnius transformacijos efektyvumus. Kiti tyrėjų pranešimai rodo kiek kitokias tendencijas. Pavyzdžiui, parodyta, kad *B. amyloliquefaciens* TA208 kamieno transformacijos efektyvumas didėja esant didesnei druskų koncentracijai, o esant daugiau mitybinių elementų terpėje – mažėja (G. Zhang ir kt., 2011). *B. subtilis* ZK kamieno transformacijos efektyvumas didėja naudojant augimo terpę, kurioje yra didesnis kiekis mitybinių medžiagų ir mažesnė druskų koncentracija (Zhang ir kt., 2015). Tai tik parodo, kad augimo terpės ir fazės parinkimas priklauso nuo bakterijų rūšies ar kamieno ir yra itin svarbūs veiksniai optimizuojant elektrotransformacijos protokolą.

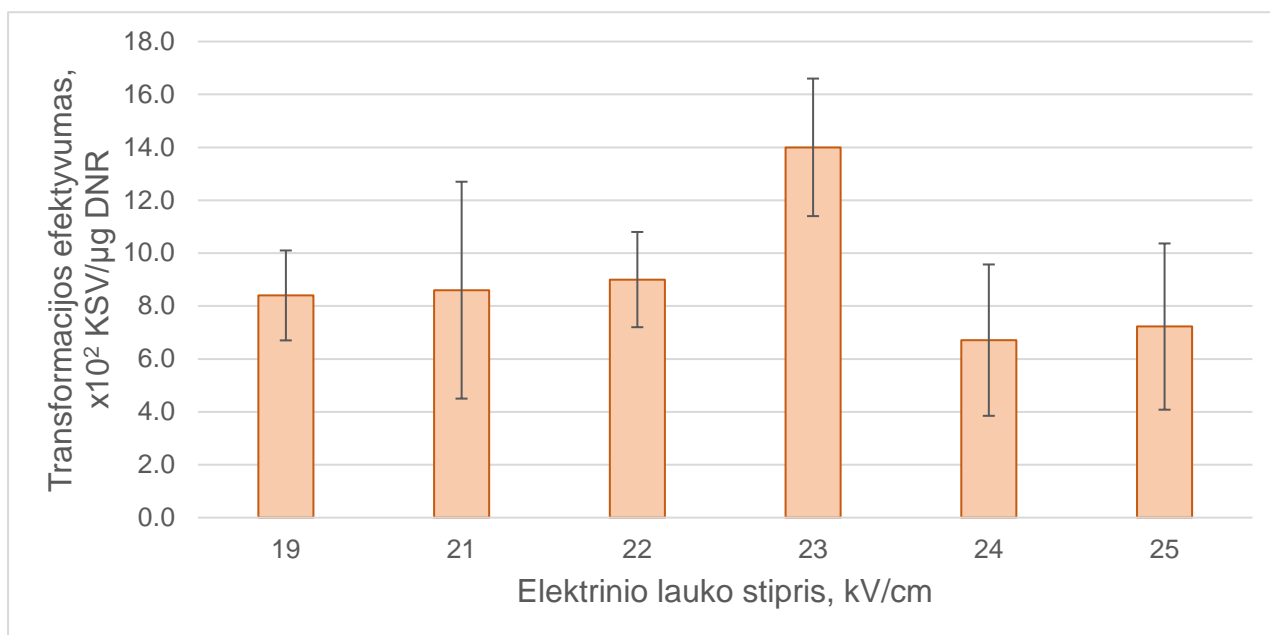
### 3.1.2 Elektrinio lauko stiprio įtaka

Elektrotransformacijos proceso rezultatą nulemia elektrinio lauko parametrai, kurie naudojami elektroporacijos etape. Pagrindinis parametras – elektrinio lauko stipris. Didelis elektrinio lauko stipris reikalingas membranų porų susiformavimui, pro kurias į ląstelės vidų patenka genetinė medžiaga. Tačiau per didelis elektrinio lauko stipris, poras gali suformuoti negrįžtamai, pažeisti membraną ir sukelti ląstelių žūtį (Yi ir Kuipers, 2017).

Siekiant įvertinti *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> elektrotransformacijos efektyvumo priklausomybę nuo elektrinio lauko stiprio, buvo išbandytos įvairios jo vertės. Iš viso buvo parinktos 6 elektrinio lauko stiprio vertės – 19, 21, 22, 23, 24 ir 25 kV/cm.

Remiantis gautais rezultatais (žr. 3.2 pav.), matoma, kad naudojant 19, 21 ir 22 kV/cm elektrinio lauko stiprį, transformacijos efektyvumas gaunamas labai panašus –  $8,4 (\pm 1,7) \times 10^2$  KfV/ $\mu$ g DNR,  $8,6 (\pm 4,1) \times 10^2$  KfV/ $\mu$ g DNR ir  $9,0 (\pm 1,8) \times 10^2$  KfV/ $\mu$ g DNR. Transformuojant 23 kV/cm elektrinio lauko stipriu, transformacijos efektyvumas gaunamas 1,5 karto didesnis ( $1,4 (\pm 0,3) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR). Didinant elektrinio lauko stiprį (24–25 kV/cm), efektyvumas nukrenta perpus –  $6,7 (\pm 2,9) \times 10^2$  KfV/ $\mu$ g DNR ir  $7,2 (\pm 3,1) \times 10^2$  KfV/ $\mu$ g DNR.





**3.2 pav.** Elektrinio lauko stiprio įtaka *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> transformacijos efektyvumui. Ląstelės augintos TGP terpėje iki OT<sub>600</sub> – 1,5. Kompetentinės ląstelės sumaišytos su 1  $\mu$ L pG2K plazmidine DNR (100 ng/ $\mu$ L). Transformuotos ląstelės regeneruotos 52 °C 1,5 val. temperatūroje TGP terpėje ir išsėtos ant TGP agarizuotos terpės.

Nustatyta, kad naudojant 23 kV/cm elektrinio lauko stiprį gaunamas didžiausias transformacijos efektyvumas ( $1,4 (\pm 0,3) \times 10^3$  KSV/ $\mu$ g DNR). Todėl šios elektrinio lauko sąlygos buvo naudojamos ir sekančiuose eksperimentuose. Taip pat parodyta, kad 19–22 kV/cm elektrinio lauko stiprio vertės yra tinkamos sąlygos transformacijai atlikti. Tačiau matoma, kad elektrinio lauko stiprį didinant (>23 kV/cm), transformacijos efektyvumas nukrenta.

Panašus didelio elektrinio lauko stiprio naudojimas pastebėtas elektroporuojant kitas termofilines bakterijas. Pavyzdžiui, *G. stearothermophilus* NUB3621R bakterijų elektrotransformacijai atlikti naudojamas 20–22 kV/cm elektrinio lauko stipris (Kananavičiūtė ir kt., 2015), *G. thermoglucosidasius* NCIMB 11955 – 25 kV/cm (Cripps ir kt., 2009), *G. thermoglucosidasius* DL44 – 25 kV/cm (Reeve ir kt., 2016).

### 3.1.3 Plazmidės kiekio įtaka

Šio eksperimento metu buvo siekiama rasti optimalų plazmidinės DNR kiekį *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> bakterijų genetinei transformacijai. Atliktos elektroporacijos didinant įnešamos plazmidės tirpalo tūrį nuo 1  $\mu$ L iki 8  $\mu$ L, taip didinant jos koncentraciją. Buvo naudotas plazmidės tirpalas, kuriame yra 100 ng/ $\mu$ L DNR. Gauti rezultatai pateikti 3.3 paveiksle.



**3.3 pav.** pG2K plazmidės kiekio įtaka transformacijos efektyvumui. Bakterijų kultūra auginta 2SPYNG terpėje iki OT<sub>600</sub> – 2,0. Kompetentinės ląstelės elektroporuojamos su 23 kV/cm elektriniu lauko stipriu. Naudojamas plazmidės tirpalas, kuriame yra 100 ng/µL DNR. Transformuotos ląstelės regeneruotos 52 °C temperatūroje 1,5 val. TGP terpėje ir išsėtos ant TGP agarizuotos terpės.

Atlikus elektrotransformacijas nustatyta, kad didinant įnešamos plazmidės kiekį nuo 1 µL iki 2 µL (100 ng/µL DNR), transformacijos efektyvumas pakyla nuo  $3,1 (\pm 0,9) \times 10^3$  KfV/µg DNR iki  $4,8 (\pm 0,9) \times 10^3$  KfV/µg DNR. Įnešant dar didesnį plazmidinės DNR kiekį (4–8 µL) gauname ženkliai sumažėjusį transformacijos efektyvumą. Kompetentines ląsteles sumaišant su 4 µL plazmidinės DNR gauname  $1,4 (\pm 0,3) \times 10^3$  KfV/µg DNR, 6 µL –  $1,2 (\pm 0,5) \times 10^3$  KfV/µg DNR, o sumaišant su 8 µL gaunamas žemiausias transformacijos efektyvumas –  $0,4 (\pm 0,2) \times 10^3$  KfV/µg DNR.

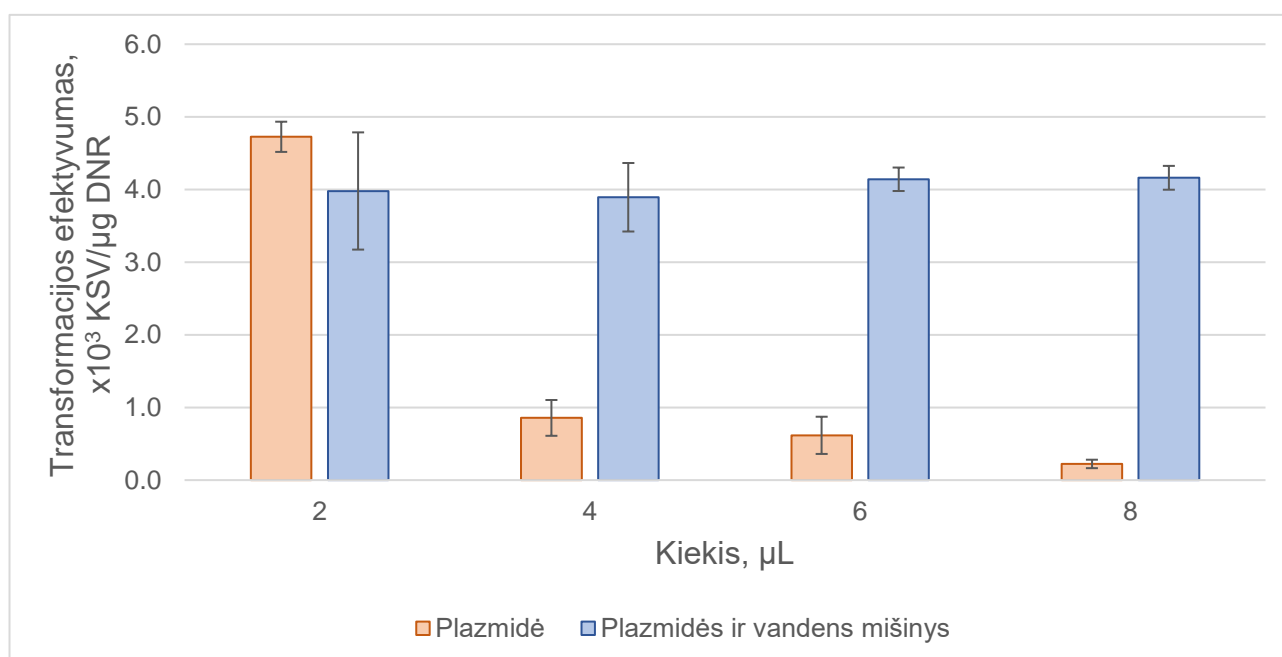
Pagal gautus rezultatus matoma, kad įnešamos plazmidės kiekis turi didelę įtaką transformacijos efektyvumui. Didžiausias *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> bakterijų transformacijos efektyvumas gaunamas įdedant 2 µL (100 ng/µL DNR) pG2K plazmidinės DNR ( $4,8 (\pm 0,9) \times 10^3$  KfV/µg DNR), o kiekį didinant – efektyvumas sumažėja net kelis kartus.

