

Vilniaus universitetas
Gyvybės mokslų centras
Biomokslų institutas

Dominykas Bukelskis
Mikrobiologijos ir biotechnologijų studijų programa

**Bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos tyrimai Kruberio–Voronja
urvo mikroorganizmuose**

Magistrinis darbas

Darbo vadovė:
Dr. Nomedą Kuisienė

Vilnius, 2019

TURINYS

1. SANTRUMPOS.....	4
2. ĮVADAS	5
3. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
3.1. Kruberio–Voronja urvas	7
3.2. Mikroorganizmų įvairovė urvų aplinkoje	7
3.3. Bioaktyvios medžiagos	14
3.3.1. Poliketidiniai junginiai.....	14
3.3.1.1. I tipo poliketidų sintazės	18
3.3.1.2. II tipo poliketidų sintazės.....	19
3.3.2. Neribosominių peptidų sintetazės	20
4. METODAI IR MEDŽIAGOS.....	23
4.1. Medžiagos	23
4.2. Tyrime naudoti bakterijų kamienai	23
4.3. Tyrimui naudotų mikroorganizmų pasirinkimas	24
4.4. Mitybinės terpės.....	25
4.5. Bakterijų kultivavimas	25
4.6. Bakterijų genominės DNR skyrimas	25
4.7. Bakterijų suminės RNR skyrimas	25
4.8. PKS ir NRPS genų gausinimas PGR metodu	26
4.9. PGR produktų valymas	27
4.10. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje.....	26
4.11. DNR gryninimas iš agarozinio elektroforezės gelio	27
4.12. Plazmidinės DNR skyrimas	27
4.13. PGR produkto klonavimas	27
4.14. PGR produktų sekoskaita.....	28
4.15. DNR sekų kompiuterinė analizė	28
4.16. Atvirkštinė transkripcija.....	28
4.17. Kiekybinis realaus laiko PGR.....	28
5. REZULTATAI.....	29
5.1. Kokybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė	29

5.1.1. <i>Pseudarthrobacter</i> sp. kamieno kokybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė	32
5.1.2. <i>Streptomyces</i> sp. kokybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė	33
5.1.3. <i>Pseudomonas</i> sp. kokybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė	35
5.2. Kiekybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė	36
6. REZULTATŲ APTARIMAS	41
7. IŠVADOS	45
8. TYRIMO REZULTATŲ SKLAIDA.....	46
9. SANTRAUKA	47
10. SUMMARY	48
11. LITERATŪROS SĄRAŠAS	49

1. SANTRUMPOS

ACP – acilo grupę pernešantis baltymas

CoA – kofermentas A

DGGE – denatūruojanti gradientinė elektroforezė

EDTA – Etilendiamintetraacto rūgštis

FISH – fluorescensinė *in situ* hibridizacija

kDNR – kopijinė DNR

KS – ketosintazė

NRPS – neribosominių peptidų sintetazė

PKS – poliketidų sintazė

RFLP – restrikcijos ilgių polimorfizmas

OD600 – optinis tankis matuojant 600nm ilgio šviesos banga

PGR – polimerazės grandininė reakcija

16S rDNR – mažojo ribosomos subvieneto RNR koduojanti DNR

2. ĮVADAS

Bioaktyvios medžiagos yra itin plačiai kasdieniniame gyvenime naudojami junginiai. Savo pritaikymą jie randa maisto pramonėje, medicinoje, veterinarijoje, žemės ūkyje. Dažniausiai šis panaudojimas susijęs su ligų gydymu arba biosauga, todėl spartus atsparumo mechanizmų atsiradimas ir plitimas visame pasaulyje, bei mažėjantis komercinių bioaktyvių medžiagų preparatų išleidimas į rinką kelia ypač didelį susirūpinimą – šias problemas įveikti yra didelis iššūkis (Blair et al., 2015).

Siekiant spręsti šią problemą vykdoma daug mokslinių tyrimų pasitelkiant skirtingas strategijas: alternatyvių gydymo būdų paiešką, greitų ir efektyvių detekcijos metodų, skirtų aptikti atsparius mikroorganizmus, tobulinimą, sintetinių bioaktyvių medžiagų kūrimą ar modifikavimą bei visiškai naujų medžiagų paiešką. To pavyzdys – katijoniniai antibakteriniai peptidai, kurie pasižymi plačiu veikimo spektru ir greitu poveikiu ląstelių membranoms. Nors bandymai sukurti tokius peptidus sintetiniu būdu buvo sėkmingi, tačiau tik keletas jų buvo pritaikyti naudojimui medicinoje ar žemės ūkyje (Sánchez-Gómez et al., 2015; Song et al., 2017). Dėl šios priežasties naujų bioaktyvių medžiagų paieška gamtinėse mikroorganizmų buveinėse yra labai aktuali ir svarbi. Didelį potencialą tokiai paieškai rodo išskirtinai ekstremaliomis aplinkos sąlygomis pasižyminčios mikroorganizmų ekologinės nišos, kuriose dėl oligotrofinių augimo sąlygų bakterijų populiacijos yra priverstos pasitelkti konkurencijos mechanizmus – bioaktyvių medžiagų sintezę. Gilių požeminių urvų aplinkoje dėl itin oligotrofinių augimo sąlygų bakterijų populiacijos, siekdamos užsitikrinti galimybę įsisavinti itin limituotus organinių medžiagų šaltinius, yra priverstos naudoti tarprūšinės konkurencijos mechanizmus – antibakterinių medžiagų sintezę bei atsparumą tokioms medžiagoms (Hibbing et al., 2010; Enes Dapkevicius, 2013). Žinoma, bioaktyvių medžiagų produkcija gali būti ne tik konkurenciniu, bet ir ląstelių komunikacijos mechanizmu. Medžiagos, kurias klasifikuojame kaip antibiotikus, būdamos mažos molekulinės masės junginiais, gali tarnauti ir kaip signalinės molekulės, kurios mažomis koncentracijomis prarasdamos savo biocidinį poveikį, gali ženkliai pakeisti aplinkinių mikroorganizmų metabolizmą bei genų raišką. Tokie junginiai dažniausiai identifikuojami ne taikant fenotipinius metodus, bet naudojant sekoskaitos duomenis pagal sekų panašumą (Gupta, 2015).

Viena iš strategijų, naudojamų ieškant naujų, gamtoje egzistuojančių bioaktyvių medžiagų, yra klasikiniai mikrobiologiniai metodai – fenotipinė analizė, kuri pasitelkiama konkrečiau aktyvumo medžiagų sintezės detekcijai. Tačiau, daugėjant kokybiškų sekoskaitos

rezultatų duomenų bazėse, vis dažniau prieinama išvados, jog bioaktyvias medžiagas sintetinantys organizmai genome koduoja nemažą kiekį tokių medžiagų sintezės genų grupių, kurios nėra transkribuojamos auginant kultūras laboratorinėmis sąlygomis (Traxler et al., 2013).

Nors tokiuose tyrimuose molekuliniai metodai yra akivaizdžiai pranašesni, urvų mikroorganizmų analizėje jie vis dar naujovė. Iš didelės gausos fenotipinės analizės metu izoliuotų bioaktyvių medžiagų producentų, pačių produkuojamų junginių identifikuota vos keletas. Dažniausiai lieka neištirta, kiek tokių medžiagų produkuoja konkretus kamienas bei jų cheminė prigimtis (Hodges et al., 2012; Tomczyk-Żak et al., 2016). Siekiant išsiaiškinti, kokie veiksniai daro didžiausią įtaką bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškai urvų mikroorganizmuose, suformuluotas šio **darbo tikslas**:

Ivertinti Kruberio–Voronja urvo mikroorganizmų koduojamų bioaktyvių medžiagų sintezės genų raišką naudojant molekulinis metodus.

Tiksliui įgyvendinti suformuluoti šie **darbo uždaviniai**:

1. Atlikti kokybinę bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizę Kruberio–Voronja urvo bakteriniuose kamienuose:

1.1. Kokybiškai išanalizuoti bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos priklausomybę nuo augimo fazės ir maistinių medžiagų kiekio *Pseudarthrobacter* sp. kamienne.

1.2. Kokybiškai išanalizuoti bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos priklausomybę nuo augimo fazės ir maistinių medžiagų kiekio *Streptomyces* sp. kamienne.

1.3. Kokybiškai išanalizuoti bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos tendencijas nuo augimo fazės ir maistinių medžiagų kiekio *Pseudomonas* sp. kamienne.

2. Atlikti kiekybinę bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizę Kruberio–Voronja urvo bakteriniuose kamienuose:

2.1. Kiekybiškai išanalizuoti bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos priklausomybę nuo augimo fazės ir maistinių medžiagų kiekio *Streptomyces* sp. kamienne.

1.3. Kiekybiškai išanalizuoti bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos tendencijas nuo augimo fazės ir maistinių medžiagų kiekio *Pseudomonas* sp. kamienne.

3. LITERATŪROS APŽVALGA

3.1. Kruberio–Voronja urvas

Urvai (graik. *spelaiou*) – tai požeminės ertmės, į kurias gali patekti žmogus. Dažniausiai pasitaikantys urvai formuojasi kalkakmenyje arba panašiose kalkingose uolienose, rečiau – gipse, granite, kvarce, lede ar kitokiuose žemės sluoksniuose. Urvų aplinka laikoma ekstremalia gyvybei dėl šviesos trūkumo – be augalų vykdomos autotrofinės pirminių organinių junginių sintezės mikroorganizmams prieinami anglies ištekliai yra labai riboti (Barton et al., 2010).

Kruberio–Voronja urvas yra Arabikos kalnų masyve, Gagros kalnagūbryje (43.4184 N 40.3083 E, Vakarų Kaukazas). Tai vienas giliausių iki šiol pasaulyje atrastų urvų. Jo gylis siekia 2191 (± 9) metrus. Nepaisant didelio susidomėjimo tokia išskirtine urvo aplinka, pastaroji nėra detalai ištyrinėta dėl sudėtingos geografinės padėties. Patekti į šią urvų sistemą galima tik specialiai organizuotoms ekspedicijoms šiltuoju metų laiku. Ir pati ertmės aplinka labai sunkina urvo tyrinėjimą bei mėginių rinkimą (Klimchouk et al., 2009; Sendra and Reboleira, 2012). 2012 metais vykusioje ekspedicijoje užfiksuota oro drėgmė kito nuo 69–76 % viršutinėje urvo dalyje (220–230 metrų gylis) iki >90 % vidurinėje (500–700 metrų gylis) bei apatinėje (1215–1640 metrų gylis) dalyse. Temperatūra svyravo nuo 3–4 °C viršutinėje bei vidurinėje, iki 6–8 °C apatinėje dalyse (Klusaite et al., 2016).

3.2. Mikroorganizmų įvairovė urvų aplinkoje

Kaip ir kitose ekstremalios aplinkos buveinėse, urvų mikroorganizmai gerai prisitaikę prie tai aplinkai būdingų sąlygų, šiuo atveju – itin oligotrofinių augimo sąlygų giliose požeminėse aplinkose. Nepaisant menkų maistinių medžiagų išteklių, vidutinis mikroorganizmų gausumas urvuose yra 10^6 ląstelių viename grame uolienos.

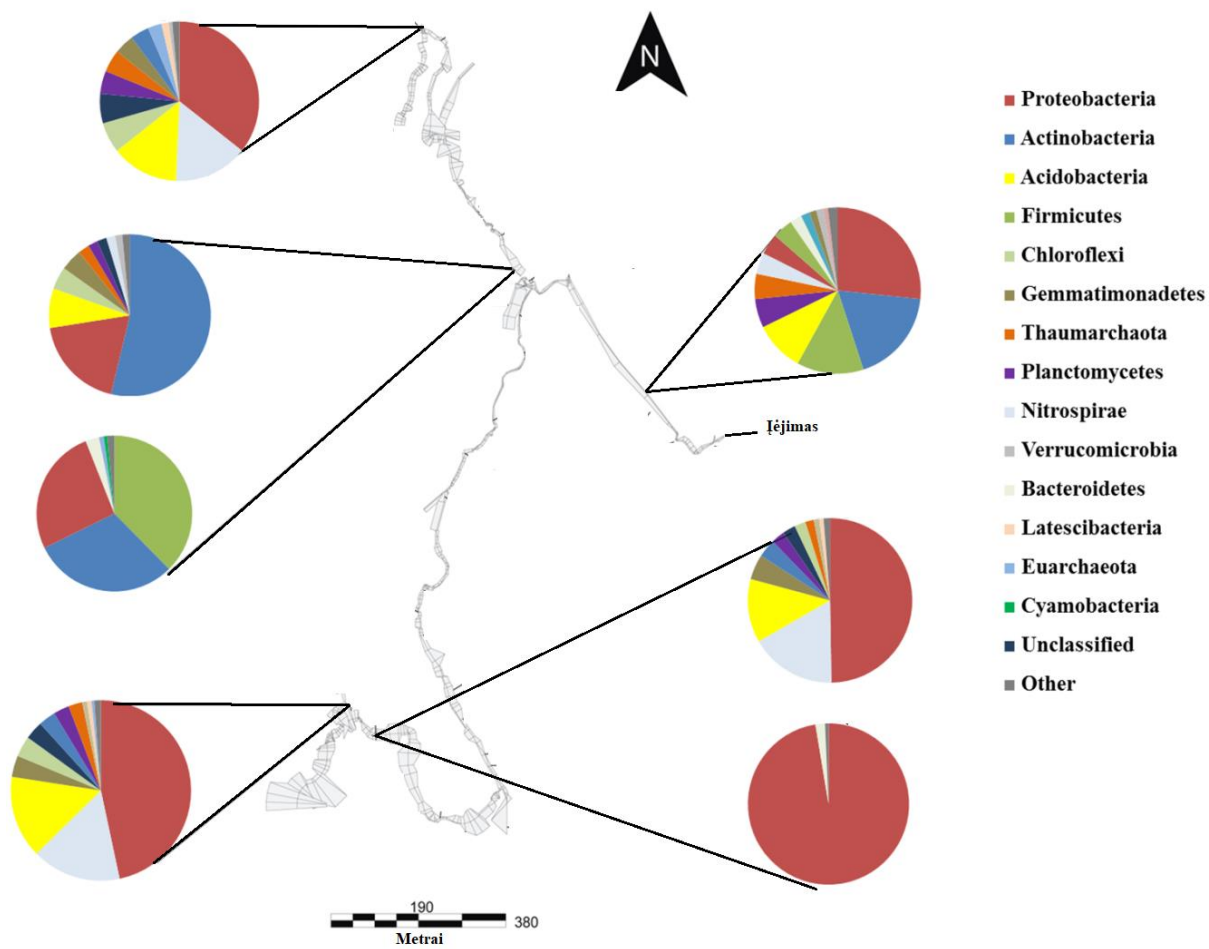
Įvairūs tyrimai atskleidė didelę įvairovę urvų mikroorganizmų populiacijose. Urvų mikroorganizmų įvairovė skirtinguose pasaulio urvuose gausiai tirta taikant metagenominius ir kitokius molekulinis tyrimus (1 lentelė).

1 lentelė. Publikacijų, naudousių molekulinis metodus tirti skirtingų tipų urvų aplinkose randamus mikroorganizmus, apibendrinimas.