Siekiant išsiaiškinti plazmidės kiekio įtakos priežastis elektrotransformacijai, iškėlėme hipotezę, kad transformacijos efektyvumo sumažėjimą nulemia kompetentinių ląstelių praskiedimas įdedant vis didesnį plazmidės kiekį. Buvo atliktas eksperimentas, kurio metu į 50 µl kompetentinių ląstelių įdėta 2 µL plazmidinės DNR ir atitinkamas vandens kiekis, praskiedžiant mišinį nuo 2 µL iki 8 µL (žr. 3.2 lentelę). Visais atvejais naudotas kompetentinių ląstelių ir plazmidės tirpalas, kuriame yra 200 ng DNR.

**3.2 lentelė.** Plazmidės/vandens mišinių, naudojamų *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> elektroporacijai, komponentų tūriai. Naudotas plazmidės tirpalas, kuriame yra 100 ng/μL DNR.

Plazmidės tirpalo kiekis, μL	Vandens kiekis, μL	Bendras plazmidės tirpalo ir vandens mišinio kiekis, μL
2	0	2
2	2	4
2	4	6
2	6	8

Gauti rezultatai rodo (žr. 3.4 pav.), kad transformacijos efektyvumas išlieka panašus, jeigu pridedamas pastovus plazmidės tirpalo tūris, t. y. 2 μL (100 ng/μL DNR), ir kaskart didesnis vandens kiekis. Galima teigti, kad naudojamas didesnis plazmidės tirpalo tūris ir praskiedžiamos kompetentinės ląstelės neturi neigiamos įtakos transformacijos efektyvumui.



**3.4 pav.** pG2K plazmidės kiekio ir naudojamo plazmidės tirpalo tūrio įtaka transformacijos efektyvumui. Kompetentinės ląstelės sumaišomos su plazmide arba plazmidės/vandens mišiniu, kuris turi pastovų plazmidės kiekį (2 μL, 100 ng/μL). Kompetentinės ląstelės ruoštos auginant kultūrą 2SPYNG terpėje iki OT<sub>600</sub> – 2,0. Ląstelės elektroporuoja naudojant 23 kV/cm elektriniu lauko stiprį, regeneruojant 52 °C temperatūroje 1,5 val. TGP terpėje ir išsėjant transformantus ant TGP agarizuotos terpės.

Ankstesni pranešimai parodė, kad didinant įnešamos plazmidės koncentraciją į kompetentinių ląstelių mišinį, yra matomas iš pradžių didėjantis transformacijos efektyvumas. Tik pasiekus tam tikrą ribą jis pradeda mažėti (Augustin, J., ir Götz, F., 1990; H. Zhang ir kt., 2011). Mūsų atveju didinant

įnešamos plazmidės kiekį nuo 1  $\mu\text{L}$  iki 2  $\mu\text{L}$  (100 ng/ $\mu\text{L}$  DNR) stebime didėjantį transformacijos efektyvumą (didėjant plazmidės koncentracijai), tačiau įnešant 4  $\mu\text{L}$  ir daugiau – transformacijos efektyvumas drastiškai mažėja. Nustatyta, kad tokį rezultatą nulemia ne praskiedžiamos kompetentinės ląstelės dėl didelio plazmidės tūrio, o dėl galimai neigiamo jos poveikio. Manoma, kad didelis išorinės plazmidės kiekis gali blokuoti ląstelių membranoje susidariusias poras ir taip sukelti ląstelių žūtį (Wang ir kt., 2020).

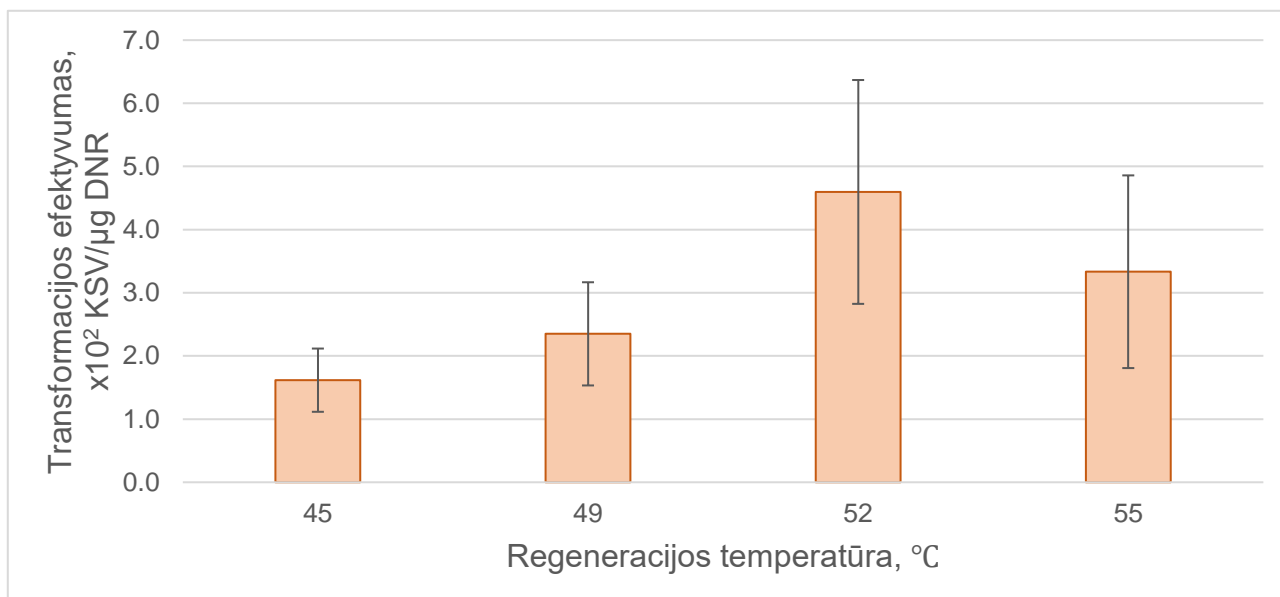
#### 3.1.4 Regeneracijos sąlygų įtaka

Atlikus elektroporaciją sekantis svarbus etapas – ląstelių regeneracija. Regeneracijos tikslas yra užtikrinti ląstelių gyvybingumą po elektrinio lauko pulsavimo. Šio tyrimo tikslas įvertinti elektrotransformacijos efektyvumo priklausomybę nuo regeneracijos sąlygų (temperatūros, regeneracijos terpės ir agarizuotos terpės ant kurios išsėjami transformantai).

Pirmas parametras svarbus ląstelių regeneracijai – temperatūra. Siekiant įvertinti transformacijos efektyvumo priklausomybę nuo regeneracijos temperatūros, transformuotos ląstelės buvo regeneruojamos skirtingose temperatūrose: 45–55  $^{\circ}\text{C}$ . Regeneracijos temperatūros parinktos atsižvelgiant į *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> optimalios augimo temperatūros diapozoną ir plazmidinės DNR replikono (šiuo atveju pG2K, turinti repB replikoną) veikimo temperatūrą. RepB yra temperatūrai jautrus replikonas, kuris veikia esant 45–65  $^{\circ}\text{C}$  temperatūrai, o aukštesnėje temperatūroje yra inaktyvuojamas (Reeve ir kt., 2016). Reeve ir kt. (2016) atlikti tyrimai parodė, kad plazmidės, turinčios repB replikoną, kopijų skaičius gaunamas didžiausias esant 45  $^{\circ}\text{C}$  temperatūrai, o jai didėjant – plazmidės kopijų skaičius mažėja. Tai gali reikšti, kad transformacijos efektyvumas turėtų didėti mažėjant regeneracijos temperatūrai.

Siekiant nustatyti regeneracijos temperatūros įtaką, po atliktos elektroporacijos transformuotos ląstelės buvo regeneruojamos keturiose skirtingose temperatūrose: 45  $^{\circ}\text{C}$ , 49  $^{\circ}\text{C}$ , 52  $^{\circ}\text{C}$  arba 55  $^{\circ}\text{C}$ . Po regeneracijos ląstelės užsėtos ant selektyvios agarizuotos TGP terpės ir inkubuojamos termostate 55  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Gauti tyrimo rezultatai pateikti 3.5 paveiksle.

Pagal gautus rezultatus nustatyta, kad elektrinio lauko impulsu paveiktas ląsteles regeneruojant 45  $^{\circ}\text{C}$  ir 49  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, transformacijos efektyvumas gaunamas  $1,6 (\pm 0,5) \times 10^2$  KFV/ $\mu\text{g}$  DNR ir  $2,4 (\pm 0,8) \times 10^2$  KFV/ $\mu\text{g}$  DNR. Regeneruojant 52  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje elektrotransformacijos efektyvumas siekia  $4,6 (\pm 1,8) \times 10^2$  KFV/ $\mu\text{g}$  DNR. Dar didinant temperatūrą ir ląstelių regeneracijai pasirinkus 55  $^{\circ}\text{C}$  temperatūrą, transformacijos efektyvumas siekia  $3,3 (\pm 1,5) \times 10^2$  KFV/ $\mu\text{g}$  DNR.



**3.5 pav.** Regeneracijos temperatūros įtaka *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> transformacijos efektyvumui. Ląstelės augintos TGP terpėje iki OT<sub>600</sub> – 1,5. Naudotas 1 μL (100 ng/μL) plazmidinės DNR. Kompetentinės ląstelės elektroporuojamos su 23 kV/cm elektriniu lauko stipriu. Transformuotos ląstelės regeneruotos TGP terpėje 1,5 val. ir išsėtos ant TGP agarizuotos terpės.

Nustatyta, kad didinant regeneracijos temperatūrą, transformacijos efektyvumas didėja. Gaunamas priešingas rezultatas palyginus su Reeve ir kt. (2016) atliktais tyrimais. Regeneracijos temperatūrą pakėlus 4 °C, efektyvumas padidėja 1,5 karto (nuo  $1,6 (\pm 0,5) \times 10^2$  KSV/μg DNR iki  $2,4 (\pm 0,8) \times 10^2$  KSV/μg DNR). Didžiausias transformacijos efektyvumas gaunamas, transformantų regeneracijai parinkus 52 °C temperatūrą ( $4,6 (\pm 1,8) \times 10^2$  KSV/μg DNR). Pakėlus temperatūrą iki 55 °C, stebimas elektrotransformacijos efektyvumo mažėjimas ( $3,3 (\pm 1,5) \times 10^2$  KSV/μg DNR). Tačiau analizuojant gautus rezultatus, stebimas gana didelis rezultatų išsibarstymas apie vidurkį (52 °C ir 55 °C temperatūrų atveju). Neatmetama tikimybė, kad atliekant transformantų regeneraciją 52 °C ir 55 °C temperatūroje gauname panašius rezultatus, tik dėl jų išsibarstymo, negalime tinkamai įvertinti. Sekantiems tyrimams atlikti pasirenkama 52 °C regeneracijos temperatūra.

Sekantis svarbus parametras bakterijų transformacijos efektyvumui – regeneracijos ir transformantų išsėjimo terpės. Kompetentinių ląstelių regeneracijai naudotos dvi terpės: TGP ir 2SPY (2SPYNG terpė papildyta 10 % gliceroliu). Ląstelių išsėjimui naudotos trys terpės: TGP, TSA ir 2SPYNG. Gauti rezultatai pateikti 3.3 lentelėje. Elektroporuotų ląstelių regeneracijai ir išsėjimui naudojant TGP terpę transformacijos efektyvumas gautas  $4,7 (\pm 4,7) \times 10^3$  KSV/μg DNR. Regeneracijai naudojant TGP, o išsėjimui TSA terpę gaunamas  $2,2 (\pm 1,9) \times 10^2$  KSV/μg DNR. Nė viena transformanto kolonija nebuvo gauta išsėjant ląsteles ant 2SPYNG agarizuotos terpės, prieš tai ląsteles regeneruojant tiek TGP, tiek 2SPY terpėse. Ląstelės regeneruotos 2SPY terpėje ir išsėtos ant

selektyvių TGP ir TSA terpių, pasižymėjo  $8,8 (\pm 7,0) \times 10^1$  KfV/ $\mu$ g DNR ir  $9,8 (\pm 8,3) \times 10^1$  KfV/ $\mu$ g DNR elektrotransformacijos efektyvumu.

**3.3 lentelė.** Regeneracijos ir išsėjimo terpės įtaka transformacijos efektyvumui. Bakterijų kultūra auginta 2SPYNG terpėje iki  $OT_{600} = 2,0$ . Kompetentinės ląstelės sumaišytos su  $1 \mu\text{L}$  ( $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) plazmidine DNR ir elektroporuojamos  $23 \text{ kV}/\text{cm}$  elektriniu lauko stipriu. Transformuotos ląstelės regeneruotos  $52 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje  $1,5 \text{ val.}$

Regeneracijos terpė	Išsėjimo terpė	Transformacijos efektyvumas (KfV/ $\mu$ g DNR)
TGP	TGP	$4,7 (\pm 4,7) \times 10^3$
TGP	TSA	$2,2 (\pm 1,9) \times 10^2$
TGP	2SPYNG	0,0
2SPY	2SPYNG	0,0
2SPY	TGP	$8,8 (\pm 7,0) \times 10^1$
2SPY	TSA	$9,8 (\pm 8,3) \times 10^1$

Nustatyta, kad TGP yra geriausias pasirinkimas tiek transformuotų ląstelių regeneracijai, tiek išsėjimui. Gaunamas didžiausias elektrotransformacijos efektyvumas  $4,7 (\pm 4,7) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR. Ląsteles regeneruojant TGP terpėje ir jas išsėjant ant TSA terpės transformacijos efektyvumas ( $10^2$  KfV/ $\mu$ g DNR) gaunamas mažesnis lyginant su TGP agarizuota terpe ( $10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR). Regeneracijai pasirinkus 2SPY terpę ir transformantus išsėjus tiek ant TGP, tiek ant TSA terpės, rezultatai gaunami panašūs ( $10^1$  KfV/ $\mu$ g DNR). Nustatyta, kad TSA terpė gali būti naudojama transformantų atrankai. Taip pat gauti rezultatai parodė, kad 2SPYNG nėra tinkama transformuotų ląstelių išsėjimui. Elektriniu impulsu paveiktas ląsteles regeneruojant TGP arba 2SPY terpėje ir išsėjant ant 2SPYNG negaunama nė viena transformanto kolonija.

Nors 3.1.1 skyrelyje pateikti rezultatai rodo, kad turtingesnės sudėties augimo terpės naudojimas negarantuoja didesnio transformacijos efektyvumo, bet galima spręsti, kad terpės sudėtis yra svarbi ląsteles regeneruojant ir atrankant transformantus. Regeneracijai ir atrankai naudojant turtingesnės sudėties mitybinę terpę, elektrinio lauko impulsu paveiktos ląstelės galbūt atsistato greičiau ir taip išlaikomas ląstelių gyvybingumas.

Šio tyrimo etapuose aprašytas optimizuotas *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> elektroporacijos protokolas ir gautas didžiausias  $4,8 (\pm 0,9) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR transformacijos efektyvumas. Elektrotransformacijos optimizavimas apėmė visus tris etapus: kompetentinių ląstelių

paruošimą, elektroporaciją bei ląstelių regeneraciją. Optimizuoti iš viso 7 parametrai: augimo terpė (2SPYNG), augimo fazė (eksponentinės fazės pradžia,  $OT_{600} = 2,0$ ), elektrinio lauko stipris (23 KV/cm), plazmidės kiekis (2  $\mu$ L, 100 ng/ $\mu$ L), regeneracijos temperatūra (52 °C), regeneracijos (TGP) ir išsėjimo (TGP) terpės.

### 3.2 *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> genetinės transformacijos įvertinimas naudojant stačiakampio formos elektrinio lauko bangų elektroporatorių

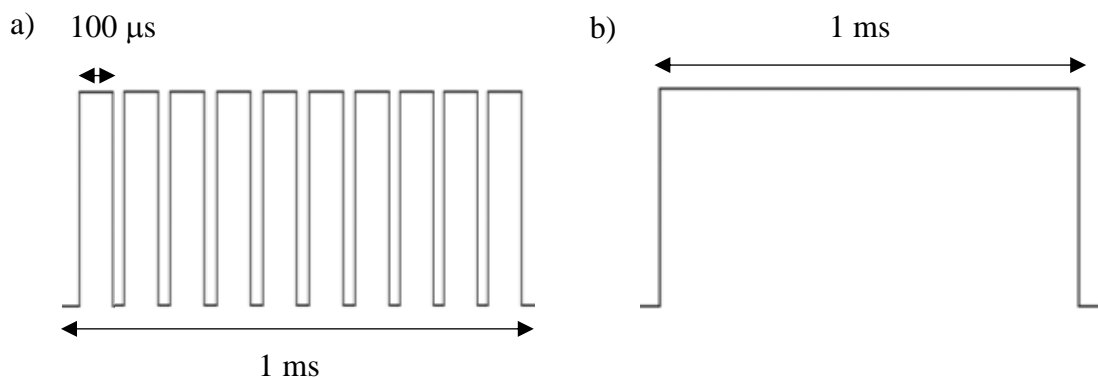
Žinoma, kad transformacijos efektyvumas gali priklausyti nuo naudojamo elektrinio lauko bangos formos. Teigiama, kad ląsteles elektroporuojuojant stačiakampio formos bangomis gali būti gaunamas aukštesnis transformacijos efektyvumas lyginant su eksponentinio nykimo bangomis (Novickij ir kt., 2022). Remiantis tuo, siekėme įvertinti *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> genetinės transformacijos efektyvumą, keičiant stačiakampio formos elektrinio lauko bangų elektroporatoriaus parametrus.

Šio tyrimo metu buvo siekiama įvertinti įvairių elektroporacijos parametrų (elektrinio lauko stiprio, impulso trukmės ir impulsų skaičiaus) įtaką transformacijos efektyvumui, naudojant stačiakampio formos bangų elektroporatorių.

Elektrokompetentinių ląstelių paruošimas ir elektroporacija vykdoma pagal anksčiau atliktų eksperimentų metu optimizuotas sąlygas. Ląstelės augintos 2SPYNG terpėje iki eksponentinės fazės pradžios  $OT_{600} = 2,0$ . Paimama 80  $\mu$ L elektrokompetentinių ląstelių ir sumaišoma su 2  $\mu$ L (126 ng/ $\mu$ L) plazmidinės DNR. Visas paruoštas elektroporacijos mišinys (82  $\mu$ L) perkeliamas į lede atšaldytą 1 mm pločio elektroporacijos kiuvetę ir ląstelės elektroporuojamos. Transformuotos ląstelės užpildytos TGP terpe ir regeneruotos 52 °C temperatūroje 1,5 val. Po regeneracijos ląstelės užsėtos ant selektyvios agarizuotos TGP terpės ir inkubuojamos termostate 55 °C temperatūroje. Sekančią dieną suskaičiuotos transformantų kolonijos ir įvertintas transformacijos efektyvumas.

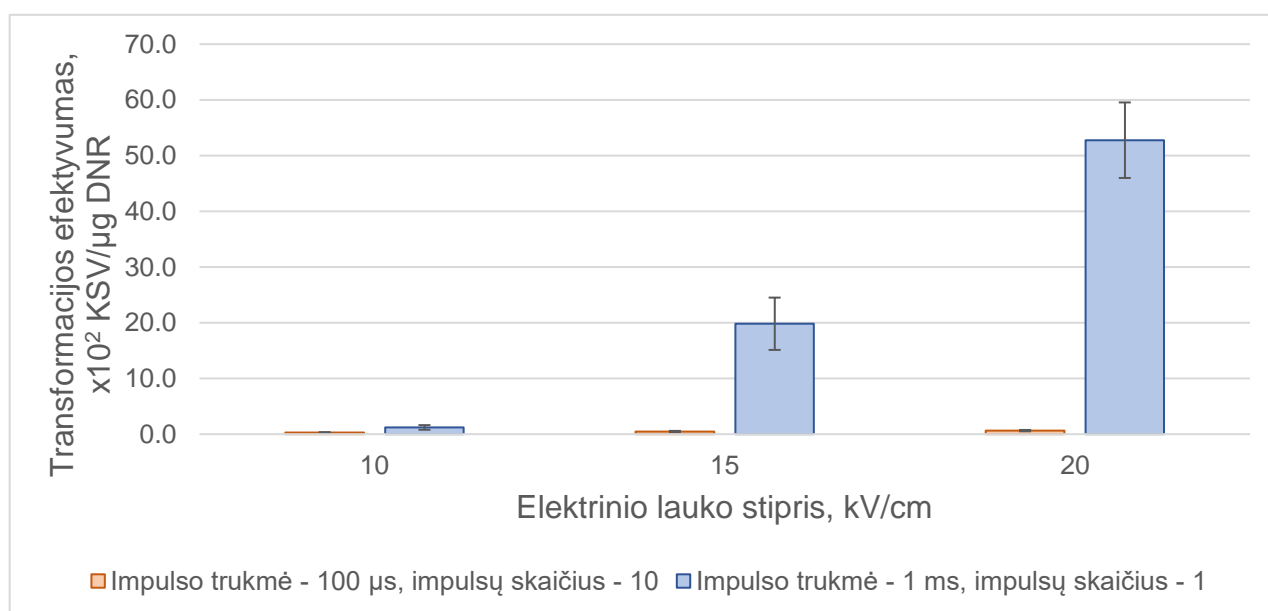
Visų pirma, įvertinta elektrinio lauko stiprio ir impulso trukmės įtaka transformacijos efektyvumui. Kompetentinės ląstelės buvo elektroporuojamos taikant skirtingas elektrinio lauko stiprio vertes – 10; 15 ir 20 kV/cm. Siekiant įvertinti elektrinio lauko impulso trukmės įtaką *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> transformacijos efektyvumui, kompetentinės ląstelės buvo veikiamos elektrinio lauko bangomis 2 skirtingomis sąlygomis (žr. 3.6 pav.):

- 1) 10 elektrinio lauko impulsų po 100  $\mu$ s, kurių bendra veikimo trukmė ~1 ms;
- 2) 1 elektrinio lauko impulsas, kurio trukmė 1 ms.



**3.6 pav.** Skirtingo skaičiaus ir trukmės elektrinio lauko impulsai. a) 10 elektrinio lauko impulsų, kurių trukmė po 100  $\mu$ s; b) vienas elektrinio lauko impulsas, kurio trukmė 1 ms.

Pagal gautus rezultatus matoma (žr. 3.7 pav.), kad kompetentines ląsteles elektroporuojant 10 kV/cm elektrinio lauko stipriu ir taikant 10 impulsų, kurių trukmė po 100  $\mu$ s, transformacijos efektyvumas siekia  $1,2 (\pm 0,4) \times 10^1$  KfV/ $\mu$ g DNR, 1 ms trukmės impulsas davė  $2,6 (\pm 1,0) \times 10^1$  KfV/ $\mu$ g DNR. Elektroporacijai pasirinkus 15 kV/cm elektrinio lauko stiprį gauname šiuos transformacijos efektyvumo rezultatus: naudojant 100  $\mu$ s trukmės impulsus –  $4,9 (\pm 1,0) \times 10^1$  KfV/ $\mu$ g DNR, o 1 ms trukmės impulsas –  $2,0 (\pm 0,5) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR. Taip pat įvertintas 20 kV/cm elektrinio lauko stipris. Elektroporuojant kompetentines ląsteles šiuo elektrinio lauko stipriu, transformacijos efektyvumas siekia  $6,4 (\pm 1,2) \times 10^1$  KfV/ $\mu$ g DNR naudojant 100  $\mu$ s trukmės impulsus. Naudojant 1 ms trukmės impulsą gauname  $5,3 (\pm 0,7) \times 10^3$  KfV/ $\mu$ g DNR.



**3.7 pav.** Elektrinio lauko stiprio ir impulso trukmės įtaka *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> transformacijos efektyvumui. Bakterijų kultūra auginta 2SPYNG terpėje iki OT<sub>600</sub> – 2,0. Kompetentinės ląstelės sumaišomos su 2  $\mu$ L (126 ng/ $\mu$ L) plazmidine DNR. Transformuotos ląstelės regeneruotos 52 °C temperatūroje 1,5 val. TGP terpėje ir išsėtos ant TGP agarizuotos terpės.