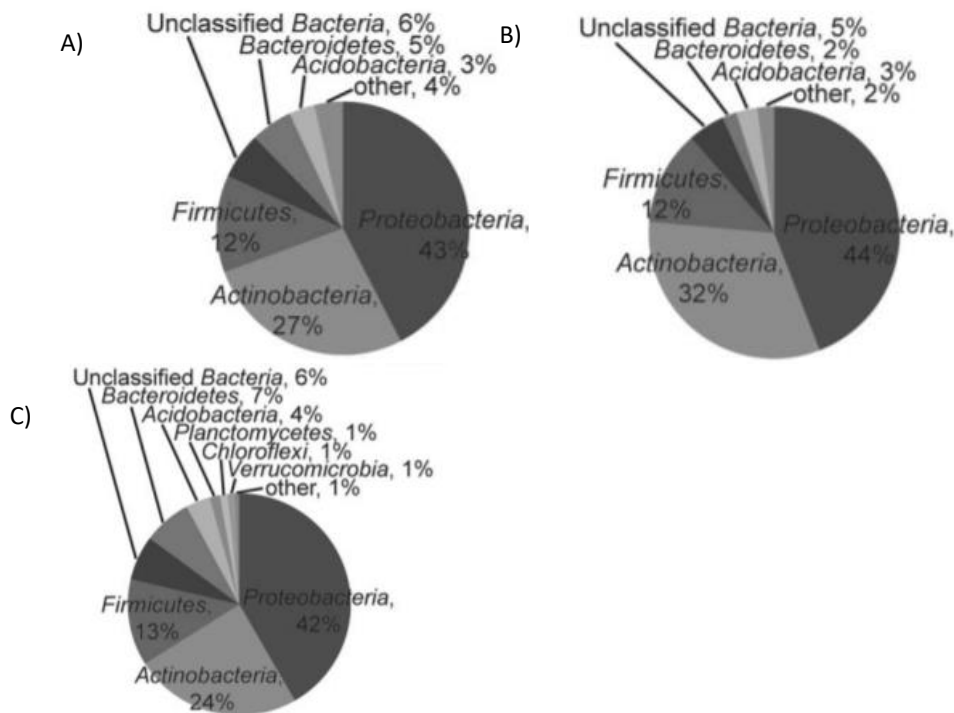
Bioplėvelės bei urvai gausūs sieros junginiais	Geležies ar mangano nuosėdos ant urvų sienų bei vandens telkiniai urvuose	Su žmogaus veikla susiję urvai (urvų piešiniai, turistų lankomi urvai ir pan.)
16S rDNR sekoskaita Vlasceanu et al., 1997	16S rDNR sekoskaita Northup et al., 1998	16S rDNR sekoskaita Laiz et al., 1999
16S rDNR sekoskaita Angert et al. 1998	Sieros izotopų tyrimai Northup et al., 2000	16S rDNR sekoskaita, DGGE analizė Schabereiter-Gurtner et al., 2002a
Stabilių izotopų analizė Humphreys, 1999	16S rDNR sekoskaita, RFLP analizė Holmes et al., 2001	16S rDNR sekoskaita, DGGE analizė Schabereiter-Gurtner et al., 2002b
16S rDNR sekoskaita, RFLP analizė, DNR stabilų izotopų zondų analizė, Vlascean et al., 2000	16S rDNR sekoskaita Northup et al., 2003	Ekspresuojamų 16S RNR tyrimai Gonzalez et al., 2006
16S rDNR sekoskaita, RFLP analizė Hose et al., 2000	16S rDNR sekoskaita, ląstelės riebalų rūgščių metilo esterių analizė Sanchez-Moral et al., 2003	16S rDNR sekoskaita Ikner et al., 2007
16S rDNR sekoskaita Engel et al., 2001	16S rDNR sekoskaita Angert et al., 2004	16S rDNR sekoskaita, RFLP analizė Zhou et al., 2007
16S rDNR sekoskaita Canganella et al., 2002	16S rDNR sekoskaita Spilde et al., 2005	16S rDNR sekoskaita, DGGE analizė Pronk et al., 2009
16S rDNR sekoskaita, FISH Engel et al., 2003	16S rDNR sekoskaita, RFLP analizė Barton et al., 2006	
16S rDNR sekoskaita, Anglies izotopų santykio analizė Engel et al., 2004	16S rDNR sekoskaita, RFLP analizė Barton et al., 2007	
16S rDNR sekoskaita, DNR stabilų izotopų zondų analizė, Hutchens et al., 2004	16S rDNR sekoskaita Snider et al., 2009	
16S rDNR sekoskaita, RFLP analizė Barton et al., 2005	16S rDNR sekoskaita Shabarova et al., 2013	
16S rDNR sekoskaita, FISH Macalady et al., 2006		
16S rDNR sekoskaita, FISH Macalady et al., 2007		
16S ir 23S rDNR sekoskaita, FISH Meisinger et al., 2007		
16S rDNR sekoskaita, funkcinių genų analizė Spear et al., 2007		

16S rDNR sekoskaita, anglies ir azoto izotopų santykio analizė Engel et al., 2007		
16S rDNR sekoskaita Porter et al., 2008		
16S rDNR sekoskaita, junginių įsisavinimo tyrimas naudojant radioaktyviai žymėtus substratus Porter et al., 2009		
16S rDNR sekoskaita, RFLP, tikslinių genų analizė naudojant PGR Chen et al., 2009		
16S rDNR sekoskaita, pirosekvenavimas, 16S rDNR genų kopijų skaičiaus įvertinimas kiekybine PGR Sahl et al., 2010		

Pasitelkiant 16S rDNR sekoskaitą pradėta suprasti ne tik bakterijų populiacijų sudėtis ir įvairovė, bet ir pastebėta naujų sekų, santykinai mažai panašių į jau žinomas (80–92 % panašumas). Skirtinguose pasaulio urvuose, rasta nuo keliolikos iki keliasdešimt skirtingų bakterijų tipų. Nors bakterinė įvairovė urvų aplinkoje yra didelė, keletas bakterijų tipų linke dominuoti (1 ir 2 pav.)



1 paveikslas. Mikroorganizmų įvairovė skirtingose Su Bentu urvo vietose. Adaptuota pagal (Leuko et al., 2017).



2 paveikslas. Mikroorganizmų įvairovė Kruberio–Voronja urve pagal mėginio paėmimo vietos lankomumo dažnį: A – Bendra bakterijų populiacijų sudėtis, B – Retai lankomų urvo vietų bakterijų populiacijų sudėtis, C – Dažnai lankomų urvo vietų bakterijų populiacijų sudėtis (Kieraitė-Aleksandrova et al., 2015).

Vieni gausiausiai požeminėje aplinkoje randamų prokariotų yra *Proteobacteria* tipo atstovai, dažnai sudarantys didesnę dalį visų randamų mikroorganizmų (Schabereiter-Gurtner et al., 2002; Rusznyák et al., 2012). Be to, *Proteobacteria* tipas dominuoja ir bakterijų formuojamose bioplėvelėse ant uolienuų bei vandens pratekėjimuose. Požeminiuose vandens telkiniuose, turinčiuose didelius kiekius ištirpusio deguonies ir mažai mikroorganizmams prieinamos sieros dominuoja γ -*Proteobacteria*. Šaltiniuose, tekančiuose iš uolienuų, dažniausiai yra mažai ištirpusio deguonies, bet didelė sieros koncentracija – tokioje aplinkoje daugiausiai randama ϵ -*Proteobacteria* klasės atstovų (Leuko et al., 2017).

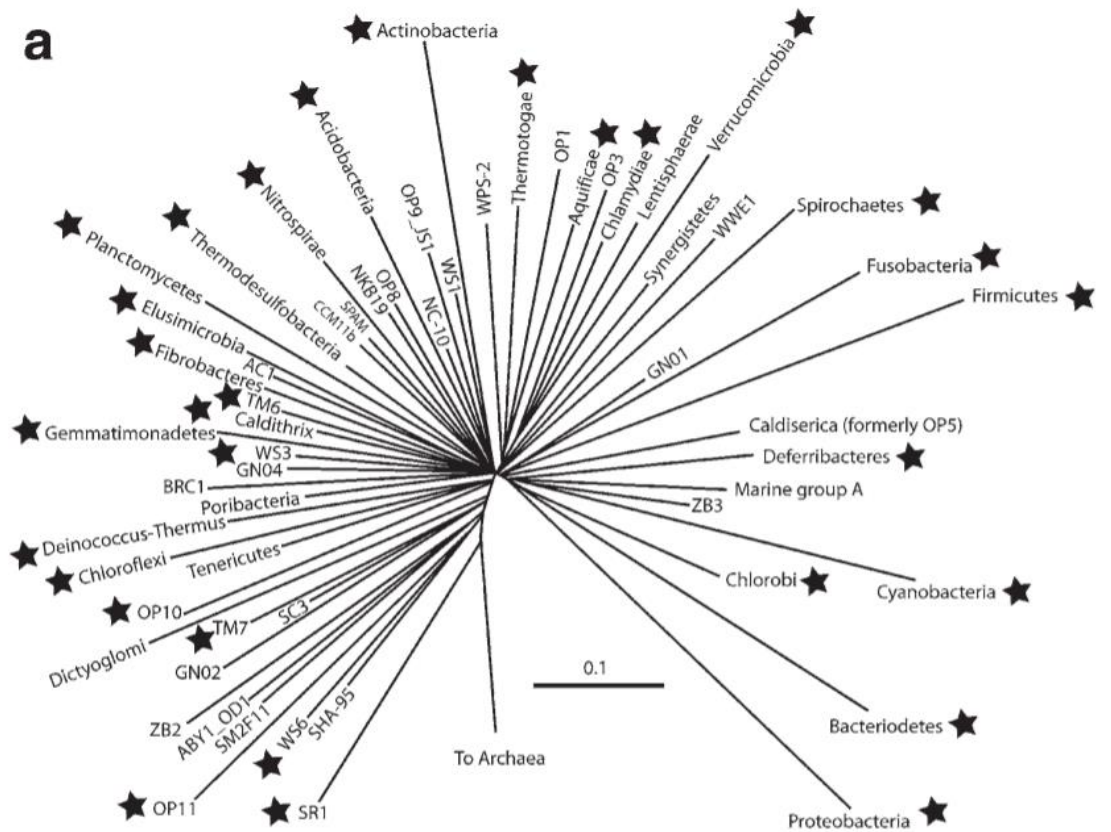
Kitas urvuose dažnai randamas bakterijų tipas yra *Actinobacteria*. Tai gausiausias *Bacteria* domeno tipas, kuris pasižymi itin didele morfologine ir fiziologine įvairove taksono viduje bei dideliu DNR G+C sąsastu. *Actinobacteria* atstovai dažnai randami dirvožemyje, o urvuose kolonizuoja jų sienas bei įvairius kristalų darinius, tokius kaip stalaktitai ir stalagmitai, taigi manoma, jog šios bakterijos prisideda prie biomineralizacijos procesų urvų ekosistemose. Šie mikroorganizmai yra žinomi antibakterinių medžiagų producentai, todėl

tyrėjus domina dėl didelio genomuose koduojamų bioaktyvių medžiagų kiekio (Barton et al., 2007; Lawson, 2018).

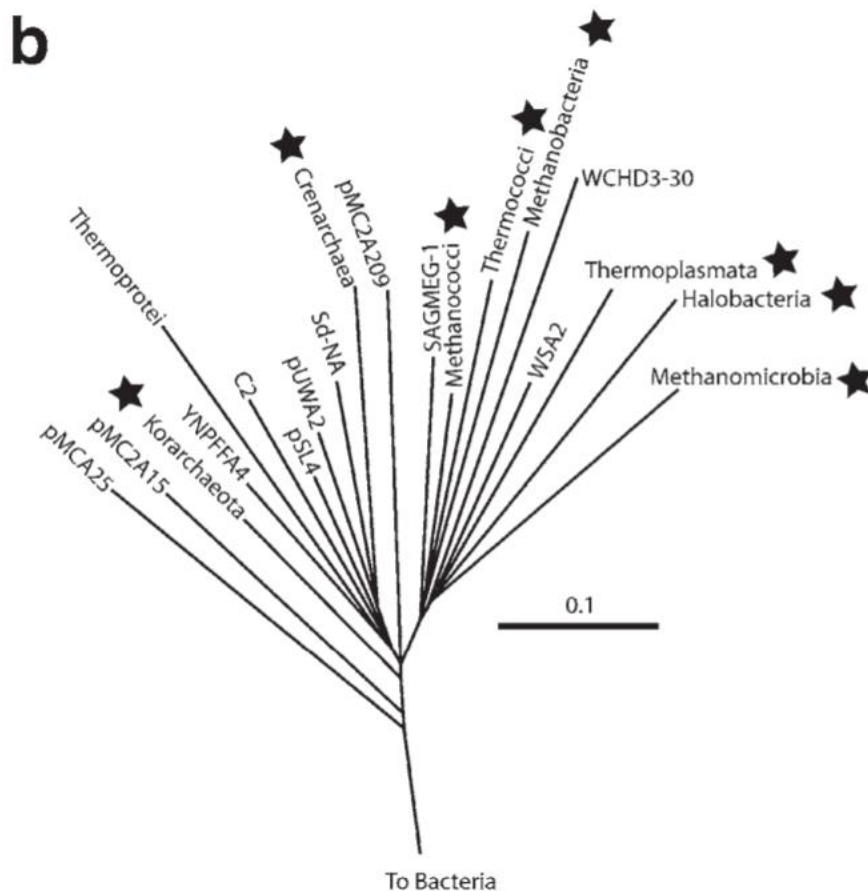
Firmicutes tipo atstovai dažniau randami gausiose maistinėmis medžiagomis ekosistemose ir pasižymi heterotrofiniu arba chemolitoautotrofiniu augimu. Kai kurios šiam tipui priskiriamos bakterijos kaip, pavyzdžiui, *Desulfotomaculum spp.* ir *Sulfobacillus acidophilus*, geba redukuoti arba oksiduoti sierą, kurios šaltinių galima gausiai rasti urvų sistemose. *Firmicutes* taip pat pasižymi gebėjimu įsisavinti platų organinių medžiagų spektrą, bei geriau išveria vandens bei maistinių medžiagų stygių lyginant su *Proteobacteria* tipui priklausančiais mikroorganizmais, o tai leidžia šiai taksonominei grupei konkuruoti ir įsitvirtinti urvų aplinkoje (Macalady et al., 2006; Tomczyk-Żak et al., 2016).

Pagal metagenominių tyrimų, atliktų 2015 metais Kruberio–Voronja urve duomenis, gausiausios filogenetinės bakterijų grupės čia buvo *Proteobacteria* (43 %), *Actinobacteria* (27 %) ir *Firmicutes* (12 %). Kiti bakterijų tipai (*Bacteroidetes*, *Acidobacteria* ir kt.) aptinkami žymiai rečiau, t. y. < 6 % visų analizuotų 16S rDNR sekų. Nors, priklausomai nuo mėginių surinkimo gylio bei urvo vietos lankymo dažnumo, filogenetinė mikroorganizmų bendrijų dalis kito, minėtieji trys tipai – *Actinobacteria*, *Proteobacteria* bei *Firmicutes* – išliko gausiausiomis grupėmis visuose mėginiuose. Apie 6 % bakterijų liko neidentifikuota (Kieraite–Aleksandrova et al., 2015).

Nors skirtingose urvo vietose nemažą procentą mikroorganizmų populiacijos gali sudaryti vieno ar dviejų taksonų bakterijos, bendra populiacijos įvairovė yra ganėtinai didelė. Tai puikiai atspindi 2010 metais atliktas tyrimas, kurio metu buvo analizuoti metagenominiai duomenys iš skirtingų pasaulio urvų (3 ir 4 pav.). Skirtinguose urvuose identifikuota iki 60 skirtingų bakterijų taksonų sekų bei 20 skirtingų archėjų taksonų sekų.



3 paveikslas. Bakterijų taksonai identifikuoti urvų aplinkoje. Schematinė topologija paremta filogenetiniiais medžiais, sukurtais naudojant NAST sekų lyginimo algoritmą bei 16S rRNR genų sekas iš „Greengenes“ duomenų bazės <http://greengenes.lbl.gov>. Linijų ilgiai medžiuose atspindi skirtumus tarp 16S rDNR sekų skirtingų urvų mėginiuose. Adaptuota pagal (Engel et al., 2009).



4 paveikslas. Archėjų taksonai identifikuoti urvų aplinkoje. Schematinė topologija paremta filogenetiniais medžiais, sukurtais naudojant NAST sekų lyginimo algoritmą bei 16S rRNR genų sekas iš „Greengenes“ duomenų bazės <http://greengenes.lbl.gov>. Linijų ilgiai medžiuose atspindi skirtumus tarp 16S rDNR sekų skirtingų urvų mėginiuose. Adaptuota pagal (Engel et al., 2009).

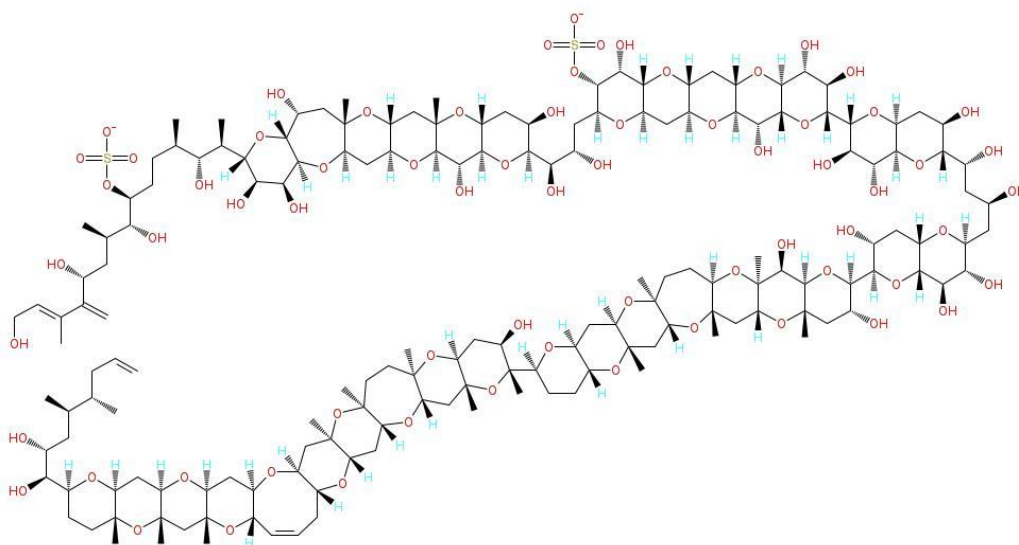
3.3. Bioaktyvios medžiagos

3.3.1. Poliketidiniai junginiai

Poliketidai yra natūralių antrinių metabolitų klasė pasižyminti milžiniška struktūrine bei funkcinė įvairove. Šie junginiai jau seniai domina žmoniją dėl didelio kiekio mediciniškai svarbių savybių: antimikrobinių, priešvėžinių, priešgrybelinių, antihelminčių, imunosupresinių poveikių (Staunton and Weissman, 2001). Poliketidinių junginių svarbos įrodymu galėtų būti tai, jog 2005–2007 metais JAV daugiau nei trečdalis natūralių junginių arba jų produktų, leistų naudoti kaip vaistiniai preparatai, buvo poliketidai. Poliketidais

parentų vaistinių preparatų metiniai pardavimai siekia 20 milijardų dolerių (Weissman, 2009; Gomes et al., 2013).