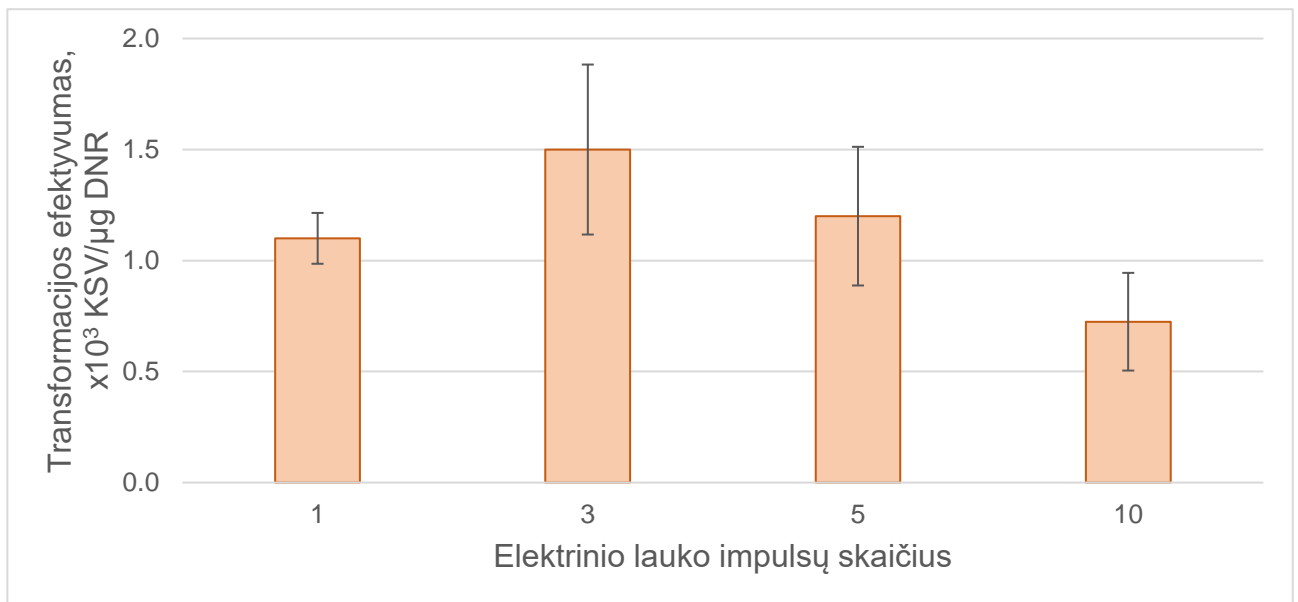
Atlikus kompetentinių *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> ląstelių elektroporaciją, pastebėtas didelis rezultatų skirtumas tarp pasirinktų sąlygų. Įvertinus transformacijos efektyvumą, nustatyta, kad taikant vieną impulsą, kurio stipris 20 kV/cm ir trukmė 1 ms, transformacijos efektyvumas gaunamas didžiausias –  $5,3 (\pm 0,7) \times 10^3$  KFV/ $\mu$ g DNR. Mažiausias transformacijos efektyvumas ( $1,2 (\pm 0,4) \times 10^1$  KFV/ $\mu$ g DNR) gaunamas, kai ląstelės veikiamos 10 impulsų, kurių trukmė po 100  $\mu$ s ir stipris 10 kV/cm. Nustatyta, kad didinant elektrinio lauko stiprį (nuo 10 kV/cm iki 20 kV/cm), gaunamas didėjantis transformacijos efektyvumas.

Taip pat nustatyta, kad tinkamai parinkta impulso trukmė gali duoti ženkliai geresnį rezultatą. Elektrotransformacijai naudojant 100  $\mu$ s elektrinio lauko impulsus, transformacijos efektyvumas siekia  $\sim 10^1$  KFV/ $\mu$ g DNR. Naudojant tokio tipo impulsus ir didinant elektrinio lauko stiprį (nuo 10 kV/cm iki 20 kV/cm), transformacijos efektyvumas didėja nežymiai ir išlieka panašus ( $1,2\text{--}6,4 \times 10^1$  KFV/ $\mu$ g DNR). Tuo tarpu naudojant 1 ms trukmės impulsus, transformacijos efektyvumą galima gauti net dviem eilėmis didesnę –  $\sim 10^3$  KFV/ $\mu$ g DNR.

Trečias parametras, kurio įtaką elektrotransformacijos efektyvumui siekėme nustatyti – elektrinio lauko impulsų skaičius. Kompetentinės ląstelės buvo paveikiamos skirtingu elektrinio lauko impulsų skaičiumi (1, 3, 5 ir 10 impulsų) naudojant 20 kV/cm elektrinio lauko stiprį ir 1 ms trukmės impulsus. Gauti rezultatai pateikti 3.8 paveiksle. Nustatyta, kad kompetentines ląsteles elektroporuojant vienu elektrinio lauko impulsu gaunamas  $1,1 (\pm 0,1) \times 10^3$  KFV/ $\mu$ g DNR, trimis impulsais –  $1,5 (\pm 0,4) \times 10^3$  KFV/ $\mu$ g DNR, penkiais impulsais –  $1,2 (\pm 0,3) \times 10^3$  KFV/ $\mu$ g DNR, o elektroporuojant dešimčia impulsų transformacijos efektyvumas siekia  $0,7 (\pm 0,2) \times 10^3$  KFV/ $\mu$ g DNR.

Didinant elektrinio lauko impulsų skaičių, transformacijos efektyvumas padidėja. Trys elektrinio lauko impulsai yra riba iki kurios ląstelės nėra pažeidžiamos ir gaunami aukštesni efektyvumo rezultatai. Elektroporacijos metu naudojant 5 ir didesnę impulsų skaičių, transformacijos efektyvumas mažėja dėl sukeltos ląstelių žūties. Taikant tris elektrinio lauko impulsus gaunamas didžiausias transformacijos efektyvumas.

Tačiau pastebėta, kad buvo gautas žemesnis transformacijos efektyvumas ( $1,5 (\pm 0,4) \times 10^3$  KFV/ $\mu$ g DNR) palyginus su ankstesnio eksperimento rezultatais ( $5,3 (\pm 0,7) \times 10^3$  KFV/ $\mu$ g DNR). Kadangi kiekvieno atskiro ruošimo kompetentinės ląstelės buvo naudojamos tik vienam parametrai įvertinti, išlieka galimybė, kad buvo gautos „prastesnės kokybės“ kompetentinės ląstelės, kurios nulėmė mažesnę transformacijos efektyvumą.



**3.8 pav.** Elektrinio lauko stiprio įtaka *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> transformacijos efektyvumui. Bakterijų kultūra auginta 2SPYNG terpėje iki OT<sub>600</sub> – 2,0. Kompetentinės ląstelės sumaišomos su 2  $\mu$ L (126 ng/ $\mu$ L) plazmidine DNR. Ląstelės elektroporuojamos 20 kV/cm ir 1 ms elektrinio lauko impulsu. Ląstelės regeneruotos 52 °C 1,5 val. temperatūroje TGP terpėje ir išsėtos ant TGP agarizuotos terpės.

Šio tyrimo metu aprašytas optimizuotas *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> elektroporacijos protokolas, naudojant stačiakampio formos elektrinio lauko elektroporatorių. Parinktos optimalios elektroporacijos sąlygos maksimaliam transformacijos efektyvumui: elektrinio lauko stipris (20 KV/cm), elektrinio lauko impulsų trukmė (1 ms) ir impulsų skaičius (3). Šis transformacijos protokolas, naudojant stačiakampio formos bangų elektroporatorių, leido gauti panašų transformacijos efektyvumą ( $5,3 (\pm 0,7) \times 10^3$  KSV/ $\mu$ g DNR) kaip ir eksponentinio nykimo bangų elektroporatorius ( $4,8 (\pm 0,9) \times 10^3$  KSV/ $\mu$ g DNR).

### 3.3 Transformuojamų termofilinių bakterijų atranka

Atrinktus *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> elektrotransformacijos parametrus sujungėme į vieną optimizuotą protokolą, kurį panaudojome transformuojamų termofilinių bakterijų kamienų, esančių VU GMC Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros mikroorganizmų kultūrų kolekcijoje, atrankai. Atrankai parinktos termofilinės bakterijos, kurios literatūroje nepateikiamos kaip transformuojamos arba pateikiamos kaip sunkiai transformuojamos ar transformuojamos kitais, bet ne elektroporacijos, metodais (Wada ir Suzuki, 2020). Pasirinktos šios bakterijos: *Geobacillus* sp. 15, *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>, *Geobacillus thermocatenulatus* DSM 730<sup>T</sup>, *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup>, *Parageobacillus toebii* DSM 14590<sup>T</sup>, *Geobacillus jurassicus* DSM 15726<sup>T</sup>, *Anoxybacillus tepidamans* DSM 16325<sup>T</sup>.

Visų pirma, termofilinių bakterijų kamienai buvo auginti 2SPYNG terpėje ir sudarytos jų augimo kreivės (žr. 2 priedą). Remiantis augimo kreivėmis, kompetentinės ląstelės paruoštos auginant iki eksponentinės fazės pradžios. Taikant prieš tai optimizuotas elektroporacijos sąlygas ląstelės buvo transformuojamos stačiakampio formos elektrinio lauko bangų elektroporatoriumi. Eksperimento metu kamienai buvo transformuojami naudojant dvi plazmidės: pG2K (turinčią repB replikoną ir atsparumo kanamicinui geną) ir pG1C (turinčią repBSTI replikoną ir atsparumo chloramfenikoliui geną).

Pagal gautus rezultatus (žr. 3.4 lentelę), naudojant *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> optimizuotą elektroporacijos protokolą, iš 7 termofilinių bakterijų kamienų pavyko transformuoti tik 1 – *G. thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup>. Transformacija atlikta su pG2K plazmide ir gautas itin žemas transformacijos efektyvumas, kuris tesiekė 6,6 (± 4,6) KFV/μg DNR. Nebuvo galima įvertinti *G. thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup> transformacijos efektyvumo, elektroporuoiant pG2K plazmide, dėl šio kamieno atsparumo kanamicinui. Taip pat nepavyko įvertinti *P. toebii* DSM 14590<sup>T</sup> transformacijos efektyvumo. Kompetentinių ląstelių ruošimo metu buvo gautas itin mažas jų kiekis, kuris nebuvo pakankamas elektroporacijai atlikti. Likusių kamienų (*Geobacillus* sp. 15, *G. thermocatenulatus* DSM 730<sup>T</sup>, *G. jurassicus* DSM 15726<sup>T</sup>, *A. tepidamans* DSM 16325<sup>T</sup>) taip pat nepavyko transformuoti. Nebuvo gauta nė viena transformanto kolonija.

**3.4 lentelė.** Termofilinių *Geobacillus*, *Parageobacillus* ir *Anoxybacillus* kamienų elektrotransformacijos efektyvumas optimaliomis sąlygomis.

Kamienas	Optinis tankis, OT <sub>600</sub>	Naudota plazmidė	Transformacijos efektyvumas (KFV/μg DNR)
<i>Geobacillus</i> sp. 15	0,5	pG2K	0
		pG1C	0
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 <sup>T</sup>	3,6	pG2K	___ <sup>a</sup>
		pG1C	0
<i>G. thermocatenulatus</i> DSM 730 <sup>T</sup>	1,0	pG2K	0
		pG1C	0
<i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366 <sup>T</sup>	2,6	pG2K	6,6 (± 4,6)
		pG1C	0
<i>P. toebii</i> DSM 14590 <sup>T</sup>	0,5	pG2K	___ <sup>b</sup>

		pG1C	___ <sup>b</sup>
<i>G. jurassicus</i> DSM 15726 <sup>T</sup>	2,0	pG2K	0
		pG1C	0
<i>A. tepidamans</i> DSM 16325 <sup>T</sup>	0,5	pG2K	0
		pG1C	0

<sup>a</sup> – nevertinamas rezultatas, dėl kamieno atsparumo antibiotikui.

<sup>b</sup> – nevertinamas rezultatas, dėl nepakankamo kompetentinių ląstelių tūrio elektroporacijai atlikti.

Remiantis optimizuotu elektrotransformacijos protokolu, iš 7 termofilinių bakterijų kamienų identifikuotas tik vienas, kuris gali būti imlus elektrotransformacijai. Nors *G. thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup> kamieno elektroporacija leido gauti itin žemo efektyvumo transformaciją (<10<sup>1</sup> KfV/μg DNR), tačiau tai gali būti atspirties taškas tolimesniems tyrimams atlikti.