Poliketidų dydis gali varijuoti nuo šešis ar aštuonis anglies atomus įjungiančių molekulių (pvz., 6-metilsalicilo rūgštis) iki 164 anglies atomus turinčio 3422 Daltonų maitotoksino, kurio struktūroje yra net 32 žiedai bei 98 stereocentrai (5 pav.) (Nicolaou and Aversa, 2011).

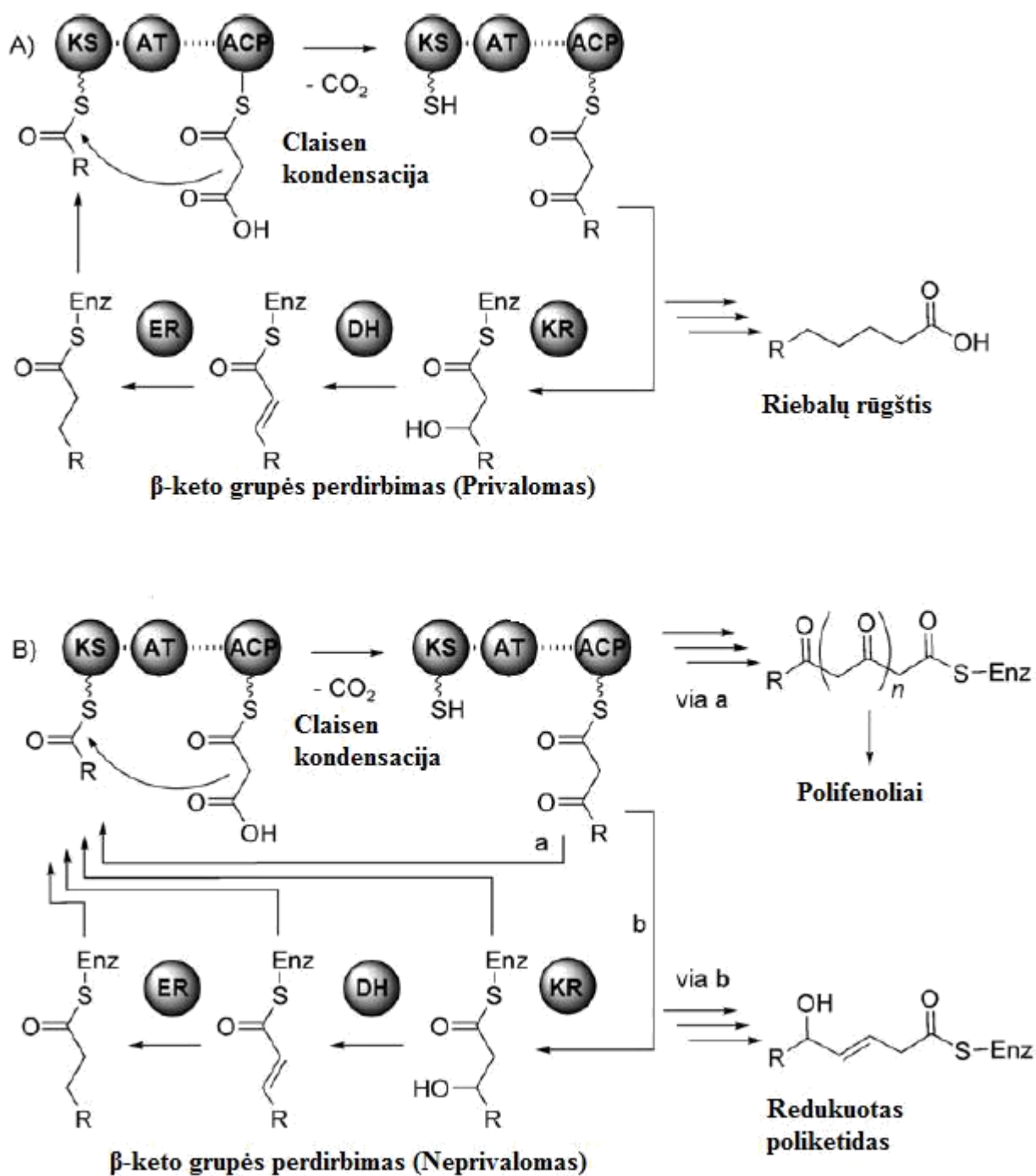


5 paveikslas. Maitotoksino struktūra. (remiantis <https://webapps.molecular-networks.com/biopath3/biopath/mols/complexity=8292.4376>).

Dauguma poliketidų pasižymi nelanksčia struktūra. Jie yra daugiacykliniai aromatiniai junginiai, sintetinami lankstant bei ciklizuojant tiesines poliketidų grandines. Vieni poliketidai gali būti smarkiai redukuotos, per galus ciklizuotos grandinės, kiti savo struktūra primena polinesočiąsias riebalų rūgštis. Panašumas su riebalų rūgštimis atsiranda dėl sutampančių pirmųjų sintezės žingsnių (6 pav.). Daugelis poliketidų po surinkimo yra modifikuojami – oksiduojama pagrindinė anglies grandinė susidarant hidroksi arba karbonilo grupėms, metilinama ties deguonies, azoto arba anglies centrais, prijungiami deoksi-cukrų žiedai, acetilinama arba glikozilinama (Staunton and Weissman, 2001; Weissman, 2009).

Poliketidų sintezė daugeliu aspektų panaši į riebalų rūgščių biosintezę. Kofermentas A (CoA) arba malonil-CoA dekarboksilinamas Claisen kondensacijos reakcijos metu ir tarnauja kaip inkaras toliau ilgėjančiai grandinei. Šiame procese dažniausiai dalyvauja β -ketoacilsintazė, aciltransferazė ir acilo grupę pernešantis baltymas (ACP). Po kiekvieno

grandinės prailginimo β -keto rūgšties grupė apdorojama ketoreduktazės, dehidratazės bei enoil reduktazės domenų (6 pav.). Šių junginių sintezė skiriasi keliais aspektais: sintetamos įvairių skirtingų ilgių poliketidų grandinės, poliketidų sintazės naudoja didesnę spektrą pirmtakų: CoA, malonil-CoA, acetyl-CoA, metilmalonil-CoA, ir t. t., ir bene svarbiausia yra tai, kad poliketidų sintezėje, po kiekvieno grandinės prailginimo, redukcijos žingsnis gali būti nevykdomas, o tai lemia daug didesnę junginių įvairovę bei funkcionalumą (Haydock et al., 1995; Hertweck, 2009; Robbins et al., 2016).

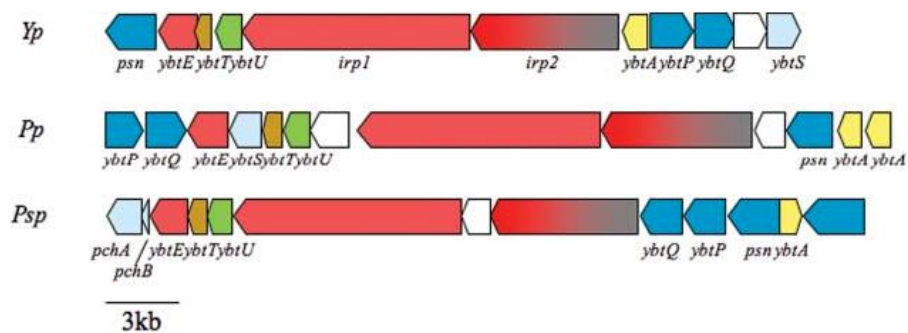


6 paveikslas. Pagrindiniai mechanizmai naudojami riebalų rūgščių (A) ir poliketidų (B) biosintezėje. KS – β -ketoacilsintazė, AT – aciltransferazė, ACP – acilo grupę pernešantis baltymas, ER – enoil reduktazė, DH – dehidratazė, KR – ketoreduktazė. Pirmosios sintezės stadijos ir naudojami fermentai yra identiški. Adaptuota pagal (Hertweck et al., 2009).

Poliketidų sintazės yra klasifikuojamos į tris plačias grupes. I ir II grupės išskiriamos pagal skirtingas strategijas taikomas cikliniame poliketidinės grandinės ilginime. III poliketidų sintazių grupė išsiskiria augaluose vykdoma chalkonų sinteze. Be to, I bei II grupės naudoja acilo grupę pernešančius baltymus substrato įjungimui į augančią poliketido

grandinę. III tipo fermentai šio baltymo aktyvumo neturi ir tiesiogiai sąveikauja su substratu. Žinoma, šis skirstymas nėra itin tikslus dėl nemenko skaičiaus poliketidų sintazių veikiančių kaip hibridinės, kelių grupių požymių turinčios, fermentų sistemos (Shen, 2003; Weissman, 2009). Kartais išskiriama ketvirtoji grupė – neribosominių peptidų sintezės ir poliketidų sintazių hibridai, tačiau tokiu atveju sintezėje dalyvauja atskiri baltymai, koduojami viename operone, o ne daugiafunkcinis baltymas (Beyer et al., 1999).

Genai reikalingi poliketidų sintezei iš pirminių metabolitų randami vienoje, 15–120 kb dydžio, genų kasetėje, kartu su auto-atsparumo genais bei reguliaciniais genais, kurie koordinuoja visų struktūrinių genų raišką. Poliketidų sintezės genų operone taip pat gali būti randama ir transportavimui skirtų baltymų sekų, bei už neribosominių peptidų sintezę atsakingų genų, jei šie baltymai dalyvauja bendro produkto sintezėje (7 pav.) (Donadio et al., 2007; Gomes et al., 2013).

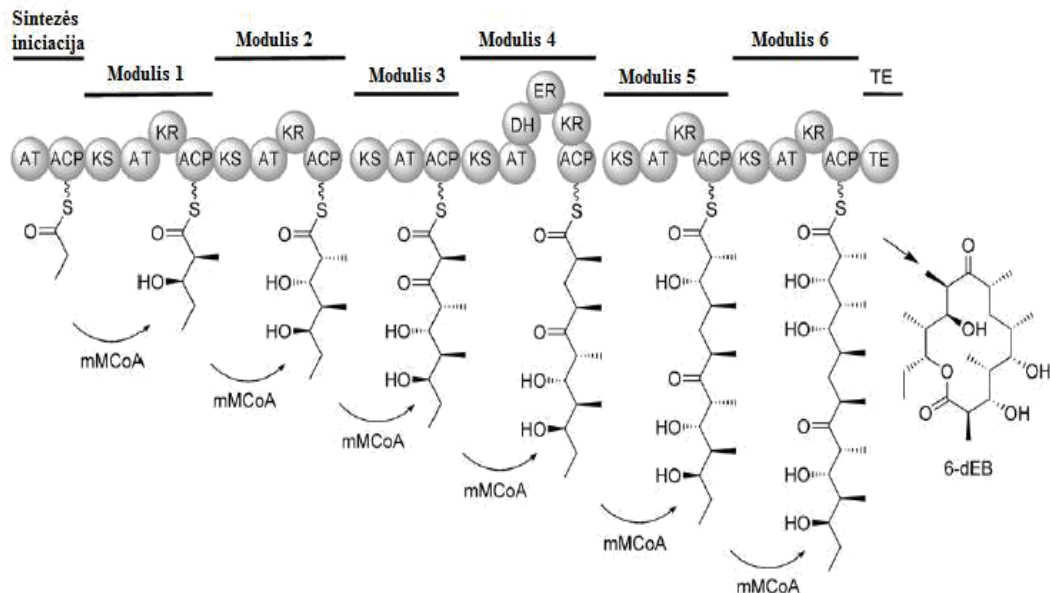


7 paveikslas. Už jersinabaktino sintezę atsakingų genų klasteriai. Yp – *Yersinia pestis*, Pp – *Photobacterium profundum*, Psp – *Pseudomonas syringae*. Spalvų žymėjimas: raudona – neribosominių peptidų sintezės genai; pilka – poliketidų sintezės genai; mėlyna – transporto baltymai; ruda ir žalia – modifikacijos baltymai; balta – nežinomos funkcijos genai (Donadio et al., 2007).

3.3.1.1. I tipo poliketidų sintazės

I tipo poliketidų sintazės yra daugiafunkciniai baltymai organizuoti į modulius, kurių kiekvieno sudėtyje yra pilnas komplektas domenų, reikalingų vienam poliketido grandinės elongacijos etapui. Modulių skaičius sistemoje koreliuoja su elongacijų skaičiumi sintezės metu. Vieno modulio pagrindą sudaro aciltransferazės, ACP baltymo ir β -ketoacil sintazės domenai. Tarp aciltransferazės ir ACP domeno gali būti įsiterpę papildomi, prieš elongacijos žingsnį β -keto grupę modifikuojantys, domenai. Šių multifunkcinių fermentų sintetinamų

junginių pavyzdžiai būtų makrolidai (pvz., eritromicinas) ir polienai (pvz., nistatinas). Geriausiai išnagrinėta 6-deoksieritronolido-B sintazė, kuri randama išskirtinai prokariotuose (8 pav.) (Cheng et al., 2009; Weissman, 2009; Gomes et al., 2013).

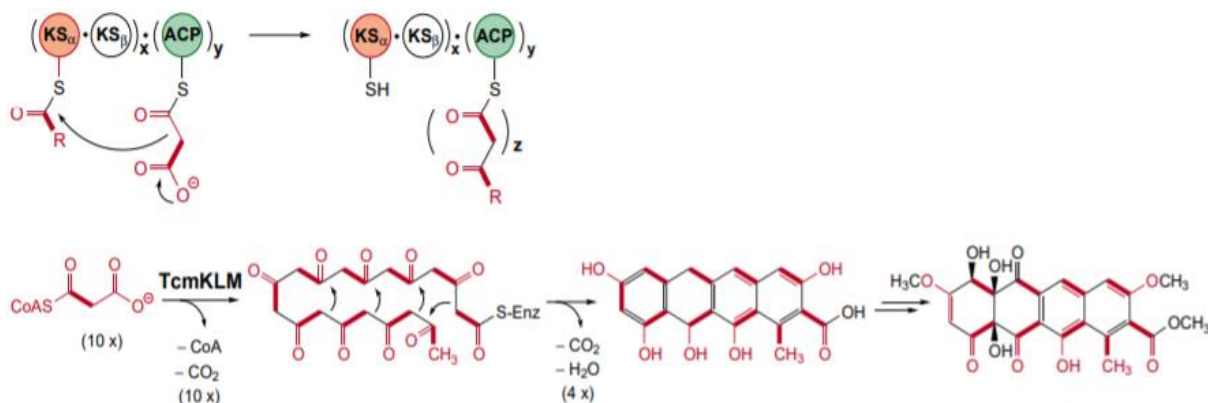


8 paveikslas. 6-deoksieritronolido-B sintazė. KS – β -ketoacilsintazė, AT – aciltransferazė, ACP – acilo grupę pernešantis baltymas, ER – enoil reduktazė, DH – dehidratazė, KR – ketoreduktazė, TE – sintezę terminuojantis baltymas, mMCoA – metilmalonil-kofermentas A. Adaptuota pagal (Hertweck et al., 2009).

3.3.1.2. II tipo poliketidų sintazės

II tipo poliketidų sintezėje dalyvauja diskretūs monofunkciniai baltymai, kurių kiekvienas transkribuojamas nuo atskiro geno. Šie baltymai pakartotinai įjungiami ilginant bei modifikuojant poliketido grandinę kol gaunamas galutinis produktas (Hertweck et al., 2007). Sintezės iniciaciją ir elongaciją atlieka vadinamoji „minimali poliketidų sintazė“ („minimali PKS“), sudaryta iš dviejų ketosintazės (KS α ir KS β) domenų, kurie katalizuoja kondensaciją tarp aciltioesterio ir augančios anglies grandinės, bei ACP baltymo, kuris tarnauja kaip inkaras, laikantis sintetinamą poliketido grandinę elongacijos ir po jos sekančių modifikacijų metu (9 pav.). Šiuos domenų koduojantys genai yra labai konservatyvūs, ir beveik visais atvejais panašiai organizuoti chromosomoje (Metsä-Ketelä et al., 1999). Papildomi subvienetai – ketoreduktazės, ciklazės, aromatazės – veikia kartu su „minimalia PKS“ lankstant augančią grandinę. Be to, poliketidai dažnai modifikuojami oksigenazių, glikoziltransferazių, N-, O- ir C- metiltransferazių (Weissman, 2009). II tipo poliketidų

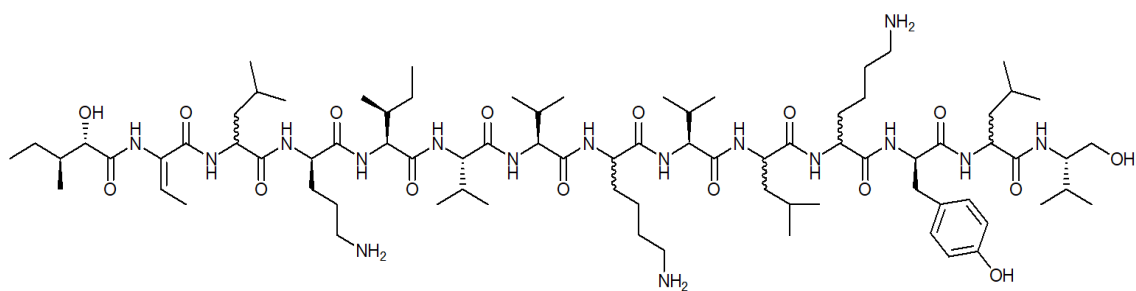
sintazių produkuojami junginiai skirstomi į antraciklinus, anguciklinus, tetraciklinus, tetracenomicinus, paradimicino tipo fenolius (Shen, 2003).



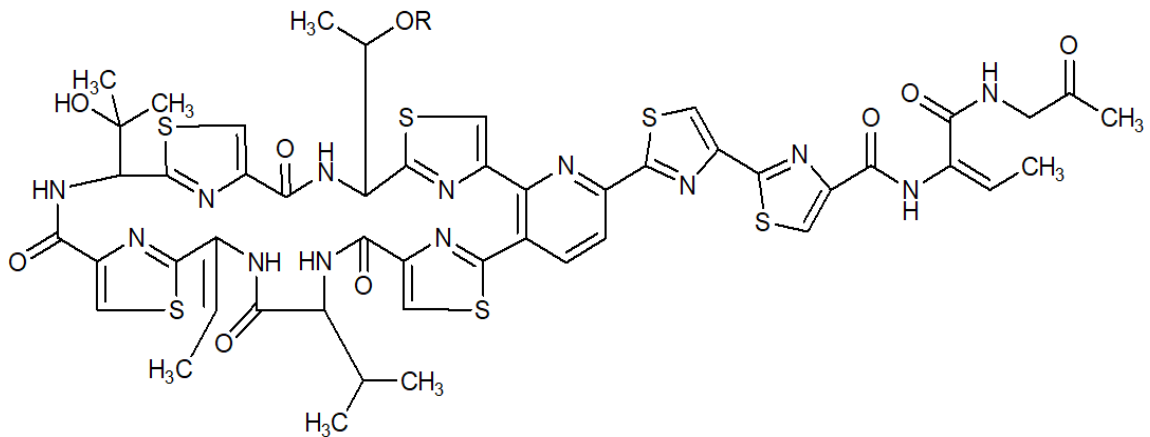
9 paveikslas. II tipo poliketidų sintazių vykdoma tetracenomicino C sintezės schema. KS – ketosintazė, ACP – acilo grupę pernešantis baltymas, CoA – kofermentas A. Adaptuota pagal (Shen, 2003).

3.3.2. Neribosominių peptidų sintetazės

Daugiau nei pusė medicinoje naudojamų produktų yra neribosominiai peptidai arba neribosominių peptidų – poliketidų hibridams priskiriamos bioaktyvios molekulės išskirtos iš bakterijų bei grybų. Nors dažniau žinomi kaip antibiotikai, yra parodyta, kad šie junginiai turi ir priešvėžinį potencialą. Neribosominiai peptidai randami įvairių skirtingų struktūrų – nuo linijskų, kaip bogorolis A išskirtas iš *Bacillus laterosporus* (10 pav.) iki ciklinių peptidų turinčių tokias struktūras kaip tiozolo žiedas (11 pav.) (Agrawal et al., 2017).

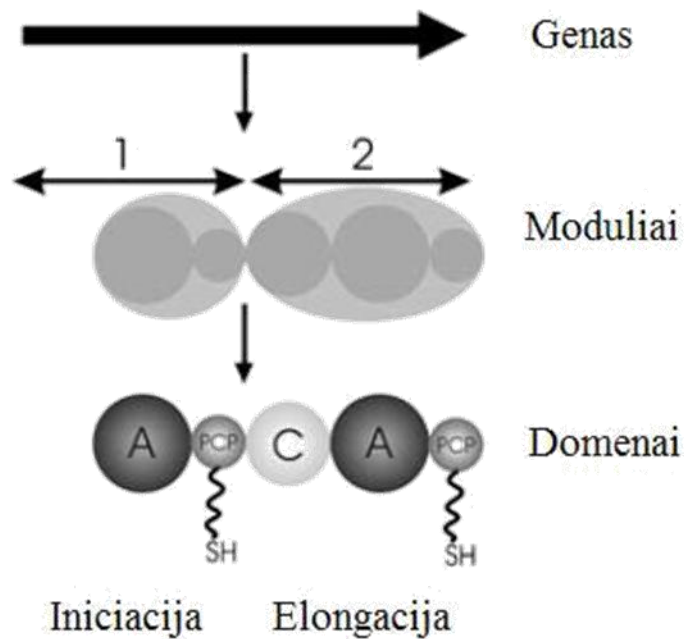


10 paveikslas. Bogorolio A struktūra. Adaptuota pagal (Agrawal et al., 2017)



11 paveikslas. Ciklinio tiopeptido YM-266183, išskirto iš *Bacillus cereus*, struktūra
Adaptuota pagal (Agrawal et al., 2017).

Neribosominių peptidų sintezės yra dideli daugiamoduliniai biokatalizatoriai vykdančys eilę regio- bei stereospecifinių reakcijų sintetinant trumpus, bet struktūriškai ir funkciškai įvairius peptidus (Strieker et al., 2010). Minimalus grandinės elongacijos modulis susideda iš trijų domenų: kondensacijos, adenilinančio bei peptidą pernešančio baltymo domeno (PCP). Aminorūgštys pirmiausia yra aktyvuojamos adenilinant. Šis procesas naudoja ATP ir sukuria itin reaktyvų aminoaciladenilatą. Šis reaguoja su merkaptu grupe esančia PCP domene suformuodamas tioesterį. Tai leidžia kondensacijos domeniui katalizuoti peptidinės jungties sudarymą (12 pav.). Inicijacijos modulyje dažniausiai trūksta kondensacijos domeno, o terminacijos modulyje šis būna pakeistas tioesteraze arba reduktaze, atskiriančia pilnai susintetintą peptidą.



12 paveikslas. Neribosominės peptidų sintetazės schema. A – adeniliantis domenas, C – kondensuojantis domenas, PCP – peptidą pernešančio baltymo domenas. Nuo geno transkribuojami domenai gali būti identifikuojami baltymų lygmenyje. Moduliai susideda iš atskirų domenų, atliekančių substrato aktyvacijos (A), sintetinės grandinės perkėlimo į kitą modulį (PCP) bei peptidinės jungties sudarymo (C) funkcijas. C domeno neturintys moduliai atlieka sintezės iniciaciją, o turintys C domeną – elongacijos etapus (Finking and Marahiel, 2004).

4. METODAI IR MEDŽIAGOS

4.1. Medžiagos

MERCK, Vokietija	Triptono sojos mitybinė terpė, agar – agaras, agarozė, MgCl ₂ , peptonas iš kazeino, mėsos ekstraktas, etanolis.
Applichem, Vokietija	Mielių ekstraktas, maltozės dekstrinas, kazeinas
ROTH, Vokietija	Etidžio bromidas
SIGMA – ALDRICH, Vokietija	CaCl ₂
Thermo Fisher Scientific, JAV	6 x DNA Loading Dye, 50xTAE elektroforezės buferis, 2 mM dNTP Mix, 25 mM MgCl ₂ , MassRuler DNA Ladder Mix, GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Taq DNA rekombinantinė polimerazė, <i>GeneJET Genomic DNA Purification Kit</i> , <i>GeneJET RNA Purification Kit</i> , <i>CloneJET PCR Cloning Kit</i> , <i>Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit</i> .
Zymo research, JAV	<i>ZR Plasmid Miniprep-Classic Kit</i>

4.2. Tyrime naudoti bakterijų kamienai

Tyrimui pasirinkti keturi bakterijų kamienai išskirti iš Kruberio–Voronja urvo mėginių, kurių genomuose anksčiau atliktuose tyrimuose buvo identifikuoti bioaktyvių medžiagų sintezės genai:

Planomicrobium sp. (16S rRNR geno numeris Genų banke yra MK422467)

Streptomyces sp. (16S rRNR geno numeris Genų banke yra MK422462)

Pseudomonas sp. (16S rRNR geno numeris Genų banke yra MK422468)

Pseudarthrobacter sp. (16S rDNR seka nedeponuota Genų banke)

Šie kamienai naudojant MEGA 6 programinį paketą priskirti atitinkamoms gentims pagal 16S rRNR geno sekų suliginimą su NCBI duomenų bazėje esančiomis sekomis.

Naudotas *Escherichia coli* kamienas:

DH5 α : F-, ϕ 80dlacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrAB, thi-1, hsdR17(rK-, mK+), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF) U169, phoA

4.3. Tyrimui naudotų mikroorganizmų pasirinkimas

Tyrimui pasirinkti keturi bakterijų kamienai, išskirti iš Kruberio–Voronja urvo mėginių (2 lentelė). Tiriant *Streptomyces* sp. bei *Pseudarthrobacter* sp. ankstesniuose tyrimuose nustatyta, jog šie kamienai nepasižymėjo antibakteriniu aktyvumu. *Pseudomonas* sp. ir *Planomicrobium* sp. kamienai pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu prieš laboratorinius kamienus. Visų šių mikroorganizmų genomuose buvo aptikta bioaktyvių medžiagų sintezės genų naudojant degeneratyvius pradmenis pateiktus 3 lentelėje:

Streptomyces sp. – du skirtingi poliketidų sintazių genai, I tipo – KS α -F/R ir II tipo – ARO-
PKS-F/R bei neribosominių peptidų sintetazės genas identifikuoti pradmenimis A3F/A7R;

Pseudarthrobacter sp. – vienas neribosominių peptidų sintezių genas identifikuotas
pradmenimis A3F/A7R;

Pseudomonas sp. – du neribosominių peptidų sintezių genai identifikuoti pradmenimis
A3F/A7R ir TGD/LGG;

Planomicrobium sp. – vienas, I tipo poliketidų sintazę koduojantis genas identifikuotas
pradmenimis KS α -F/R.

2 lentelė. Tirtų kamienų taksonominė padėtis

Gentis	Šeima	Eilė	Klasė
<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Microccoaceae</i>	<i>Microccocales</i>	<i>Actinobacteria</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyceae</i>		
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonadales</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>
<i>Planomicrobium</i>	<i>Planococcaceae</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacilli</i>

4.4. Mitybinės terpės

Rekombinantinėmis plazmidėmis transformuotos *Escherichia coli* ląstelės kultivuotos Luria–Bertani (LB) terpėje, kuri buvo paruošta pagal standartines metodikas (Sambrook and Russell, 2001).

Tiriamieji kamienai auginti ant terpių:

1. *Streptomyces* sp. bei *Pseudomonas* sp. auginti terpėje HT (Hickey-Tresner) (Atlas, 2010), kaip turtingoje maistinėmis medžiagomis: 10 % maltozės dekstrino, 2 % kazeino, 1 % mielių ekstrakto, 1 % mėsos ekstrakto, 0,00002 % CaCl₂;
2. *Pseudarthrobacter* sp. auginta terpėje TS (Tryptic-soya) (MERCK, Vokietija), kaip turtingoje maistinėmis medžiagomis: 15 % triptono, 5 % sojų peptono, 5 % NaCl;
3. Pusiau praskiestos HT ir TS mitybinės terpės naudotos kaip skurdžios maistinėmis medžiagomis;
4. Ląsteles auginant agarizuotoje terpėje į terpės sudėtį buvo pridėdama 1,5 % agar-agarą;

4.5. Bakterijų kultivavimas

Tiriamosios kultūros kultivuotos 250 ml Erlenmejerio kolbose, 100 ml skystos mitybinės terpės, 30 °C temperatūroje, užsėjant 1 % inokulianto (OT600 1,2).

4.6. Bakterijų genomines DNR skyrimas

Bakterijų genomine DNR skirta naudojant „GeneJET Genomic DNA Purification Kit“ rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

4.7. Bakterijų sumines RNR skyrimas

Bakterijų suminę RNR išskirta naudojant „GeneJET RNA Purification Kit“ rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

Kiekvieno kamieno suminės RNR skyrimas atliktas bakterijas auginant turtingose ir skurdžiose maistinėmis medžiagomis terpėse iš ląstelių, esančių eksponentinio augimo fazėje, perėjime iš eksponentinio augimo į stacionarų bei stacionaraus augimo fazėje.

4.8. PKS ir NRPS genų gausinimas PGR metodu

PGR vykdyta „Eppendorf“ termocikleryje.

KS α F/KS α R pradmenų poros taikiniai – ketosintazės α domenas II tipo poliketidų sintazių „minimalioje PKS“. Pradmenys sukonstruoti pagal išskirtinai *Streptomyces* gentyje randamas PKS sekas. Naudojant šiuos pradmenis, tikėtasi gauti apie 600 bazių porų dydžio fragmentą (3 lent.) (Ayuso-Sacido et.al., 2005; Hodges et al., 2012).

Naudojant ARO-PKS-F/ARO-PKS-R pradmenų porą taikytasi į poliketidų sintazės geno regioną, kuriame ketosintazės α ir β domenų genų sekos persidengia trimis nukleotidais. Tikėtasi gauti 492-630 bazių porų dydžio fragmentą (3 lent.) (Wood et al., 2007).

Neribosominių peptidų sintetazių identifikacijai naudoti pradmenys TGD/LGG, kurių taikiny yra ATP prisirišantį domeną koduojančios sekos, esančios apie 500 bazių porų ilgio (Turgay et al., 1994). Taip pat pradmenys A3F/A7R, kuriais taikytasi į neribosominių peptidų sintetazių adenilinančių ir tiolio grupę prijungiančius domenus. Tikslinės amplifikuotos sekos turėtų būti apie 700 bazių porų ilgio (3 lent.) (Ayuso-Sacido et al., 2005).

PGR vykdyta 25 μ l reakcijos tūryje. Reakcijos mišinio sudėtis buvo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM kiekvieno dNTP, 0,5 μ M tiesioginio pradmens, 0,5 μ M atvirkštinio pradmens, 2,5 U Taq DNA Polymerase .

PGR vykdyta denatūracijos temperatūrai esant 95 °C, o ilginimo temperatūrai 72 °C. Pradmenų prilydymo temperatūra pradmenims KS α -F/R buvo 56 °C, ARO-PKS-F/R – 64 °C A3F/A7R – 59 °C ir TGD/LGG – 60 °C.

3 lentelė. Bioaktyvių medžiagų sintezės genams identifikuoti naudoti pradmenys.

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'→3'
KS α -F/R	TSG CST GCT TGG AYG CSA TC
	TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT
ARO-PKS-F/R	GGC AGC GGI TTC GGC GGI TTC CAG
	CGI TGT TIA CIG CGT AGA ACC AGG CG
A3F/A7R	GCS TAC SYS ATS TAC ACS TCS GG
	SAS GTC VCC SGT SCG GTA S

TGD/LGG	TAC CGI ACI GGI GAT CTI GTI CG
	ATI GAG TCI CCI CCI GGG IAA AAG AA

4.9. PGR produktų valymas

PGR produktų valymui naudotas „*GeneJET PCR Purification Kit*“ rinkinys, pagal gamintojo rekomendacijas.

4.10. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje

DNR elektroforezė vykdyta 1 % agarozės geliuose, TAE (Tris – acetatas – EDTA) buferinėje sistemoje. Elektroforezė vykdyta esant 10 V/cm įtampai. Pasibaigus DNR frakcionavimui elektriniame lauke, geliai buvo analizuojami gelių registravimo ir analizės sistema (*Bio-Imaging System Mini Bis Pro*) UV šviesoje.

4.12. DNR gryninimas iš agarozinio elektroforezės gelio

DNR gryninta iš 1 % agarozės gelio naudojant „*GeneJET Gel Extraction Kit*“ rinkinį, pagal gamintojo rekomendacijas.

4.13. Plazmidinės DNR skyrimas

Rekombinantinės plazmidės iš *E. coli* skirtos naudojant „*ZR Plasmid Miniprep-Classical Kit*“ (rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas).

4.14. PGR produkto klonavimas

PGR produktas klonuotas į pJET1.2/blunt klonavimo vektorių, naudojant „*CloneJET PCR Cloning Kit*“ pagal gamintojo rekomendacijas.

4.15. PGR produktų sekoskaita

PGR produktų sekoskaita vykdyta grandinės terminacijos (Sangerio) metodu. PGR produktai nuskaityti Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, DNR sekoskaitos centre naudojant

4.16. DNR sekų kompiuterinė analizė

DNR sekoskaitos rezultatai apdoroti DNASTAR Lasergene 14.1 programiniu paketu. Sekos lygintos su esančiomis NCBI duomenų bazėje naudojant BLAST programą.

4.17. Atvirkštinė transkripcija

Atvirkštinė transkripcija vykdyta naudojant „*Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit*“ rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

4.18. Kiekybinė PGR

Streptomyces sp. – du skirtingi poliketidų sintazių genai (sekų numeriai Genų banke - MK461204 ir MK461207), pagal kurių sekas sukonstruoti pradmenys D_18_PKS-1F/R ir D_18_PKS-2F/R (4 lentelė).

Pseudomonas sp. – neribosominių peptidų sintetazės genas (sekos numeris Genų banke - MK532974), pagal kurio seką sukonstruoti pradmenys Ju_16_NRPS_2F/R (4 lentelė).