Nustatyta, kad 6 iš 7 termofilinių bakterijų kamienų, priklausančių *Geobacillus*, *Parageobacillus* ir *Anoxybacillus* gentims, nėra transformuojami elektroporacijos būdu. Tai gali nulemti termofilinių bakterijų restrikcijos modifikacijos (R-M) sistemos, kurios degraduoja patekusią plazmidinę DNR ir taip neleidamos jai įsitvirtinti ląstelėje. Nepaisant to, ateityje vertėtų išbandyti kitos genetinės transformacijos metodus, pavyzdžiui, konjugaciją. Elektroporacija šiems kamienams greičiausiai nėra tinkamiausias genetinės transformacijos metodas.

## IŠVADOS

1. Nustatytos *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> kamieno kompetentinių ląstelių paruošimo sąlygos, kuriomis gaunamas didžiausias elektrotransformacijos efektyvumas  $(4,7 (\pm 4,7) \times 10^3 \text{ KfV}/\mu\text{g DNR})$ :
  - auginama iki eksponentinės augimo fazės pradžios ( $OT_{600} - 2,0$ );
  - augimo terpė – 2SPYNG;
  - transformantų regeneracijos temperatūra – 52 °C;
  - transformantų regeneracijos ir išsėjimo terpė – TGP.
2. Nustatytas optimalus *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> kamieno elektrotransformacijos elektrinio lauko stipris (23 kV/cm) ir plazmidės kiekis (2  $\mu\text{L}$ , 100 ng/ $\mu\text{L}$ ), kuriomis gaunamas didžiausias transformantų kiekis  $(4,8 (\pm 0,9) \times 10^3 \text{ KfV}/\mu\text{g DNR})$ .
3. Nustatytas optimalios *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> kamieno genetinės elektrotransformacijos sąlygos, naudojant stačiakampio formos elektrinio lauko elektroporatorių, kuriomis gaunamas didžiausias elektrotransformacijos efektyvumas  $(5,3 (\pm 0,7) \times 10^3 \text{ KfV}/\mu\text{g DNR})$ :
  - elektrinio lauko stipris – 20 kV/cm;
  - elektrinio lauko impulso trukmė – 1 ms;
  - elektrinio lauko impulsų skaičius – 3.
4. Iš 7 testuotų termofilinių bakterijų kamienų pavyko transformuoti tik *G. thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup> kamieną. Transformacijos efektyvumas siekė  $< 10^1 \text{ KfV}/\mu\text{g DNR}$ .

# SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS

GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Monika Maselytė

Magistro baigiamasis darbas

## **TRANSFORMUOJAMŲ TERMOFILINIŲ BAKTERIJŲ ATRANKA IR JŲ GENETINĖS TRANSFORMACIJOS OPTIMIZAVIMAS**

### SANTRAUKA

Termofilinės bakterijos yra ekstremofiliniai mikroorganizmai, gebantys augti aukštoje temperatūroje (>45 °C). Šios bakterijos itin svarbios biotechnologijoje dėl termostabilių fermentų (amilazės, ksilanazės, esterazės ir kt.) bei panaudojimo įvairiuose procesuose (biokuro gamyba, bioremediacija ir metalų nanodalelių biosintezėje). Tačiau platesnį termofilinių bakterijų pritaikymą apsunkina jų sudėtinga genetinė transformacija ir žinoma mažai kamienų, kurie gali būti transformuojami. Elektroporacija tai vienas paprasčiausių ir dažniausiai taikomų genetinės medžiagos pernašos metodų, kuris gali būti pritaikytas termofilinėms bakterijoms. Tačiau, kad šis metodas būtų pritaikytas konkrečiam bakterijų kamieno transformacijai, iš pradžių turi būti optimizuotas.

Šio darbo tikslas buvo atlikti *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> genetinės transformacijos, naudojant elektroporacijos metodą, optimizavimą. Optimizuoti iš viso 7 parametrai: augimo terpė (2SPYNG), augimo fazė (eksponentinės fazės pradžia, OT<sub>600</sub> – 2,0), elektrinio lauko stipris (23 KV/cm), plazmidės kiekis (2 μL, 100 ng/μL), regeneracijos temperatūra (52 °C), regeneracijos (TGP) ir išsėjimo terpės (TGP). Gautas didžiausias transformacijos efektyvumas siekė  $4,8 (\pm 0,9) \times 10^3$  KfV/μg DNR. Taip pat įvertintas *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> genetinės transformacijos efektyvumas naudojant stačiakampio formos elektrinio lauko elektroporatorių. Optimalios elektroporacijos sąlygos maksimaliam transformacijos efektyvumui buvo šios: elektrinio lauko stipris (20 KV/cm), elektrinio lauko impulsų trukmė (1 ms) ir impulsų skaičius (3). Gautas didžiausias transformacijos efektyvumas siekė  $5,3 (\pm 0,7) \times 10^3$  KfV/μg DNR.

Taip pat atlikta transformuojamų termofilinių bakterijų atranka, panaudojant optimizuotą *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> elektroporacijos protokolą. Nustatyta, kad iš 7 termofilinių bakterijų, priklausančių *Geobacillus*, *Parageobacillus* ir *Anoxybacillus* gentims, pavyko transformuoti tik *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup> kamieną.

# SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTER

Monika Maselytė

Master thesis

## **SELECTION OF TRANSFORMABLE THERMOPHILIC BACTERIA AND OPTIMIZATION OF THEIR GENETIC TRANSFORMATION**

Thermophilic bacteria are extremophilic microorganisms which are capable of growing at high temperatures (>45 °C). These bacteria are extremely important in biotechnology due to their thermostable enzymes (amylase, xylanase, esterase, etc.) and their use in various processes (biofuel production, bioremediation and biosynthesis of metal nanoparticles). However, the wider application of thermophilic bacteria is prevented by their complicated genetic transformation and few strains are known that can be transformed. Electroporation is one of the most applicable methods of genetic material transfer, which can be applied to thermophilic bacteria. However, in order to apply this method to a specific transformation of a bacterial strain, first it must be optimized.

The aim of this work was to optimize the genetic transformation of *Parageobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> using the electroporation method. A total of 7 parameters were optimized: growth medium (2SPYNG), growth phase (beginning of exponential phase, OT<sub>600</sub> – 2.0), electric field strength (23 kV/cm), plasmid amount (2 μL, 100 ng/μL), regeneration temperature (52 °C), regeneration (TGP) and selective media (TGP). The maximum transformation efficiency obtained was  $4,8 (\pm 0,9) \times 10^3$  CFU/μg DNA. The efficiency of genetic transformation of *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup> using a square electric field electroporator was also evaluated. The optimal electroporation conditions for maximum transformation efficiency were electric field strength (20 kV/cm), duration of electric field pulses (1 ms) and number of pulses (3). The obtained maximum transformation efficiency was  $5,3 (\pm 0,7) \times 10^3$  CFU/μg DNA.

The selection of transformed thermophilic bacteria was also carried out using the optimized electroporation protocol of *P. thermoglucosidasius* DSM 2542<sup>T</sup>. It was found that out of 7 strains of thermophilic bacteria belonging to the genera *Geobacillus*, *Parageobacillus* and *Anoxybacillus*, only *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup> strain was able to be transformed.

## PADĖKA

Norėčiau padėkoti savo darbo vadovui dr. Arnoldui Kauniečiui, už suteiktą galimybę plačiau pažinti mikroorganizmų pasaulį, už suteiktas žinias, patirtį ir patarimus. Taip pat dėkoju visiems laboratorijos kolegoms bei savo šeimai už palaikymą visus šiuos mokslo metus ir rengiant šį darbą.



## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abo-Alkasem, M. I., Hassan, N. H., & Abo Elsoud, M. M. (2023). Microbial bioremediation as a tool for the removal of heavy metals. *Bulletin of the National Research Centre*, 47(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s42269-023-01006-z>
2. Ahmad, Q.-A., & Qazi, J. I. (2014). Thermophilic fermentations of lignocellulosic substrates and economics of biofuels: Prospects in Pakistan. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 5(2–3), 94. <https://doi.org/10.1007/s40095-014-0094-4>
3. Ahmed, Z., Zulfiqar, H., Tang, L., & Lin, H. (2022). A Statistical Analysis of the Sequence and Structure of Thermophilic and Non-Thermophilic Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 10116. <https://doi.org/10.3390/ijms231710116>
4. Akanuma, S., Bessho, M., Kimura, H., Furukawa, R., Yokobori, S., & Yamagishi, A. (2019). Establishment of mesophilic-like catalytic properties in a thermophilic enzyme without affecting its thermal stability. *Scientific Reports*, 9(1), 9346. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45560-x>
5. Akarsu, C., Özdemir, S., Ozay, Y., Acer, Ö., & Dizge, N. (2022). Investigation of two different size microplastic degradation ability of thermophilic bacteria using polyethylene polymers. *Environmental Technology*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/09593330.2022.2071638>
6. Akasmatsu, T., & Sekiguchi, J. (1984). An Improved Method of Protoplast Regeneration for *Bacillus* Species and Its Application to Protoplast Fusion and Transformation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(3), 651–655. <https://doi.org/10.1080/00021369.1984.10866199>
7. Arai, T., Aikawa, S., Sudesh, K., Kondo, T., & Kosugi, A. (2022). Electrotransformation of thermophilic bacterium *Caldimonas manganoxidans*. *Journal of Microbiological Methods*, 192, 106375. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106375>
8. Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S. U., & Legge, R. L. (2007). A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 6, 950–955.
9. Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., & Blamey, J. M. (2019). Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology*, 280, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>
10. Atalah, J., Espina, G., Blamey, L., Muñoz-Ibacache, S. A., & Blamey, J. M. (2022). Advantages of Using Extremophilic Bacteria for the Biosynthesis of Metallic Nanoparticles and Its Potential for Rare Earth Element Recovery. *Frontiers in Microbiology*, 13, 855077. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.855077>
11. Atanasova, N., Stoitsova, S., Paunova-Krasteva, T., & Kambourova, M. (2021). Plastic Degradation by Extremophilic Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5610. <https://doi.org/10.3390/ijms22115610>
12. Augustin, J., & Götz, F. (1990). Transformation of *Staphylococcus epidermidis* and other staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation. *FEMS microbiology letters*, 54(1-3), 203–207. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90283-v](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90283-v)

13. Aune, T. E. V., & Aachmann, F. L. (2010). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1301–1313. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2349-1>
14. Bakir, Z. B., & Metin, K. (2016). Purification and Characterization of an Alkali-Thermostable Lipase from Thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 1087–1097. <https://doi.org/10.4014/jmb.1512.12056>
15. Bartholomew, J. W., & Paik, G. (1966). Isolation and Identification of Obligate Thermophilic Sporeforming Bacilli from Ocean Basin Cores. *Journal of Bacteriology*, 92(3), 635–638. <https://doi.org/10.1128/jb.92.3.635-638.1966>
16. Belin, B. J., Busset, N., Giraud, E., Molinaro, A., Silipo, A., & Newman, D. K. (2018). Hopanoid lipids: From membranes to plant–bacteria interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 304–315. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.173>
17. Bello-López, J. M., Cabrero-Martínez, O. A., Ibáñez-Cervantes, G., Hernández-Cortez, C., Pelcastre-Rodríguez, L. I., Gonzalez-Avila, L. U., & Castro-Escarpulli, G. (2019). Horizontal Gene Transfer and Its Association with Antibiotic Resistance in the Genus *Aeromonas* spp. *Microorganisms*, 7(9), 363. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090363>
18. Bendia, A. G., Araujo, G. G., Pulschen, A. A., Contro, B., Duarte, R. T. D., Rodrigues, F., Galante, D., & Pellizari, V. H. (2018). Surviving in hot and cold: Psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica. *Extremophiles*, 22(6), 917–929. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1048-1>
19. Bjornsdottir, S. H., Thorbjarnardottir, S. H., & Eggertsson, G. (2005). Establishment of a gene transfer system for *Rhodothermus marinus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 675–682. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1730-3>
20. Boteva, N., & Kambourova, M. (2018). Thermophiles and Their Exploration for Thermostable Enzyme Production. *Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications* (T. 8, p. 167–186). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0329-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0329-6_6)
21. Cekuolyte, K., Gudiukaite, R., Klimkevicius, V., Mazrimaite, V., Maneikis, A., & Lastauskiene, E. (2023). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Produced Using *Geobacillus* spp. Bacteria. *Nanomaterials*, 13(4), 702. <https://doi.org/10.3390/nano13040702>
22. Chadha, B. S., Kaur, B., Basotra, N., Tsang, A., & Pandey, A. (2019). Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: Current perspective. *Bioresource Technology*, 277, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.044>
23. Chang, S., & Cohen, S. N. (1979). High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Molecular and General Genetics MGG*, 168(1), 111–115. <https://doi.org/10.1007/BF00267940>
24. Chien, A., Edgar, D. B., & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1550–1557. <https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976>
25. Correa-Llantén, D. N., Muñoz-Ibacache, S. A., Castro, M. E., Muñoz, P. A., & Blamey, J. M. (2013). Gold nanoparticles synthesized by *Geobacillus* sp. Strain ID17 a thermophilic