Pradmenys A_16_NRPS_1F/R, A_16_NRPS_2F/R, I_13_NRPS_1F/R ir L_3_NRPS_3F/R (4 lentelė) sukonstruoti pagal bioaktyvių medžiagų sintezės genų sekas, identifikuotas kituose *Pseudomonas* sp. kamieniuose, išskirtuose iš Krubera – Voronja urvo mėginių (sekų numeriai Genų banke - MK532973, MK532981, MK532969, MK532965).

Pradmenys L_5_PKS_1F/R sukonstruoti pagal bioaktyvių medžiagų sintezės genų sekas, identifikuotas kitame *Streptomyces* sp. kamienne identifikuotą bioaktyvių medžiagų sintezės genų seką (sekos numeris Genų banke - MK461205) (4 lentelė).

Pradmenys, sukonstruotiems naudojant kitų mikroorganizmų sekas buvo pasirinkti pagal tirtų kamienų genomų *in silico* analizę – šių pradmenų taikiniai buvo rasti tirtų kamienų genuose, bet skirtinguose genuose nei D_18_PKS-1F/R, D_18_PKS-2F/R ir Ju_16_NRPS_2F/R taikiniai.

4 lentelė. Kiekybinėje PGR naudoti pradmenys (Kuisienė, nepublikuoti duomenys).

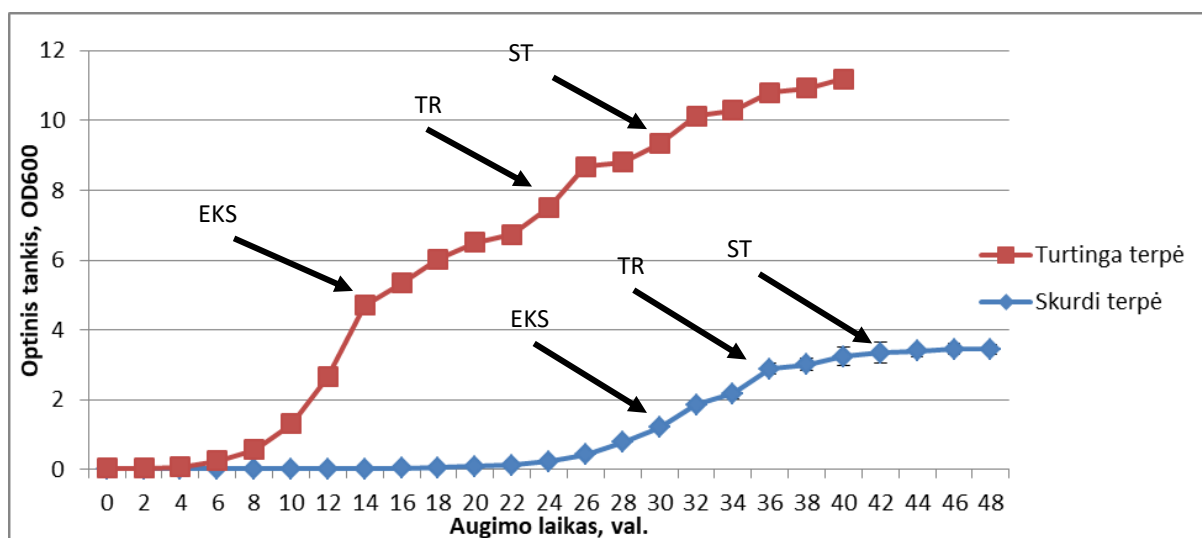
Pradmens pavadinimas	Pradmens seka 5'→3'	Produkto dydis, bp	Pradmenų taikiny
D_18_PKS-1F/R	TCATGACCCGACCAAATGGG	131	MK461204
	TGCCCTCCTGAGTGGATTTTC		
D_18_PKS-2F/R	TCGATCAAGTCCATGGTGGG	143	MK461207
	ACGTAGTCGAGGTTCGCATTC		
A_16_NRPS_1F/R	GGAATACCCGCTGGATCGTT	134	MK532973
	CGTCCTCTTCGAGACACCAG		
A_16_NRPS_2F/R	ATGACAGTTTGTGGACCCCG	155	MK532981
	ACCGCCAAAGCAATACACCT		
I_13_NRPS_1F/R	GTCGCCTACATGCTCGAAGA	180	MK532969
	GATCACGTAGGCCAGGTTGT		
Ju_16_NRPS_2F/R	CTCCGATGATGTGGCGTTCT	93	MK532974
	TACAAGCGGTTGTTGTCCGGT		
L_3_NRPS_3F/R	CCGAGGACGCCGAACTG	193	MK532965
	GTCGGTCCGGAGGTGTAGAT		
L_5_PKS_1F/R	CGAACTGCAACGGCTGTG	80	MK461205
	TGTTGACGGCGTAGAACCAG		

Kiekybinė PGR atlikta su CFX96 Touch™ Real-Time PCR System (BioRad).

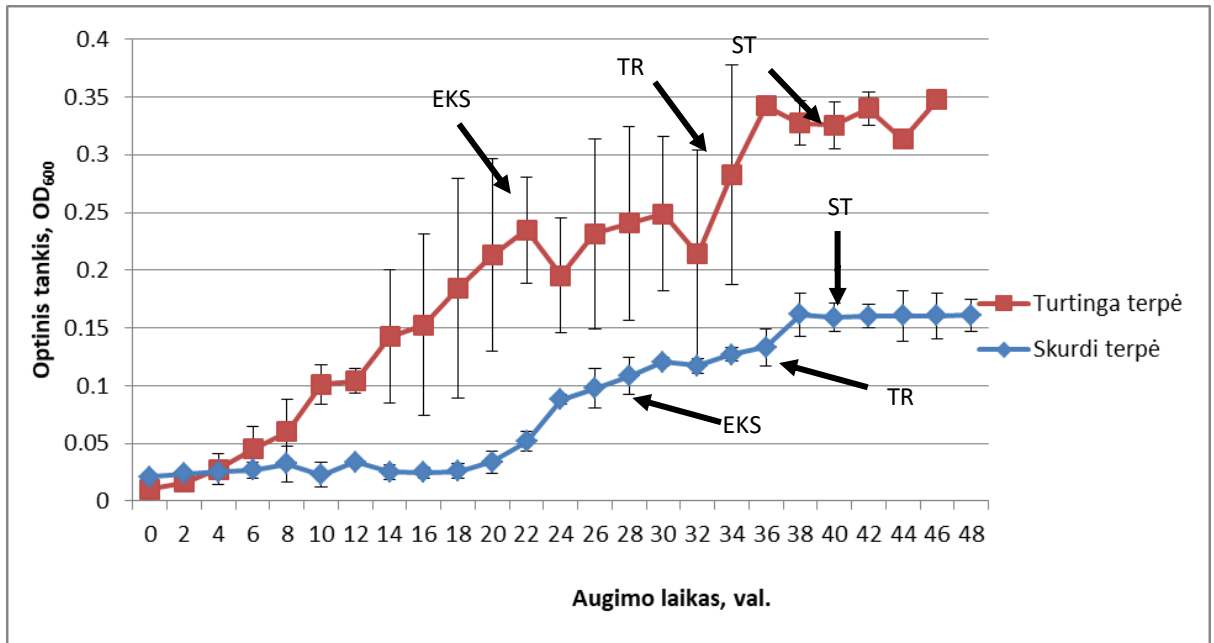
5. REZULTATAI

5.1. Kokybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė

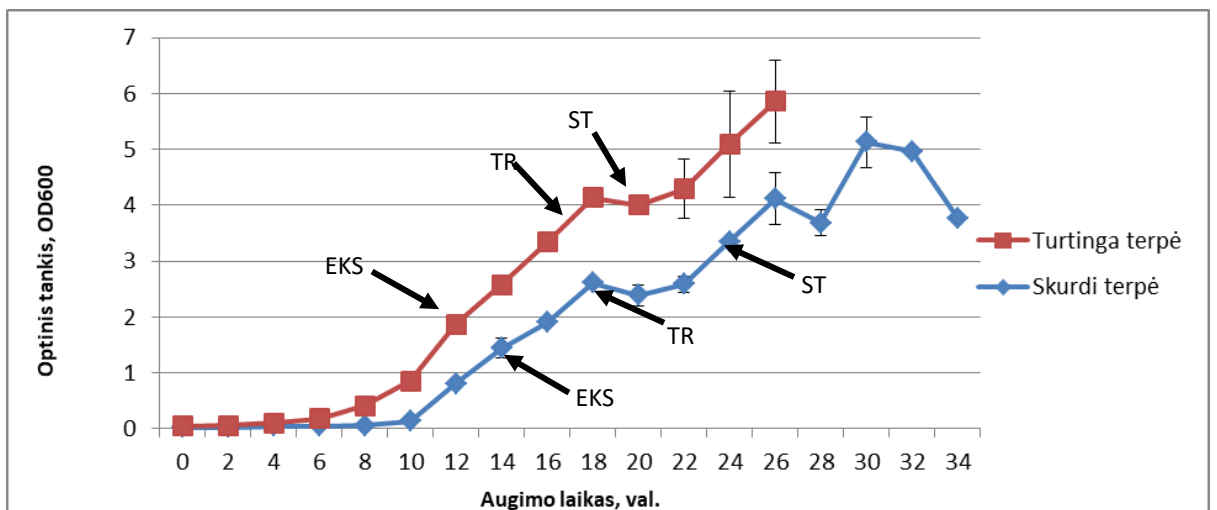
Norint įvertinti bioaktyvių medžiagų genų raiškos tendencijas skirtingose augimo fazėse sudarytos tirtų kamienų augimo kreivės auginant juos turtingoje maistinėmis medžiagomis terpėje bei auginant pusiau praskiestoje, kaip skurdžioje maistinėmis medžiagomis, terpėje:



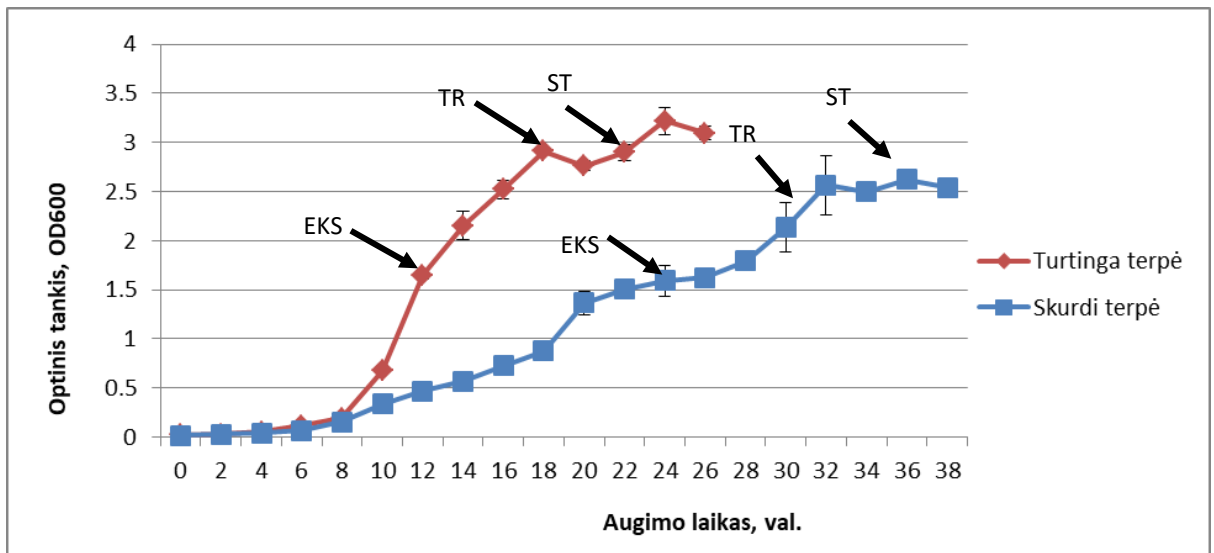
11. paveikslas. *Pseudarthrobacter* sp. kamieno augimo kreivės esant gausiam maistinių medžiagų kiekiui ir sumažinus maistinių medžiagų kiekį augimo terpėje. Rodyklėmis pažymėti auginimo periodai pasirinkti suminės RNR skyrimui – eksponentinio augimo fazėje (EKS), tranzicijoje iš eksponentinio augimo į stacionarų (TR) ir stacionaraus augimo fazėje (ST).



12. paveikslas. *Streptomyces* sp. kamieno augimo kreivės esant gausiam maistinių medžiagų kiekiui ir sumažinus maistinių medžiagų kiekį. Rodyklėmis pažymėti auginimo periodai pasirinkti suminės RNR skyrimui – eksponentinio augimo fazėje (EKS), tranzicijoje iš eksponentinio augimo į stacionarų (TR) ir stacionaraus augimo fazėje (ST).



13. paveikslas. *Pseudomonas* sp. kamieno augimo kreivės esant gausiam maistinių medžiagų kiekiui ir sumažinus maistinių medžiagų kiekį. Rodyklėmis pažymėti auginimo periodai pasirinkti suminės RNR skyrimui – eksponentinio augimo fazėje (EKS), tranzicijoje iš eksponentinio augimo į stacionarų (TR) ir stacionaraus augimo fazėje (ST).



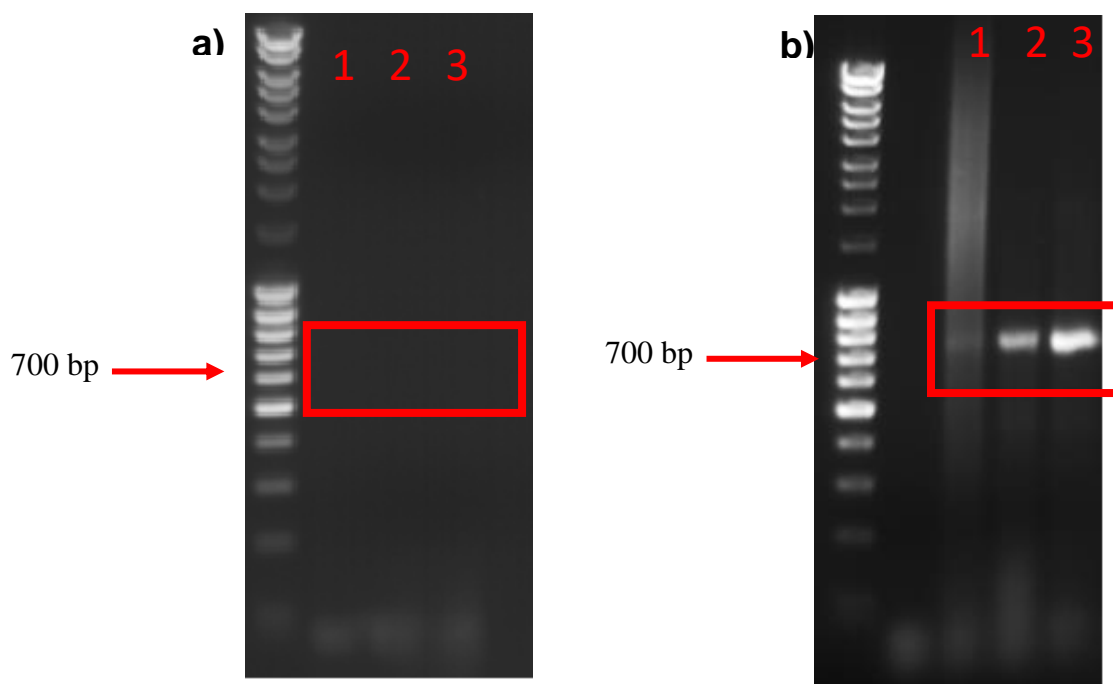
14. paveikslas. *Planomicrobium* sp. kamieno augimo kreivės esant gausiam maistinių medžiagų kiekiui ir sumažinus maistinių medžiagų kiekį. Rodyklėmis pažymėti auginimo periodai pasirinkti suminės RNR skyrimui – eksponentinio augimo fazėje (EKS), tranzicijoje iš eksponentinio augimo į stacionarų (TR) ir stacionaraus augimo fazėje (ST).

Norint įvertinti ar skirtingomis auginimo sąlygomis vykdoma genomuose rastų bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiška, ar ji kinta priklausomai nuo augimo turtingoje ar skurdžioje terpėje, nuspręsta atlikti kokybinę bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizę. Šiam tikslui naudojant suminę RNR, išskirtą iš skirtingų tiriamųjų kamienų augimo fazių, susintetinta kopijinė DNR, kuri naudota kaip matrica PGR reakcijose su genų paieškai naudotais pradmenimis (3 lent.).

Visomis tirtomis sąlygomis bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiška *Planomicrobium* sp. kamiene nebuvo stebėta, todėl tyrimai su šiuo kamieniu toliau nebuvo tęsiami.