- bacterium isolated from Deception Island, Antarctica. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-75>
26. Cripps, R. E., Eley, K., Leak, D. J., Rudd, B., Taylor, M., Todd, M., Boakes, S., Martin, S., & Atkinson, T. (2009). Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metabolic Engineering*, 11(6), 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.08.005>
  27. Deljou, A., & Goudarzi, S. (2016). Green Extracellular Synthesis of the Silver Nanoparticles Using Thermophilic *Bacillus* Sp. AZ1 and its Antimicrobial Activity Against Several Human Pathogenetic Bacteria. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(2), 25–32. <https://doi.org/10.15171/ijb.1259>
  28. Drejer, E., Hakvåg, S., Irla, M., & Brautaset, T. (2018). Genetic Tools and Techniques for Recombinant Expression in Thermophilic Bacillaceae. *Microorganisms*, 6(2), 42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020042>
  29. Elyasi Far, B., Ahmadi, Y., Yari Khosroshahi, A., & Dilmaghani, A. (2020). Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3), 350–358. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>
  30. Elumalai, P., Parthipan, P., Narenkumar, J., Anandakumar, B., Madhavan, J., Oh, B.-T., & Rajasekar, A. (2019). Role of thermophilic bacteria (*Bacillus* and *Geobacillus*) on crude oil degradation and biocorrosion in oil reservoir environment. *3 Biotech*, 9(3), 79. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1604-0>
  31. Erasmus, M., Cason, E. D., van Marwijk, J., Botes, E., Gericke, M., & van Heerden, E. (2014). Gold nanoparticle synthesis using the thermophilic bacterium *Thermus scotoductus* SA-01 and the purification and characterization of its unusual gold reducing protein. *Gold Bulletin*, 47(4), 245–253. <https://doi.org/10.1007/s13404-014-0147-8>
  32. Finch, A., & Kim, J. (2018). Thermophilic Proteins as Versatile Scaffolds for Protein Engineering. *Microorganisms*, 6(4), 97. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040097>
  33. Frenzel, E., Legebeke, J., Van Stralen, A., Van Kranenburg, R., & Kuipers, O. P. (2018). In vivo selection of sfGFP variants with improved and reliable functionality in industrially important thermophilic bacteria. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-1008-5>
  34. Galtier, N., & Lobry, J. R. (1997). Relationships Between Genomic G+C Content, RNA Secondary Structures, and Optimal Growth Temperature in Prokaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 44(6), 632–636. <https://doi.org/10.1007/PL00006186>
  35. Gromiha, M. M., Pathak, M. C., Saraboji, K., Ortlund, E. A., & Gaucher, E. A. (2013). Hydrophobic environment is a key factor for the stability of thermophilic proteins: Stability of Thermophilic Proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(4), 715–721. <https://doi.org/10.1002/prot.24232>
  36. Han, H., Ling, Z., Khan, A., Virk, A. K., Kulshrestha, S., & Li, X. (2019). Improvements of thermophilic enzymes: From genetic modifications to applications. *Bioresource Technology*, 279, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.087>

37. Hickey, D. A., & Singer, G. A. (2004). Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. *Genome Biology*, 7.
38. Hollien, J., & Marqusee, S. (1999). Structural distribution of stability in a thermophilic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13674–13678. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13674>
39. Hurst, L. D., & Merchant, A. R. (2001). High guanine–cytosine content is not an adaptation to high temperature: A comparative analysis amongst prokaryotes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1466), 493–497. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1397>
40. Yi, Y., & Kuipers, O. P. (2017). Development of an efficient electroporation method for rhizobacterial *Bacillus mycoides* strains. *Journal of Microbiological Methods*, 133, 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.12.022>
41. Imanaka, T., Fujii, M., Aramori, I., & Aiba, S. (1982). Transformation of *Bacillus stearothermophilus* with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 149(3), 824–830. <https://doi.org/10.1128/jb.149.3.824-830.1982>
42. Young, J. L., & Dean, D. A. (2015). Electroporation-Mediated Gene Delivery. *Advances in Genetics* (T. 89, p. 49–88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2014.10.003>
43. Irvani, S. (2014). Bacteria in Nanoparticle Synthesis: Current Status and Future Prospects. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/359316>
44. Yu, S., Yu, S., Han, W., Wang, H., Zheng, B., & Feng, Y. (2010). A novel thermophilic lipase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1 representing a new subfamily of bacterial lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(1–2), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.03.007>
45. Jeon, S., Kang, N. K., Suh, W. I., Koh, H. G., Lee, B., & Chang, Y. K. (2019). Optimization of electroporation-based multiple pulses and further improvement of transformation efficiency using bacterial conditioned medium for *Nannochloropsis salina*. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1153–1161. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1599-7>
46. Jiang, Y., Xin, F., Lu, J., Dong, W., Zhang, W., Zhang, M., Wu, H., Ma, J., & Jiang, M. (2017). State of the art review of biofuels production from lignocellulose by thermophilic bacteria. *Bioresource Technology*, 245, 1498–1506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.142>
47. Kananavičiūtė, R., Kanišauskaitė, I., Novickij, V., & Čitavičius, D. J. (2015). *Geobacillus stearothermophilus* NUB3621R genetic transformation by electroporation. *Biologija*, 61(3–4). <https://doi.org/10.6001/biologija.v61i3-4.3201>
48. Kaushik, S., Alatawi, A., Djiwanti, S. R., Pande, A., Skotti, E., & Soni, V. (2021). Potential of Extremophiles for Bioremediation. *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment* (T. 25, p. 293–328). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7447-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7447-4_12)
49. Kelly, L. C., Cockell, C. S., Piceno, Y. M., Andersen, G. L., Thorsteinsson, T., & Marteinsson, V. (2010). Bacterial Diversity of Weathered Terrestrial Icelandic Volcanic Glasses. *Microbial Ecology*, 60(4), 740–752. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9684-8>

50. Kim, Y. H., Han, K. S., Oh, S., You, S., & Kim, S. H. (2005). Optimization of technical conditions for the transformation of *Lactobacillus acidophilus* strains by electroporation. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 167–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02563.x>
51. Koga, Y. (2012). Thermal Adaptation of the Archaeal and Bacterial Lipid Membranes. *Archaea*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/789652>
52. Kolouchová, I., Timkina, E., Mařátková, O., Kyselová, L., & Řezanka, T. (2021). Analysis of Bacteriohopanoids from Thermophilic Bacteria by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Microorganisms*, 9(10), 2062. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102062>
53. Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Haberl Meglič, S., Peterka, M., & Miklavčič, D. (2015). Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 33(8), 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.002>
54. Koul, B., Poonia, A. K., Yadav, D., & Jin, J.-O. (2021). Microbe-Mediated Biosynthesis of Nanoparticles: Applications and Future Prospects. *Biomolecules*, 11(6), 886. <https://doi.org/10.3390/biom11060886>
55. Krut, Z., Gazit, D., Gazit, Z., & Pelled, G. (2022). Applications of Ultrasound-Mediated Gene Delivery in Regenerative Medicine. *Bioengineering*, 9(5), 190. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9050190>
56. Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., & Gupta, R. (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein expression and purification*, 41(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.12.010>
57. Lee, D.-W., Kim, H.-W., Lee, K.-W., Kim, B.-C., Choe, E.-A., Seung Lee, H.-, Kim, D.-S., & Pyun, Y.-R. (2001). Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6–7), 363–371. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00408-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00408-2)
58. Liang, C.-C., & Lee, W.-C. (1998). Characteristics and transformation of *Zymomonas mobilis* with plasmid pKT230 by electroporation. *Bioprocess Engineering*, 19(2), 81–85. <https://doi.org/10.1007/PL00009006>
59. Lin, L., Song, H., Ji, Y., He, Z., Pu, Y., Zhou, J., & Xu, J. (2010). Ultrasound-Mediated DNA Transformation in Thermophilic Gram-Positive Anaerobes. *PLoS ONE*, 5(9), e12582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012582>
60. Lin, L., & Xu, J. (2013). Dissecting and engineering metabolic and regulatory networks of thermophilic bacteria for biofuel production. *Biotechnology Advances*, 31(6), 827–837. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.03.003>
61. Lipscomb, G. L., Hahn, E. M., Crowley, A. T., & Adams, M. W. W. (2017). Reverse gyrase is essential for microbial growth at 95 °C. *Extremophiles*, 21(3), 603–608. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0929-z>
62. Löfblom, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., Ståhl, S., & Wernérus, H. (2007). Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism.

- Journal of Applied Microbiology*, 102(3), 736–747. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03127.x>
63. Loske AM, R. A. (2014). Genetic Transformation of Cells using Physical Methods. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, 05(04). <https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000237>
64. Lv, Y., Cheng, X., Chen, S., Liu, H., Wang, Y., Yao, C., & Rubinsky, B. (2020). Analysis of the Electric Field-Dependent Current During Electroporation Pulses. *IEEE Access*, 8, 93850–93856. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.2995151>
65. Mahmood, T., Zar, T., & Naqvi, S. M. S. (2008). Multiple pulses improve electroporation efficiency in *Agrobacterium tumefaciens*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(1), 0–0. <https://doi.org/10.2225/vol11-issue1-fulltext-1>
66. Mangrola, A. V., Patel, R. K., Dudhagara, P., Gandhi, H., Ghelani, A., Jain, K. R., Shah, H., & Mevada, V. A. (2022). Thermophiles: Physiology, Metabolism, Enzymology, and Adaptation Mechanisms. *Advances in Environmental Engineering and Green Technologies* (p. 65–93). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-9144-4.ch004>
67. Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D., & Sharma, A. K. (2016). Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*, 6(1), 81. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0368-z>
68. Miyano, M., Tanaka, K., Ishikawa, S., Mori, K., Miguel-Arribas, A., Meijer, W. J. J., & Yoshida, K. (2018). A novel method for transforming the thermophilic bacterium *Geobacillus kaustophilus*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0969-9>
69. Milojevic, T., Cramm, M. A., Hubert, C. R. J., & Westall, F. (2022). “Freezing” Thermophiles: From One Temperature Extreme to Another. *Microorganisms*, 10(12), 2417. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122417>
70. Mironov, V. A., Shcherbakova, V. A., Rivkina, E. M., & Gilichinsky, D. A. (2013). Thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus* from permafrost volcanic sedimentary rocks. *Microbiology*, 82(3), 389–392. <https://doi.org/10.1134/S0026261713030089>
71. Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., & Kennes, C. (2017). Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International Journal of Microbiology*, 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/6943952>
72. Moon, S., Kim, J., Koo, J., & Bae, E. (2019). Structural and mutational analyses of psychrophilic and mesophilic adenylate kinases highlight the role of hydrophobic interactions in protein thermal stability. *Structural Dynamics*, 6(2), 024702. <https://doi.org/10.1063/1.5089707>
73. Mori, K., Fukui, K., Amatsu, R., Ishikawa, S., Verrone, V., Wipat, A., Meijer, W. J. J., & Yoshida, K. (2022). A novel method for transforming *Geobacillus kaustophilus* with a chromosomal segment of *Bacillus subtilis* transferred via pLS20-dependent conjugation. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01759-8>