5.1.1. *Pseudarthrobacter* sp. kamieno kokybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė

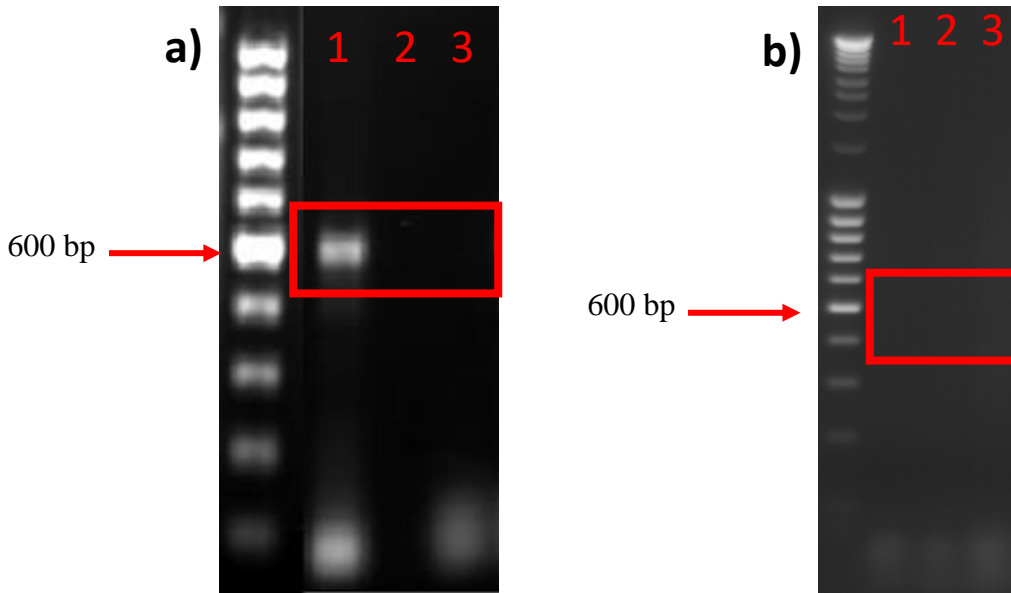
Pseudarthrobacter sp. kamiene neribosominių peptidų sintezės raiška nepastebėta augant turtingoje maistinėmis medžiagomis aplinkoje, tačiau sumažinus maistinių medžiagų kiekį atsirado visose augimo stadijose (15 pav.).



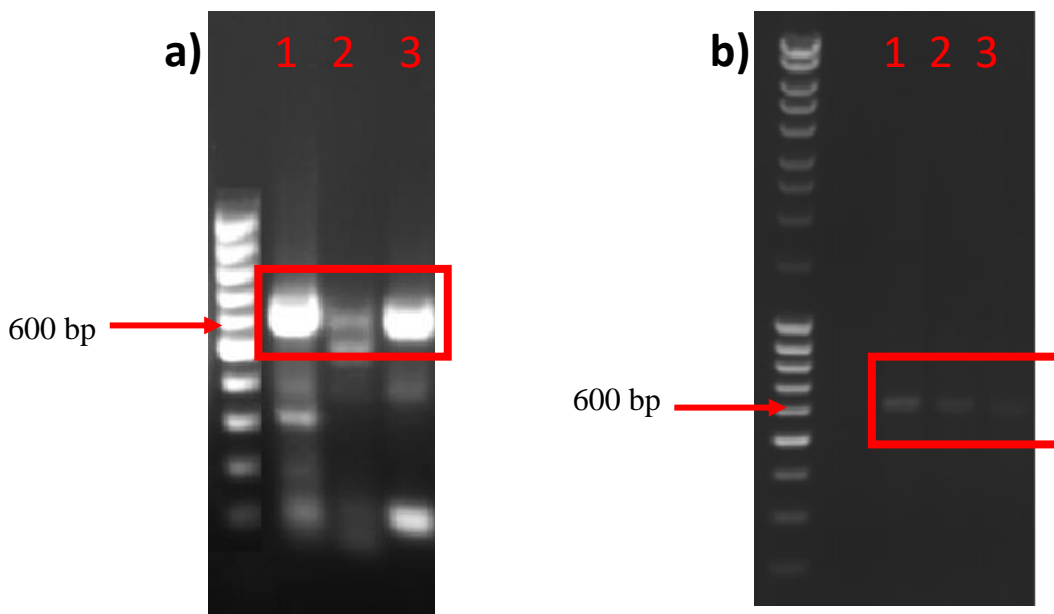
15 paveikslas. Neribosominių peptidų sintetazės geno transkripcija *Pseudarthrobacter* sp. kamiene (A3F/A7R). 1 – eksponentinio augimo fazė; 2 – perėjimas iš eksponentinio augimo į stacionarų; 3 – stacionaraus augimo fazė. **a)** Esant dideliame maistinių medžiagų kiekiui augimo terpėje šio geno raiška nebuvo stebėta; **b)** Sumažinus maistinių medžiagų kiekį šio geno raiška buvo stebima visose augimo fazėse. Naudotas molekulinės masės žymuo MassRuler DNA ladder mix.

5.1.2. *Streptomyces* sp. kamieno kokybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė

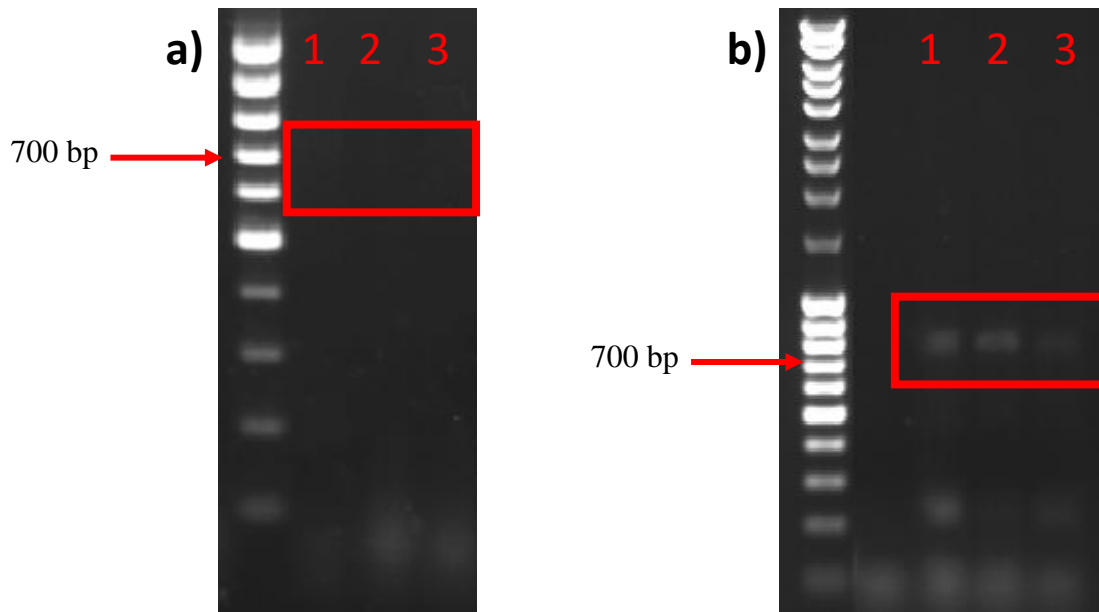
Streptomyces sp. atveju neribosominių peptidų sintetazės raiška atsirado tik sumažinus mitybinių medžiagų kiekį augimo terpėje (18 pav.), analogiškai *Pseudarthrobacter* sp. kamiene koduojamos neribosominių peptidų sintetazės genai. Poliketidų sintazių raiška, vienu atveju išnyko sumažinus maistinių medžiagų (16 pav.), o kitu išliko vienoda nepriklausomai nuo prieinamų maistinių medžiagų kiekio (17 pav.).



16 paveikslas. Poliketidų sintazės geno transkripcija *Streptomyces* sp. kamiene (ARO-PKS). 1 – eksponentinio augimo fazė; 2 – perėjimas iš eksponentinio augimo į stacionarų; 3 – stacionaraus augimo fazė. **a)** Esant dideliui maistinių medžiagų augimo terpėje raiška stebėta eksponentinio augimo viduryje; **b)** Sumažinus maistinių medžiagų kiekį, šio geno transkripcija nebuvo stebima. Naudotas molekulinės masės žymuo **a)** GeneRuler 1Kb DNA ladder, **b)** MassRuler DNA ladder mix.



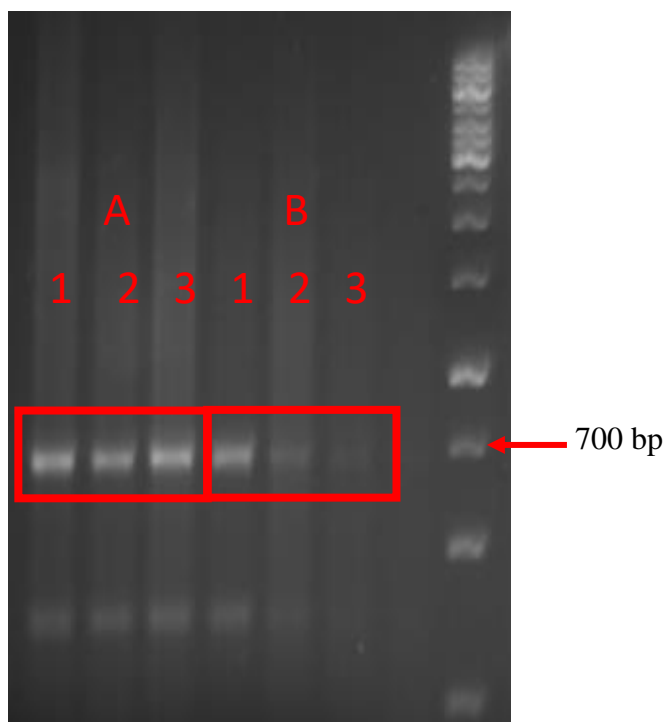
17 paveikslas. Poliketidų sintazės geno transkripcija *Streptomyces* sp. kamiene (KSa-F/R). 1 – eksponentinio augimo fazė; 2 – perėjimas iš eksponentinio augimo į stacionarų; 3 – stacionaraus augimo fazė. Geno transkripcija matoma visose augimo stadijose - tiek **a)** esant dideliui maistinių medžiagų, tiek **b)** sumažinus jų kiekį augimo terpėje. Naudotas molekulinės masės žymuo **a)** GeneRuler 1Kb DNA ladder, **b)** MassRuler DNA ladder mix.



18 paveikslas. Neribosominių peptidų sintetazės geno transkripcija *Streptomyces* sp. kamiene (A3F/A7R). 1 – eksponentinio augimo fazė; 2 – perėjimas iš eksponentinio augimo į stacionarų; 3 – stacionaraus augimo fazė. **a)** Esant dideliame maistinių medžiagų kiekiui augimo terpėje šio geno raiška nebuvo stebėta; **b)** Sumažinus maistinių medžiagų kiekį šio geno raiška buvo stebima visose augimo fazėse. Naudotas molekulinės masės žymuo **a)** GeneRuler 1kb DNA ladder, **b)** MassRuler DNA ladder mix.

5.1.3. *Pseudomonas* sp. kokybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė

Pseudomonas sp. kamiene neribosominių peptidų sintetazės raiška naudojant TGD/LGG pradmenis nebuvo aptikta, o neribosominių peptidų sintetazė identifikuota naudojant A3F/A7R pradmenis buvo transkribuota visomis tirtomis augimo sąlygomis (19 pav.).



19 paveikslas. Neribosominių peptidų sintetazės geno transkripcija *Pseudomonas* sp. kamiene (A3F/A7R). 1 – eksponentinio augimo fazė; 2 – perėjimas iš eksponentinio augimo į stacionarų; 3 – stacionaraus augimo fazė. **a)** Esant dideliame maistinių medžiagų kiekiui augimo terpėje šio geno raiška nebuvo stebėta; **b)** Sumažinus maistinių medžiagų kiekį šio geno raiška buvo stebima visose augimo fazėse. Naudotas molekulinės masės žymuo GeneRuler 1Kb DNA ladder.

5.4 Kiekybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė

Streptomyces sp. ir antroji (TGD/LGG) *Pseudomonas* sp. neribosominių peptidų sintetazių genų sekos buvo prastos kokybės, todėl nebuvo deponuotos Genų banke. Pagal pagausintų fragmentų sekas buvo sukonstruoti tiksliniai kiekybinės PGR pradmenys (3 lentelė). Sukurti tinkamų tikslinių pradmenų *Pseudarthrobacter* sp. kamienai nepavyko, todėl šio kamieno analizė nebuvo tęsiama.

Streptomyces sp. bei *Pseudomonas* sp. kamienai buvo pasirinkti kiekybiniam bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos tyrimui. Kiekybinės raiškos analizės metu *Pseudomonas* sp. kamiene stebėta neribosominių peptidų sintetazės raiška. *Streptomyces* sp. kamiene stebėta dviejų poliketidų sintetazių bei vieno neribosominių peptidų sintetazės geno raiška.

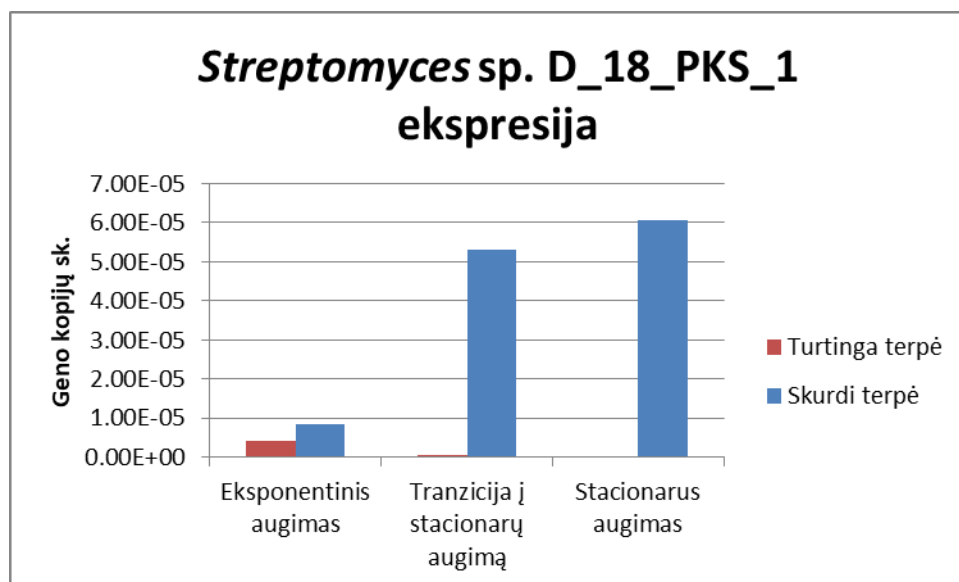
Šalia tikslinių šiems kamienams sukonstruotų pradmenų (D_18_PKS_1, D_18_PKS_2 bei JU_16_NRPS_2), atlikta raiškos analizė ir su pradmenimis, sukonstruotais kitiems tų pačių genčių mikroorganizmams išskirtiems iš Kruberio–Voronja urvo:

Streptomyces sp. – L_5_PKS_1F/R;

Pseudomonas sp. – A_16_NRPS_1F/R, A_16_NRPS_2F/R, I_13_NRPS_1F/R, L_3_NRPS_3F/R.

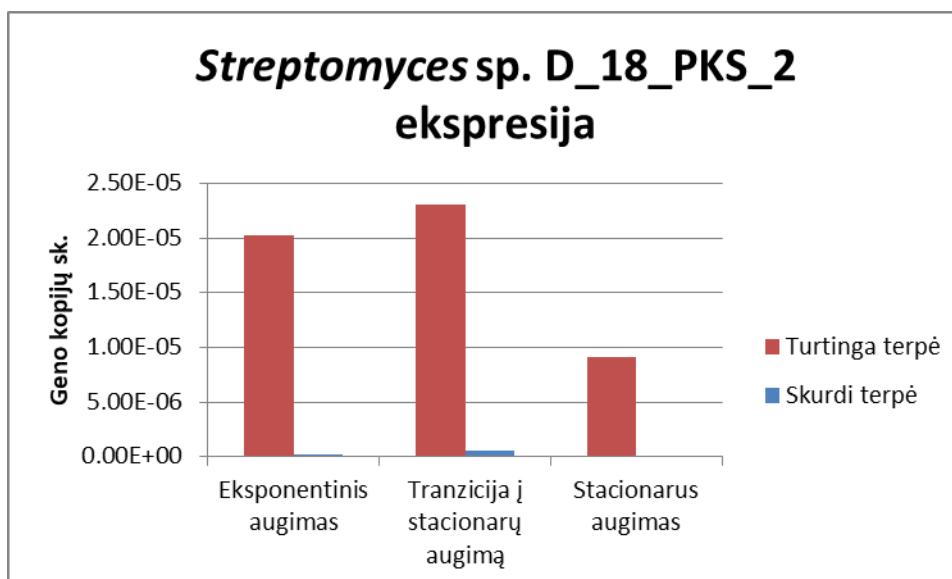
D_18_PKS_1 ir D_18_PKS_2 poliketidų sintazių raiška *Streptomyces* sp. kamiene visiškai skyrėsi viena nuo kitos (20 pav. ir 21 pav.).

D_18_PKS_1 atveju raiška itin padidėjo tranzicijoje į stacionarų augimą bei stacionaraus augimo fazėje augant terpėje skurdžioje maistinėmis medžiagomis, o turtingoje terpėje atvirkščiai – šiose augimo stadijose sumažėjo. Šio geno raiška skurdžioje terpėje buvo dešimt kartų didesnė nei augant turtingoje terpėje (20 pav.).