74. Narumi, I., Sawakami, K., Nakamoto, S., Nakayama, N., Yanagisawa, T., Takahashi, N., & Kihara, H. (1992). A newly isolated *Bacillus stearothermophilus* K1041 and its transformation by electroporation. *Biotechnology Techniques*, 6(1), 83–86. <https://doi.org/10.1007/BF02438695>
75. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1(7), 841–845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>
76. Novickij, V., Rembiałkowska, N., Szlasa, W. & Kulbacka J. (2022). Does the shape of the electric pulse matter in electroporation? *Front. Oncol.* 12:958128. <https://doi:10.3389/fonc.2022.958128>
77. Novickij, V., Švedienė, J., Paškevičius, A., Markovskaja, S., Lastauskienė, E., Zinkevičienė, A., Girkontaitė, I., & Novickij, J. (2018). Induction of Different Sensitization Patterns of MRSA to Antibiotics Using Electroporation. *Molecules*, 23(7), 1799. <https://doi.org/10.3390/molecules23071799>
78. Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valencia, R., Rojas, C., & Seeger, M. (2018). Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2309. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309>
79. Peng, D., Luo, Y., Guo, S., Zeng, H., Ju, S., Yu, Z., & Sun, M. (2009). Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1849–1858. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04151.x>
80. Peng, H., Fu, B., Mao, Z., & Shao, W. (2006). Electrotransformation of *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200. *Biotechnology Letters*, 28(23), 1913–1917. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9184-6>
81. Pollo, S. M. J., Zhaxybayeva, O., & Nesbø, C. L. (2015). Insights into thermoadaptation and the evolution of mesophily from the bacterial phylum *Thermotogae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(9), 655–670. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0073>
82. Rahman, T. J., Marchant, R., & Banat, I. M. (2004). Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments. *Biochemical Society Transactions*, 32(2), 209–213. <https://doi.org/10.1042/bst0320209>
83. Rajkumari, J., Bhuyan, B., Das, N., & Pandey, P. (2019). Environmental applications of microbial extremophiles in the degradation of petroleum hydrocarbons in extreme environments. *Environmental Sustainability*, 2(3), 311–328. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00065-1>
84. Ranawat, P., & Rawat, S. (2017). Stress response physiology of thermophiles. *Archives of Microbiology*, 199(3), 391–414. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1331-4>
85. Rattanachaiakunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2009). Glass bead transformation method for gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 923–926. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400025>

86. Reeve, B., Martinez-Klimova, E., de Jonghe, J., Leak, D. J., & Ellis, T. (2016). The *Geobacillus* Plasmid Set: A Modular Toolkit for Thermophile Engineering. *ACS Synthetic Biology*, 5(12), 1342–1347. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00298>
87. Rehman, S., Jermy, B. R., Akhtar, S., Borgio, J. F., Abdul Azeez, S., Ravinayagam, V., Al Jindan, R., Alsalem, Z. H., Buhameid, A., & Gani, A. (2019). Isolation and characterization of a novel thermophile; *Bacillus haynesii*, applied for the green synthesis of ZnO nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 2072–2082. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1620254>
88. Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018). Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, 2(1), 011501. <https://doi.org/10.1063/1.4997367>
89. Riley, L. A., & Guss, A. M. (2021). Approaches to genetic tool development for rapid domestication of non-model microorganisms. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01872-z>
90. Samperio, S., Guzmán-Herrador, D. L., May-Cuz, R., Martín, M. C., Álvarez, M. A., & Llosa, M. (2021). Conjugative DNA Transfer from *E. coli* to Transformation-Resistant *Lactobacilli*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 606629. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.606629>
91. Sang, P., Liu, S.-Q., & Yang, L.-Q. (2020). New Insight into Mechanisms of Protein Adaptation to High Temperatures: A Comparative Molecular Dynamics Simulation Study of Thermophilic and Mesophilic Subtilisin-Like Serine Proteases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms21093128>
92. Scully, S., & Orlygsson, J. (2014). Recent Advances in Second Generation Ethanol Production by Thermophilic Bacteria. *Energies*, 8(1), 1–30. <https://doi.org/10.3390/en8010001>
93. Siliakus, M. F., van der Oost, J., & Kengen, S. W. M. (2017). Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles*, 21(4), 651–670. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0939-x>
94. Song, Y., Hahn, T., Thompson, I. P., Mason, T. J., Preston, G. M., Li, G., Paniwnyk, L., & Huang, W. E. (2007). Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria. *Nucleic Acids Research*, 35(19), e129–e129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm710>
95. Songstad, D. D., Somers, D. A., & Griesbach, R. J. (1995). Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 40(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/BF00041112>
96. Sveinsdottir, M., Sigurbjornsdottir, M. A., & Orlygsson, J. (2011). Ethanol and Hydrogen Production with Thermophilic Bacteria from Sugars and Complex Biomass. *Progress in Biomass and Bioenergy Production*, 359–381.
97. Szilágyi, A., & Závodszy, P. (2000). Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic, and extremely thermophilic protein subunits: Results of a comprehensive survey. *Structure*, 8(5), 493–504. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00133-7)
98. Tayyab, M. (2011). Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase. *J. BIOSCI. BIOENG.*, 111, 7.



99. Taylor, M. P., van Zyl, L., Tuffin, I. M., Leak, D. J., & Cowan, D. A. (2011). Genetic tool development underpins recent advances in thermophilic whole-cell biocatalysts: Recent advances in thermophilic genetic systems. *Microbial Biotechnology*, 4(4), 438–448. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00246.x>
100. Thompson, A. H., Studholme, D. J., Green, E. M., & Leak, D. J. (2008). Heterologous expression of pyruvate decarboxylase in *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Biotechnology Letters*, 30(8), 1359–1365. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9698-1>
101. Tyurin, M. V., Desai, S. G., & Lynd, L. R. (2004). Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 883–890. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.883-890.2004>
102. Tyurin, M. V., Sullivan, C. R., & Lynd, L. R. (2005). Role of Spontaneous Current Oscillations during High-Efficiency Electrotransformation of Thermophilic Anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8069–8076. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8069-8076.2005>
103. Tominaga, Y., Ohshiro, T., & Suzuki, H. (2016). Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* is a versatile approach for genetic transformation of thermophilic *Bacillus* and *Geobacillus* species. *Extremophiles*, 20(3), 375–381. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0819-9>
104. Tryfona, T., & Bustard, M. T. (2006). Enhancement of biomolecule transport by electroporation: A review of theory and practical application to transformation of *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(3), 413–423. <https://doi.org/10.1002/bit.20725>
105. Turgeon, N., Laflamme, C., Ho, J., & Duchaine, C. (2006). Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3), 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.005>
106. Urbiet, M. S., Donati, E. R., Chan, K.-G., Shahar, S., Sin, L. L., & Goh, K. M. (2015). Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 633–647. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.007>
107. Vavitsas, K., Glekas, P. D., & Hatzinikolaou, D. G. (2022). Synthetic Biology of Thermophiles: Taking Bioengineering to the Extremes? *Applied Microbiology*, 2(1), 165–174. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol2010011>
108. Vehmaanperä J. (1989). Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* by electroporation. *FEMS microbiology letters*, 52(1-2), 165–169. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(89\)90190-0](https://doi.org/10.1016/0378-1097(89)90190-0)
109. Vishwakarma, S. K., Arya, M., & Singh, S. (2020). Potential of thermophilic bacteria in bioremediation of heavy metals. *International journal of higher education and research*, 10(2), 173-189.
110. Wada, K., & Suzuki, H. (2020). Biotechnological platforms of the moderate thermophiles, *Geobacillus* species: Notable properties and genetic tools. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles* (p. 195–218). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00015-0>
111. Wan, H. W. (2013). *Transformation of the thermophilic bacterium, Geobacillus debilis, by conjugation with the mesophilic bacterium, Escherichia coli*. [Magistro baigiamasis darbas]. University of Manitoba.

112. Wang, C., Cui, Y., & Qu, X. (2020). Optimization of electrotransformation (ETF) conditions in lactic acid bacteria (LAB). *Journal of Microbiological Methods*, 174, 105944. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105944>
113. Wang, Q., Cen, Z., & Zhao, J. (2015). The Survival Mechanisms of Thermophiles at High Temperatures: An Angle of Omics. *Physiology*, 30(2), 97–106. <https://doi.org/10.1152/physiol.00066.2013>
114. Wiegel, J. (1980). Formation of ethanol by bacteria. A pledge for the use of extreme thermophilic anaerobic bacteria in industrial ethanol fermentation processes. *Experientia*, 36(12), 1434–1446. <https://doi.org/10.1007/BF01960144>
115. Wu, L., & Welker, N. E. (1989). Protoplast Transformation of *Bacillus stearothermophilus* NUB36 by Plasmid DNA. *Microbiology*, 135(5), 1315–1324. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-5-1315>
116. Zarzycki, P. K., Fenert, B., Kaleniecka, A., & Zarzycka, M. B. (2017). Hopanoids in Cyanobacteria Biomass and Related Samples. *Studies in Natural Products Chemistry* (T. 54, p. 87–107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63929-5.00003-6>
117. Zeigler, D. R. (2014). The *Geobacillus* paradox: Why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology*, 160(1), 1–11. <https://doi.org/10.1099/mic.0.071696-0>
118. Zeldes, B. M., Keller, M. W., Loder, A. J., Straub, C. T., Adams, M. W. W., & Kelly, R. M. (2015). Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01209>
119. Zhang, G., Bao, P., Zhang, Y., Deng, A., Chen, N., & Wen, T. (2011). Enhancing electrotransformation competency of recalcitrant *Bacillus amyloliquefaciens* by combining cell-wall weakening and cell-membrane fluidity disturbing. *Analytical Biochemistry*, 409(1), 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.10.013>
120. Zhang, H., Li, Y., Chen, X., Sheng, H., & An, L. (2011). Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter* with plasmid PART2. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.002>
121. Zhang, M., Nakai, H., & Imanaka, T. (1988). Useful Host-Vector Systems in *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(12), 3162–3164. <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.3162-3164.1988>
122. Zhang, Z., Ding, Z.-T., Shu, D., Luo, D., & Tan, H. (2015). Development of an Efficient Electroporation Method for Iturin A-Producing *Bacillus subtilis* ZK. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 7334–7351. <https://doi.org/10.3390/ijms16047334>

## PRIEDAI

**1 priedas.** Transformuojami termofilinių bakterijų kamienai (sudaryta remiantis Wada ir Suzuki, (2020)).

Kamienas	Transformacijos metodas	Plazmidė	Transformacijos efektyvumas	Nuoroda
<b>Termofilinės <i>Bacillus</i> spp.</b>				
<i>B. caldolyticus</i> DSM 405	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-5}$ – $10^{-4}$ b	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>B. caldotenax</i> DSM 406	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-5}$ – $10^{-4}$ b	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>B. caldovelox</i> DSM 411	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-7}$ – $10^{-3}$ b	(Tominaga ir kt., 2016)
<b><i>Geobacillus</i> spp.</b>				
<i>G. debilis</i>	Konjugacija	pNW33N-pxyl-bs2-mob	$8 \times 10^{-7}$ b	(Wan, 2013)
<i>G. kaustophilus</i> ATCC 8005	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-6}$ – $10^{-5}$ b	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>G. kaustophilus</i> CER 5420	Elektroporacija	pG1K	$6,6 \times 10^1$ a	(Reeve ir kt., 2016)
<i>G. kaustophilus</i> HTA 426	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-4}$ – $10^{-2}$ b	(Tominaga ir kt., 2016)
		pGK1	–	(Miyano ir kt., 2018)
<i>G. thermodenitrificans</i> K1041	Elektroporacija	pG1K	$2,0 \times 10^3$ a	(Reeve ir kt., 2016)
		pUB110	$5,8 \times 10^5$ a	(Narumi ir kt., 1992)
<i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465	Elektroporacija	pBC1	–	(Frenzel ir kt., 2018)
<i>G. thermoglucosidasius</i> DL33	Elektroporacija	pTMO31	$10^3$ – $10^4$ a	(Cripps ir kt. 2009)
<i>G. thermoglucosidasius</i> DL44	Elektroporacija	pUCG3.8	$5,2 \times 10^3$ a	(Reeve ir kt., 2016)
		pG1K	$5,3 \times 10^4$ a	(Reeve ir kt., 2016)
		pG2K	$1,1 \times 10^4$ a	(Reeve ir kt., 2016)
		pG1C	$3,9 \times 10^3$ a	(Reeve ir kt., 2016)