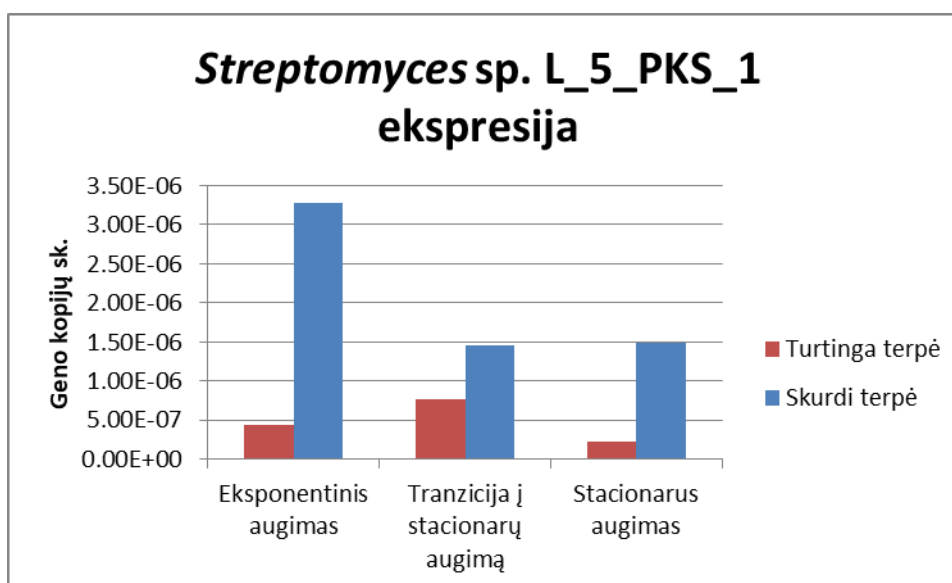
20 paveikslas. D_18_PKS_1 geno raiška *Streptomyces* sp. kamiene, skirtingomis augimo sąlygomis išreikšta geno kopijų skaičiumi 0.1 μ g suminės RNR.

D_18_PKS_2 geno raiška – priešingai, ji buvo daug didesnė augant turtingoje maistinėmis medžiagomis terpėje, sumažėjo stacionaraus augimo fazėje.



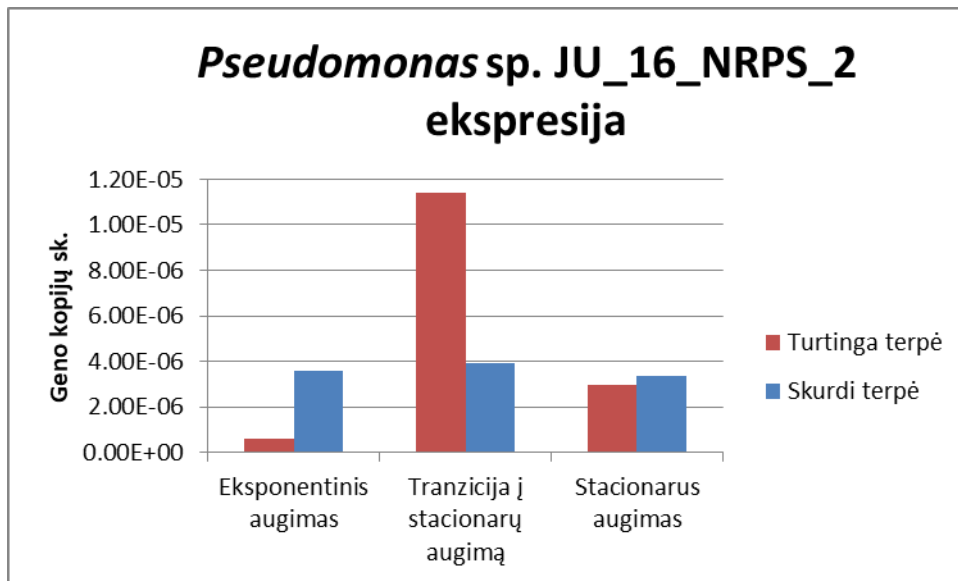
21 paveikslas. D_18_PKS_2 geno raiška *Streptomyces* sp. kamiene, skirtingomis augimo sąlygomis, išreikšta geno kopijų skaičiumi 0,1 μg suminės RNR.

L5_PKS_1 geno raiška *Streptomyces* sp. kamiene nuo augimo fazės nepriklausė augant turtingoje maistinėmis medžiagomis terpėje. Raiška skurdžioje terpėje buvo didesnė, sumažėjo tranzicijoje į stacionarų augimą ir išlaikė nukritusį ekspresijos lygį stacionaraus augimo fazėje (22 pav.).



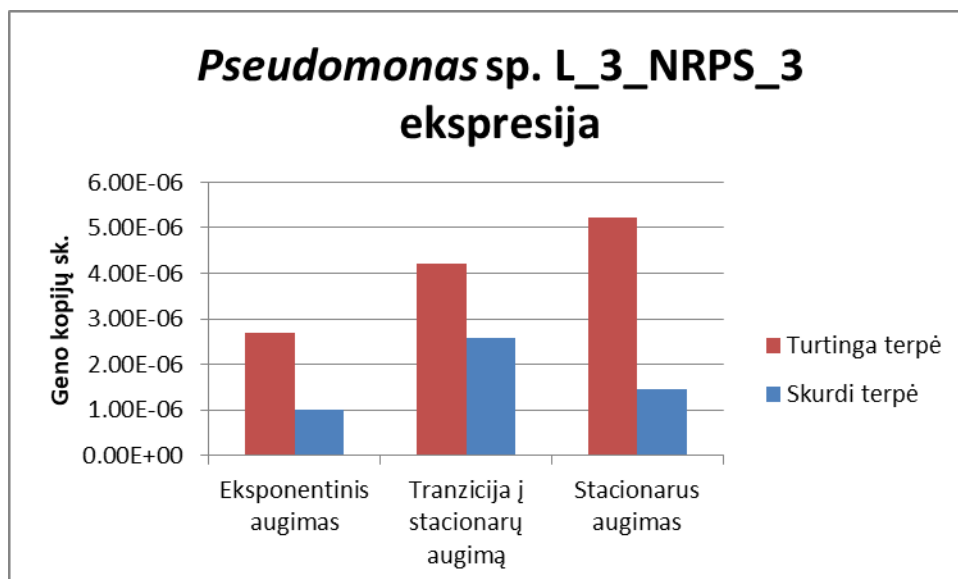
22 paveikslas. L_5_PKS_1 geno raiška *Streptomyces* sp. kamiene, skirtingomis augimo sąlygomis, išreikšta geno kopijų skaičiumi 0,1 μg suminės RNR.

Pseudomonas sp. kamiene JU_16NRPS_2 geno raiška buvo pastovi augant skurdžioje mitybinėje terpėje ir nepriklausė nuo augimo fazės, o turtingoje varijavo – padidėjo tranzicijoje į stacionarų augimą ir vėl sumažėjo stacionaraus augimo fazėje (23 pav.).



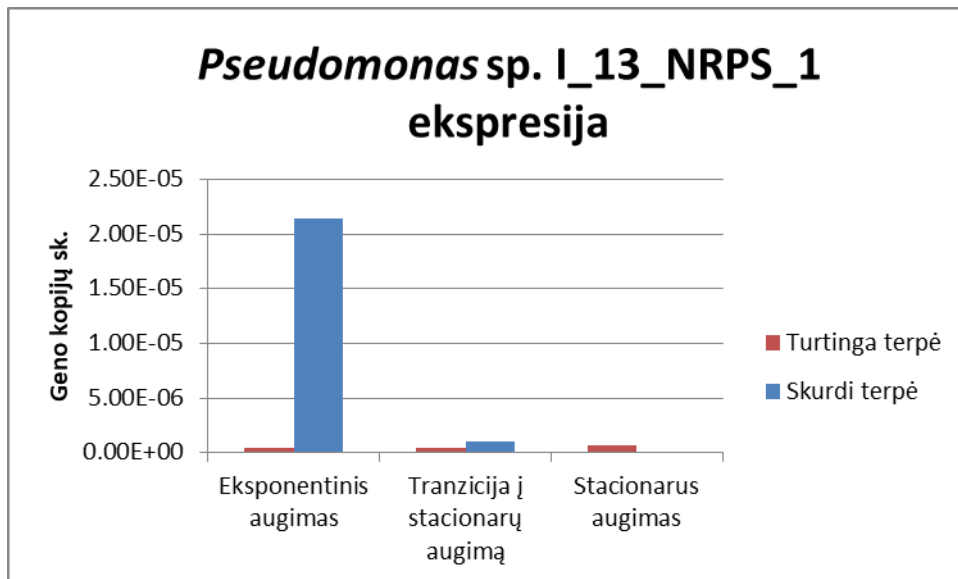
23 paveikslas. JU_16_NRPS_2 geno raiška *Pseudomonas* sp. kamiene skirtingomis augimo sąlygomis, išreikšta geno kopijų skaičiumi 0,1 µg suminės RNR.

L_3_NRPS_3 geno raiška pastoviai didėjo per visas augimo fazes, skurdžioje terpėje buvo žemesnė lyginant su augimu turtingoje terpėje (24 pav.).



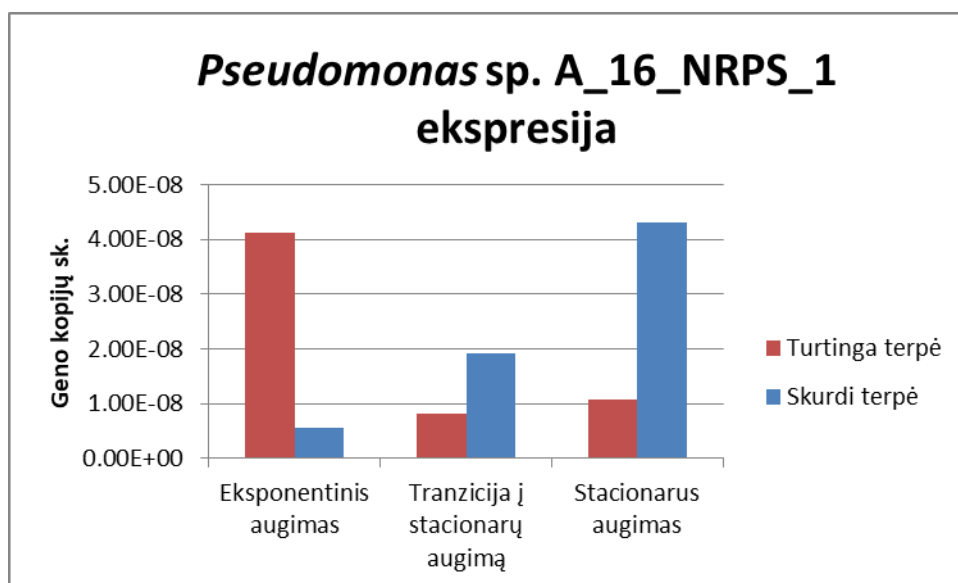
24 paveikslas. L_3_NRPS_3 geno raiška *Pseudomonas* sp. kamiene skirtingomis augimo sąlygomis, išreikšta geno kopijų skaičiumi 0,1 µg suminės RNR.

L_13_NRPS_1 raiška augant turtingoje terpėje išliko pastovi visose augimo fazėse ir nuo jų nepriklausė, bet sumažinus prieinamų mitybinių medžiagų kiekį buvo ženkliai didesnė eksponentinio augimo metu. Tranzicijoje į stacionarų augimą bei stacionaraus augimo fazėje šio geno raiška itin smarkiai sumažėjo lyginant su eksponentinio augimo faze (25 pav.).



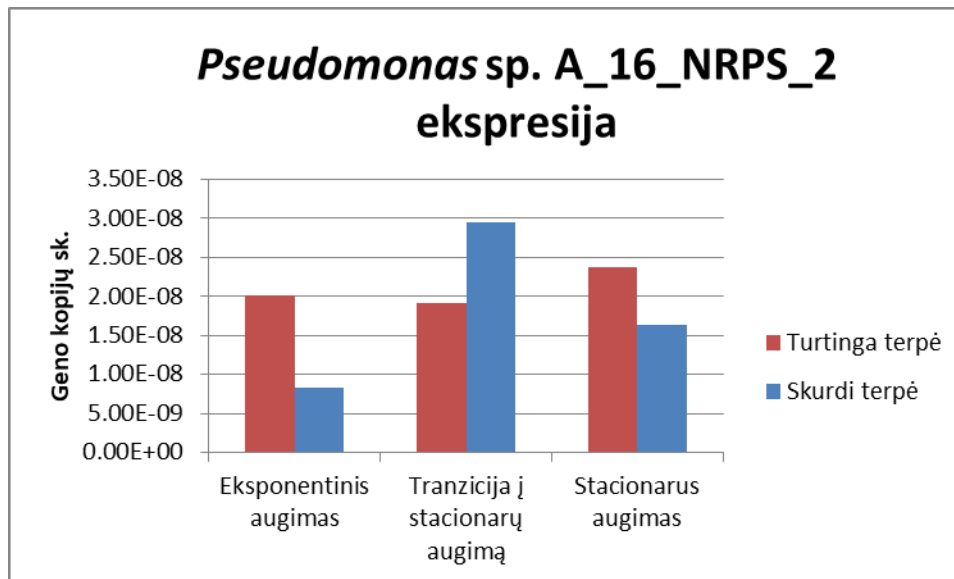
25 paveikslas. I_13_NRPS_1 geno raiška *Pseudomonas* sp. kamiene skirtingomis augimo sąlygomis, išreikšta geno kopijų skaičiumi 0,1 µg suminės RNR.

A_16_NRPS_1 geno raiška turtingoje terpėje tendencingai mažėjo keičiantis augimo fazėms, o skurdžioje, priešingai – didėjo (26 pav.).



26 paveikslas. A_16_NRPS_1 geno raiška *Pseudomonas* sp. kamiene skirtingomis augimo sąlygomis, išreikšta geno kopijų skaičiumi 0,1 µg suminės RNR.

A_16_NRPS_2 geno raiška augnat turtingoje terpėje varijavo tik neženkliai ir nepriklausė nuo augimo fazės, skurdžioje terpėje ekspresija didžiausią lygį pasiekė tranzicijoje į stacionarų augimą (27 pav.).



27 paveikslas. A_16_NRPS_2 geno raiška *Pseudomonas* sp. kamiene skirtingomis augimo sąlygomis, išreikšta geno kopijų skaičiumi 0,1 μ g suminės RNR.

6. REZULTATŲ APTARIMAS

Įvairios ekstremalios aplinkos yra gana mažai ištirtos naujų bioaktyvių medžiagų paieškai. Urvai – viena iš tokių aplinkų, kur dėl itin oligotrofiškų augimo sąlygų bakterijų populiacijos priverstos pasitelkti įvairius konkurencinius mechanizmus. Vienas jų – bioaktyvių medžiagų sintezė (Adam et al., 2018). Moksliniai tyrimai jau parodė, kad fenotipinės analizės nepakanka parodyti konkretaus mikroorganizmo bioaktyvių medžiagų produkcijos potencialą koduojamą genome, todėl genetinės medžiagos ir genų raiškos tyrimai turi didžiulį potencialą. (Maciejewska et al., 2016).

Pagal *Pseudarthrobacter* sp. kamieno augimo kreives išskirtos augimo fazės ir pasirinkti taškai suminės RNR skyrimui augant turtingoje maistinėmis medžiagomis terpėje - eksponentinio augimo fazė (14 val.), tranzicijoje iš eksponentinio augimo į stacionarų (24 val.) ir stacionaraus augimo fazė (30 val.). Augant skurdžioje maistinėmis medžiagomis terpėje pasiektas keliskart mažesnis ląstelių optinis tankis, atitinkamos augimo fazės pasiektos vėliau - eksponentinio augimo fazė (30 val.), tranzicija iš eksponentinio augimo į stacionarų (36 val.) ir stacionaraus augimo fazė (42 val.) (11 pav.).

Streptomyces sp. atveju augimo fazių nustatymas buvo sudėtingesnis dėl ląstelių savybės formuoti agregatus augant suspensijoje. Tai gerai žinoma problema auginant *Streptomyces* genties bei kitas filamentines bakterijas (Zacchetti et al., 2018). Šiame darbe pasirinkta *Streptomyces* sp. augimą nustatinėti matuojant ląstelių sudaromų agregatų optinį

tankį. Nors agregatus formuojančių bei filamentinių bakterijų augimas gali būti nustatinėjamas kitais metodais, kaip pavyzdžiui pagal sausos biomasės svorio pokytį arba difenilamino kalorimetriniu metodu, kuris yra vienas tiksliausių. Difenilamino kalorimetrinio metodo pagrindas - difenilamino savybė jungtis prie purinų sudarant spalvotą kompleksą, tačiau šio tyrimo atveju metodo pritaikyti nepavyko, nes šiame naudojamomis sąlygomis nebuvo gauta pilna agregatuose esančių ląstelių lizė ir atitinkamai - jų nukleorūgščių degradacija iki purinų ir pirimidinų. Kadangi, literatūriniais duomenimis, kiti galimi metodai nėra tikslesni nei optinio tankio matavimas buvo pasirinktas būtent šis metodas (Zhao et al., 2013). Identifikuotos *Streptomyces* sp. augimo fazės augant turtingoje maistinėmis medžiagomis terpėje - eksponentinio augimo fazė (22 val.), tranzicijoje iš eksponentinio augimo į stacionarų (34 val.) ir stacionaraus augimo fazė (42 val.). Augant skurdžioje maistinėmis medžiagomis terpėje pasiektas dvigubai mažesnis ląstelių optinis tankis, atitinkamos augimo fazės tapo geriau pastebimos - eksponentinio augimo fazė (28 val.), tranzicija iš eksponentinio augimo į stacionarų (36 val.) ir stacionaraus augimo fazė (40 val.) (12 pav.).