**2 priedo tęsinys.** Transformuojami termofilinių bakterijų kamienai (sudaryta remiantis Wada ir Suzuki, (2020)).

<i>G. thermoglucosidasius</i> DL44	Elektroporacija	pG1AK	$5,8 \times 10^3$ <sup>a</sup>	(Reeve ir kt., 2016)
<i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542	Elektroporacija	pG2K	$5,3 \times 10^3$ <sup>a</sup>	Šis darbas
		pNW-Ppta-GFPx-3TER	–	(Frenzel ir kt., 2018)
<i>G. thermoglucosidasius</i> NCIMB 11955	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-5} - 10^{-2}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-3} - 10^{-2}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>G. thermoglucosidasius</i> TN	Elektroporacija	pUB190, pTMO31	$10^3 - 10^4$ <sup>a</sup>	(Cripps ir kt. 2009)
	Elektroporacija	pBST22:ZYM	–	(Thompson ir kt., 2008)
<i>G. thermoleovorans</i> B23	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-6} - 10^{-4}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>G. thermoleovorans</i> DSM 14791	Elektroporacija	pG1K	$3,6 \times 10^3$ <sup>a</sup>	(Reeve ir kt., 2016)
<i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-2} - 10^{-1}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
	Elektroporacija	pG2K	$1,19 \times 10^1$ <sup>a</sup>	Šis darbas
<i>G. stearothermophilus</i> 10	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-6} - 10^{-5}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980 (CU21)	Protoplastų transformacija	pUB110, pTB19, pTB90, pTB92	$10^{3-7}$ <sup>a</sup>	(Imanaka ir kt., 1982)
	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-7}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>G. stearothermophilus</i> NRRL B-4419	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-6}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>G. stearothermophilus</i> SIC1 (SIL1)	Protoplastų transformacija	pTB913	$2,9 \times 10^{-2}$ <sup>b</sup>	(M. Zhang ir kt., 1988)
		pUB110	$7,7 \times 10^{-2}$ <sup>b</sup>	(M. Zhang ir kt., 1988)
		pTB53	$3,7 \times 10^{-3}$ <sup>b</sup>	(M. Zhang ir kt., 1988)
		pTB522	$1,4 \times 10^{-3}$ <sup>b</sup>	(M. Zhang ir kt., 1988)

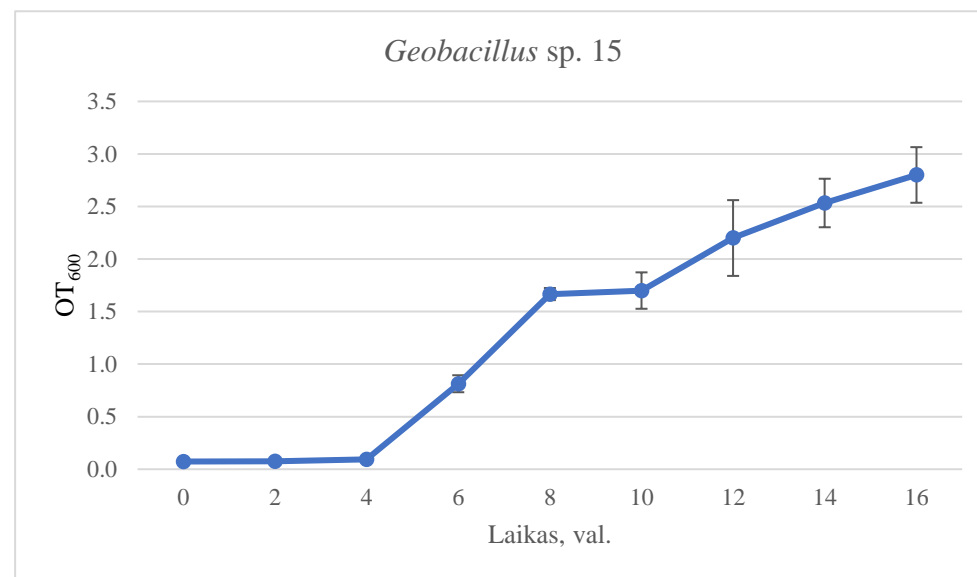
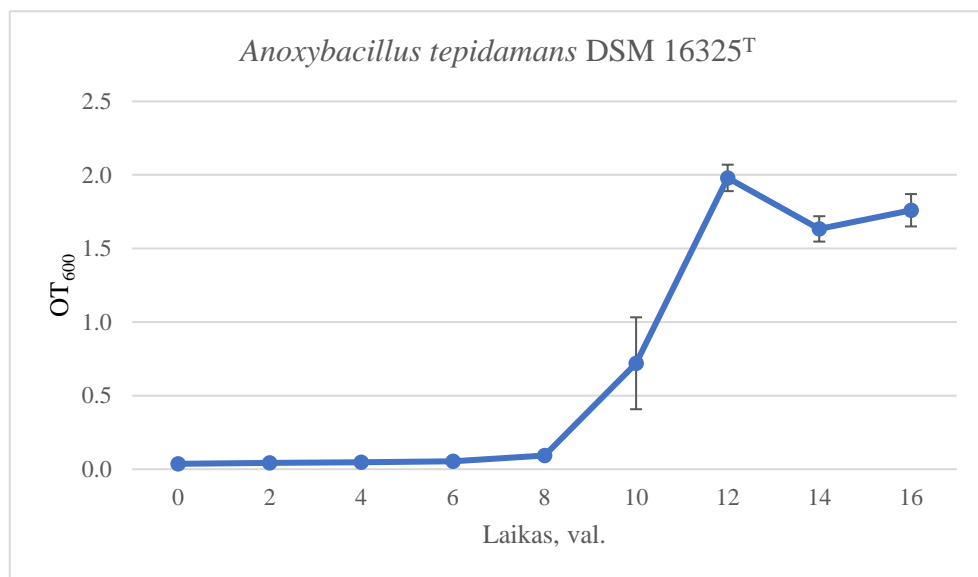
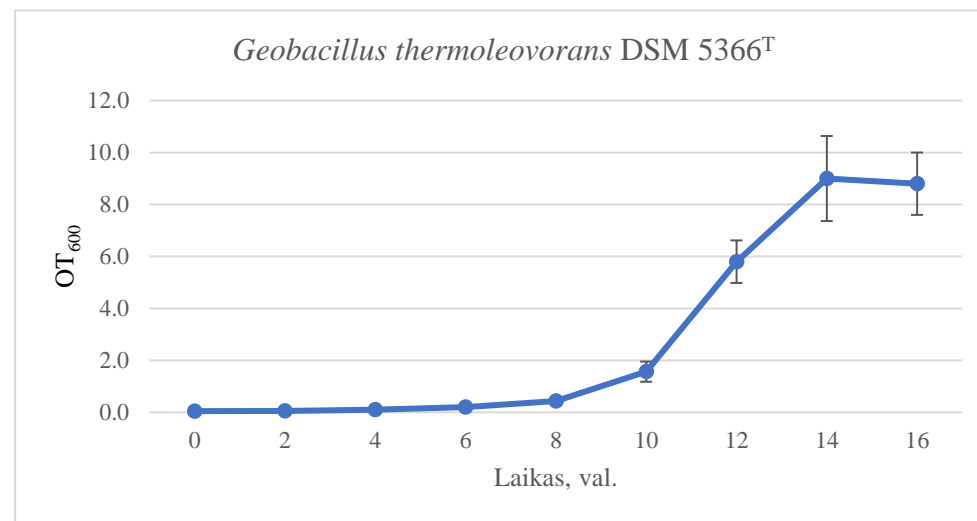
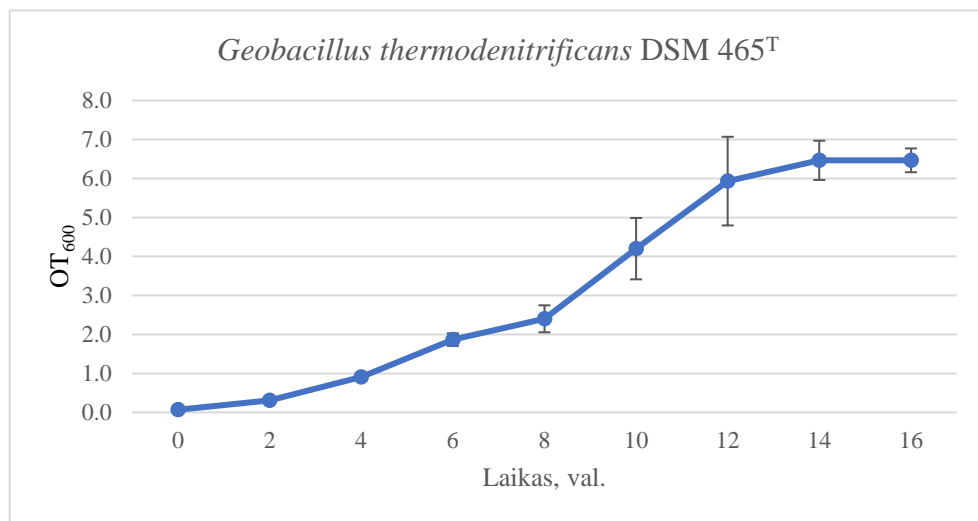
**3 priedo tęsinys.** Transformuojami termofilinių bakterijų kamieniai (sudaryta remiantis Wada ir Suzuki, (2020)).

<i>G. stearothermophilus</i> NUB3621 (NUB36)	Protoplastų transformacija	pLW05, pTHT15	$2 \times 10^7$ <sup>a</sup> $4 \times 10^8$ <sup>a</sup>	(Wu ir Welker, 1989)
	Elektroporacija	pUCG18	$\sim 10^3$ <sup>a</sup>	(Kananavičiūtė ir kt., 2015)
<i>G. stearothermophilus</i> XL-65-6	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-5}$ – $10^{-4}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>G. subterraneus</i> DSM 13552	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-5}$ – $10^{-4}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
<i>G. uzonensis</i> DSM 13551	Konjugacija	pUCG18T	$10^{-4}$ <sup>b</sup>	(Tominaga ir kt., 2016)
<b><i>Thermoanaerobacterium</i> sp.</b>				
<i>T. saccharolyticum</i> JW/SL-YS485	Elektroporacija	pIKM1	$10^{3-5}$ <sup>a</sup>	(Tyurin ir kt., 2005)
<b><i>Thermoanaerobacter</i> spp.</b>				
<i>T. ethanolicus</i> JW200	Elektroporacija	pTE16	$10^1$ <sup>a</sup>	(H. Peng ir kt., 2006)
		pTEA2	$10^1$ <sup>a</sup>	(H. Peng ir kt., 2006)
<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514	Elektroporacija	pHL015/pIKM2	$1 \times 10^2$ <sup>a</sup>	(Lin ir kt., 2010)
	Sonoporacija	pHL015/pIKM2	$6 \times 10^2$ <sup>a</sup>	(Lin ir kt., 2010)
<b><i>Clostridium</i> spp.</b>				
<i>C. thermocellum</i> DSM 1313	Elektroporacija	pIKM1	$2,2 \times 10^5$ <sup>a</sup>	(Tyurin ir kt., 2004)
<i>C. thermocellum</i> DSM 4150	Elektroporacija	pIKM1	$\sim 10^3$ <sup>a</sup>	(Tyurin ir kt., 2004)
<i>C. thermocellum</i> DSM 7072	Elektroporacija	pIKM1	$\sim 10^3$ <sup>a</sup>	(Tyurin ir kt., 2004)
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	Elektroporacija	pIKM1	$5,0 \times 10^4$ <sup>a</sup>	(Tyurin ir kt., 2004)
<b><i>Rhodothermus</i> sp.</b>				
<i>R. marinus</i>	Elektroporacija	pRM100	$10^6$ <sup>a</sup>	(Bjornsdottir ir kt., 2005)

a – KFV/μg plazmidinės DNR

b – transformantai/vienam recipientui.

**4 priedas.** Termofilinių bakterijų *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>, *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup>, *Anoxybacillus tepidamans* DSM 16325<sup>T</sup>, *Geobacillus* sp. 15, *Parageobacillus toebii* DSM 14590<sup>T</sup>, *Geobacillus thermocatenulatus* DSM 730<sup>T</sup>, *Geobacillus jurassicus* DSM 15726<sup>T</sup> augimo kreivės. Bakterijų kultūros augintos 2SPYNG terpėje.



**2 priedo tęsinys.** Termofilinių bakterijų *Geobacillus thermodenitrificans* DSM 465<sup>T</sup>, *Geobacillus thermoleovorans* DSM 5366<sup>T</sup>, *Anoxybacillus tepidamans* DSM 16325<sup>T</sup>, *Geobacillus* sp. 15, *Parageobacillus toebii* DSM 14590<sup>T</sup>, *Geobacillus thermocatenulatus* DSM 730<sup>T</sup>, *Geobacillus jurassicus* DSM 15726<sup>T</sup> augimo kreivės. Bakterijų kultūros augintos 2SPYNG terpėje.