Pseudomonas sp. kamieno augimo fazės identifikuotos augant turtingoje maistinėmis medžiagomis terpėje - eksponentinio augimo fazė (12 val.), tranzicijoje iš eksponentinio augimo į stacionarų (17 val.) ir stacionaraus augimo fazė (20 val.). Augant skurdžioje maistinėmis medžiagomis terpėje - eksponentinio augimo fazė (14 val.), tranzicija iš eksponentinio augimo į stacionarų (18 val.) ir stacionaraus augimo fazė (24 val.) (13 pav.).

Planomicrobiom sp. augant turtingoje terpėje stebėtas labiau išreikštas eksponentinis augimas, skurdžioje maistinėmis medžiagomis terpėje visos atitinkamos augimo fazės pasiektos vėliau. Augant turtingoje maistinėmis medžiagomis terpėje mėginiai suminės RNR skyrimui eksponentiniame augime pasirinkta 12 augimo valandą, tranzicijoje į stacionarų augimą 20 valandą, ir stacionarioje augimo fazėje 24 valandą. Augant skurdžioje maistinėmis medžiagomis terpėje - eksponentinio augimo fazė pasirinkta 24 valandą, tranzicija iš eksponentinio augimo į stacionarų 31 valandą ir stacionaraus augimo fazė 36 valandą.

Kokybinės raiškos analizės metu nustatyta, kad neribosominių peptidų sintetazių genų raiška *Streptomyces* sp. (A3F/A7R) ir *Pseudarthrobacter* sp. (A3F/A7R) kamienuose priklauso nuo mitybinės terpės sudėties. Šių genų raiška stebėta augant terpėje su sumažintu mitybinių medžiagų kiekiu ir buvo matoma visose augimo stadijose. Neribosominių peptidų sintetazės geno transkripcija *Pseudomonas* sp. kamiene (A3F/A7R) buvo matoma visuose mėginiuose nepriklausomai nuo mitybinės terpės ar augimo fazės. Nors neribosominiai

peptidai priklauso antriniam metabolitams ir turėtų būti produkuojami išskirtinai stacionaraus augimo fazėje, yra duomenų, kad skirtingų neribosominių peptidų sintezės genų ekspresija didžiausią piką pasiekia tranzicijoje iš eksponentinio augimo į stacionarų, o kitose augimo fazėse yra stebima mažesniu lygmeniu (Vargas-Straube et al., 2016, González et al., 2017).

Streptomyces sp. kamiene bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiška stipriai priklausė nuo prieinamų maistinių medžiagų kiekio mitybinėje terpėje. genas gausiau ekspresuotas turtingesnėje, o D_18_PKS_2 genas – skurdesnėje terpėje. Yra žinoma virš 30 skirtingų antrinių metabolitų *Streptomyces* gentyje, kuriuos koduojančių genų transkripcija yra aktyvuojama arba represuojama priklausomai nuo įsisavinimui prieinamo anglies šaltinio (Uguru et al., 2005). Kaip pavyzdys - *Streptomyces ambofaciens* produkuojami poliketidai aktinorodinas ir doksorubicinas. Aktinorodino genų raiška yra inhibuojama gliukozės iki 100 mM koncentracijos, tačiau didesnė šio sacharido koncentracijose raiška aktyvuojama ir tai pradeda inhibuoti kito antrinio metabolito doksorubicino sintezę (Ruiz et al., 2010). Žinoma, paaiškinti tikslų reguliacinį mechanizmą susijusį su mūsų tirtų genų raiška gali būti sudėtinga - egzistuoja net keletas reguliacinių baltymų, būdingų *Streptomyces* genčiai, kurių konkrečios funkcijos yra nežinomos. Vienas tokių reguliatorių – baltymas AfsR. Parodyta, jog šis nedidelis peptidas skirtingais mechanizmais darantis įtaką apie 117 skirtingų genų raišką *Streptomyces coelicolor* bei *Streptomyces lividans*. Dauguma iš šių genų yra ekspresuojami kaip atsakas į maistinių medžiagų stygių, o jų produktai - antibiotikai bei kiti genų raiškos reguliatoriai. Keisčiausia, kad kitose *Streptomyces* rūšyse šis baltymas visiškai nesusijęs su antrinių metabolitų produkcija, bet dalyvauja morfologinėje diferenciacijoje (Bruijin et al., 2016).

Net kelių genų raiška *Pseudomonas* sp. kamiene buvo ženkliai įtakojama augimo fazės: L3_NRPS_3, I_13_NRPS_1, A_16_NRPS_1. Dažnu atveju, antrinių metabolitų sintezės genai sudaro didžiulę genomo dalį, o kartu su biosintezės genais koduojama ir gausus reguliacinių baltymų kiekis. Šie baltymai dalyvauja ne tik tiesioginiame biosintezės genų raiškos, bet ir pirmtakų sintezės, kuri vykdoma naudojant pirminius metabolitus, valdyme. Dėl šios priežasties Neribosominių peptidų sintezės genų raiška stipriai susijusi su ląstelių augimo faze – padidėję genų raiškos lygmenys gali būti stebimi tiek eksponentinio, tiek stacionaraus augimo metu, ką ir pastebėjome šio tyrimo metu (Bruijin et al., 2016). Kitas veiksnys, galintis paaiškinti mūsų stebėtus rezultatus yra kvorumo jautimas. Tai yra gerai žinoma antrinių metabolitų sintezės valdymo sistema (Barnard et al., 2007; Liu et al., 2011). Kartais ši genų transkripcijos inhibicijos ir aktyvavimo sistema gali būti susijusi ir su anglies

šaltinių kiekiu mitybinėje terpėje. *Erwinia carotovora* bakterijose karbapenemo sintezės genų raiška yra inhibuojama glicerolio, tačiau ne tiesiogiai, o inhibuojant *carI* geną, atsakingą už N-3-(oksoheksanoil)-L homoserino laktono sintezę. Šios, už kvorumo jutimą atsakingos molekulės trūkumas ir limituoja karbapenemo sintezės genų raišką (Veselova et al., 2003; Ruiz et al., 2010).

JU_16_NRPS_2 geno atveju *Pseudomonas* sp. kamiene didžiausia raiška stebėta ląstelėms pereinant iš eksponentinio augimo į stacionarų. Tyrimai su *Bacillus subtilis* parodė, jog kai kurių antrinių metabolitų - poliketidų bei neribosominių peptidų sintezės genų raiška didžiausius ekspresijos lygius gali pasiekti ne stacionaraus augimo fazėje bet tranzicijos metu (Antony-Babu et al., 2017), kas ir buvo stebėta šio tyrimo metu.

Šio tyrimo rezultatai atskleidė, jog tiek maistinių medžiagų kiekiai, tiek augimo fazė daro didelę įtaką bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškai. Sumažinus mitybinių medžiagų kiekį vienu genų raiška gali ženkliai sumažėti, o kitų genų transkripcija gali būti inhibuojama. Nors poliketidai bei neribosominiai peptidai yra antriniai metabolitai šių medžiagų sintezės genų raiška buvo stebėta ir eksponentinio augimo metu, kas paaiškintų antibakterinio fenotipo nebuvimą *Streptomyces* sp. kamiene ankstesnių tyrimų metu. Žinoma, negalima atmesti ir prielaidos, jog šie tirti metabolitai yra ne antibakterinės medžiagos, o kitokie bioaktyvūs produktai, kurių fenotipinis aktyvumas nebuvo tikrinamas pavyzdžiui priešvėžinės ar antihelmininės medžiagos, kaip kad kiti šios genties produkuojami bioaktyvūs junginiai (González et al., 2017).

7. IŠVADOS

1. Kokybinė bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizė parodė, jog:

1.1. *Pseudarthrobacter* sp. kamiene neribosominių peptidų sintezės raiška priklauso nuo maistinių medžiagų kiekio mitybinėje terpėje.

1.2. *Streptomyces* sp. kamiene vienos poliketidų sintazės raiška bei neribosominių peptidų sintezės raiška priklausė nuo maistinių medžiagų kiekio mitybinėje terpėje, tačiau kitos poliketidų sintazės geno raiška nuo to nepriklausė.

1.3. *Pseudomonas* sp. kamiene abiejų neribosominių peptidų sintetazių raiška nepriklausė nei nuo mitybinių medžiagų kiekio terpėje, nei nuo augimo fazės.

2. Kiekybinės bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos analizės metu nustatyta, kad:

2.1. *Streptomyces* sp. kamiene genų D_18_PKS_1 ir D_18_PKS_2 raiškos kiekiai visiškai skyrėsi priklausomai nuo mitybinės terpės sudėties, geno L_5_PKS_1 raiška buvo didesnė skurdžioje mitybinėje terpėje, nepriklausė nuo augimo fazės.

2.2. *Pseudomonas* sp. kamiene L_3_NRPS_3 didėjo per visas augimo fazes, bet nepriklausė nuo mitybinės terpės sudėties. I_13_NRPS_1 geno raiška buvo ženkliai didesnė eksponentinio augimo skurdžioje terpėje metu, nei kitomis tirtomis augimo sąlygomis, o geno A_16_NRPS_1 raiška stipriai priklausė nuo mitybinės terpės sudėties ir augimo metu didėjo esant daug maistinių medžiagų, bet mažėjo esant sumažintam maistinių medžiagų kiekiui. Genų JU_16_NRPS_2 ir A_16_NRPS_2 transkripcija neparodė tendencingos priklausomybės nuo augimo fazės ar prieinamų maistinių medžiagų kiekio augimo metu.

8. TYRIMO REZULTATŲ SKLAIDA

- Šis tyrimas buvo finansuojamas iš 2014–2020 metų Europos Sąjungos investicinių fondų pagal LMT projektą (09.3.-LMT-K-712) „Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą“.
- Tyrimo duomenys paskelbti stendiniame pranešime tarptautinėje konferencijoje Vita Scientia (2018 m. sausio 3 d., Vilnius)

51

Analysis of bioactive compound synthesis gene transcription in Krubera – Voronja Cave bacterial strains

Dominykas Bukelskis, Nomeda Kuisiene

Institute of Biosciences, Life sciences center, Vilnius University, Sauletekio Avenue 7, 10257 Vilnius, Lithuania

- Tyrimo duomenys paskelbti stendiniame pranešime tarptautinėje konferencijoje „4th Congress of Baltic Microbiologists (CBM2018)“ (2018 m., Gdansk, Lenkija)

Screening for polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in bacteria isolated from Krubera-Voronja Cave.

Kuisienė, Nomeda ; Vilniaus universitetas ; Lebedeva, Jolanta ; Vilniaus universitetas ; Bukelskis, Dominykas ; Vilniaus universitetas ; Radevič, Junona ; Vilniaus universitetas ; Lukoševičiūtė, Laima ; Vilniaus universitetas ; Kriaučiūnas, Ignas ; Vilniaus universitetas ; Bučelis, Airidas ; Vilniaus universitetas.

ISSN: 0001-527X.

Acta biochimica Polonica. Warszawa : Panstwowe Wydawnictwo Naukowe. 2018, vol. 65, Supplement 1, abstract no. IV.P.9, p. 70.

9. SANTRAUKA

Dominykas Bukelskis

Bioaktyvių medžiagų sintezės genų raiškos tyrimai Kruberio–Voronja urvo mikroorganizmuose

Dėl intensyviai plintančių atsparumų medicinoje naudojamiems bioaktyviems preparatams, mokslininkai nuolat ieško naujų, bioaktyvių junginių bei jų producentų. Daug žadanti aplinka tokiai paieškai – urvai. Mažas prieinamų energijos šaltinių kiekis verčia mikroorganizmus konkuruoti pasitelkiant tokių medžiagų produkcijos genus. Urvų aplinkos tyrimai skirtingose pasaulio vietose parodė tokių aplinkų potencialumą, tačiau bioaktyvių medžiagų produkcijos genai lieka neištirti.

Darbo metu analizuoti keturi bakterijų kamienai išskirti iš Kruberio–Voronja urvo mėginių. Šių mikroorganizmų genomuose, identifikuoti bioaktyvių medžiagų produkcijos genai: *Streptomyces* sp. – I tipo ir II tipo PKS genai bei NRPS genas; *Pseudarthrobacter* sp. – vienas NRPS genas; *Pseudomonas* sp. – du skirtingi NRPS genai; *Planomicrobium* sp. – vienas, I tipo PKS koduojantis genas.

Visiems keturiems kamienams sudarytos augimo kreivės auginant mikroorganizmus turtingoje maistinėmis medžiagomis terpėje bei skurdžioje. Abejomis augimo sąlygomis išskirta suminė RNR iš ląstelių esančių eksponentinio augimo fazėje, tranzicijoje į stacionarų augimą bei stacionaraus augimo fazėje. Atlikus kokybinę raiškos analizę *Pseudarthrobacter* sp. kamiene NRPS raiška stebėta tik skurdžioje mitybinėje terpėje, visose augimo fazėse, *Streptomyces* sp. I tipo PKS raiška stebėta tik eksponentinio augimo metu turtingoje terpėje, o II tipo PKS visose augimo stadijose, augant tiek turtingoje, tiek skurdžioje terpėje. *Streptomyces* sp. NRPS geno raiška, analogiškai *Pseudarthrobacter* sp. kamiene, stebėta tik skurdžioje mitybinėje terpėje, visose augimo fazėse. *Pseudomonas* sp. vieno NRPS geno raiška nebuvo stebima, o kito NRPS -stebėta visomis tirtomis sąlygomis.

Atlikta kiekybinė raiškos analizė naudojant specifinius kiekybino PGR pradmenis parodė, kad *Streptomyces* sp. kamiene D_18_PKS_1 ir D_18_PKS_2 raiškos kiekiai visiškai skyrėsi priklausomai nuo mitybinės terpės sudėties, o geno L_5_PKS_1 raiška buvo didesnė skurdžioje mitybinėje terpėje, nepriklausė nuo augimo fazės.

Pseudomonas sp. kamiene L_3_NRPS_3 didėjo per visas augimo fazes, bet nepriklausė nuo mitybinės terpės sudėties. I_13_NRPS_1 geno raiška buvo ženkliai didesnė eksponentinio augimo skurdžioje terpėje metu, o geno A_16_NRPS_ raiška priklausė nuo mitybinės terpės sudėties ir augimo fazės.

10. SUMMARY

Dominykas Bukelskis

Analysis of bioactive compound synthesis gene transcription in Krubera – Voronja Cave bacterial

Because of increasing emergence of antibiotic resistant bacteria, scientists are constantly trying to discover for new bioactive compounds. A promising environment for such a search - caves. A limited resource of available energy in such habitats, forces organisms to compete through production of antimicrobial agents. Many bacteria that show biological activities have already been isolated, although the bioactive compound production genes remain unexplored.

Four bacterial strains isolated from Kruber-Voronja cave samples were analyzed during the work. In the genomes of these microorganisms, genes for the production of bioactive substances have been identified: *Streptomyces* sp. - Type I and Type II PKS genes and NRPS gene; *Pseudarthrobacter* sp. - one NRPS gene; *Pseudomonas* sp. - two different NRPS genes; *Planomicrobium* sp. - one gene coding for Type I PKS.

Growth curves were constructed for all four strains by growing microorganisms nutrient rich and nutrient poor environments. Total RNA were extracted from the cells in the exponential growth phase, in the transition to stationary growth and in the stationary growth phase. In case of *Pseudarthrobacter* sp. strain NRPS expression was observed only in nutrient poor medium, during all growth phases. For *Streptomyces* sp. Type I PKS expression was observed only during exponential growth in rich media, and Type II PKS at all growth stages, both in rich and poor media. *Streptomyces* sp. expression of the NRPS gene, similar to *Pseudarthrobacter* sp. strain, observed only in nutrient poor media, during all growth stages. For *Pseudomonas* sp. the expression of one NRPS gene was not observed and the other NRPS gene expression was observed under all conditions tested.

The quantitative expression analysis using specific quantitative PCR primers showed that in case of *Streptomyces* sp. strain PKS genes D_18_PKS_1 and D_18_PKS_2 expression levels were completely different depending on the composition of the nutrient amount in growth media, and the expression of the gene L_5_PKS_1 was higher in nutrient poor media and independent of the growth phase.

In case of *Pseudomonas* sp. strain expression of L_3_NRPS_3 gene increased over all growth phases but was not dependent on the composition of the culture medium. The expression of the gene I_13_NRPS_1 was significantly higher during exponential growth in nutrient poor media, and the expression of the gene A_16_NRPS_ depended on both the composition of growth media and growth phase.

11. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adam, D., Maciejewska, M., Naômé, A., Martinet, L., Coppieters, W., Karim, L., Baurain, D., and Rigali, S. (2018). Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Hard-to-Culture Actinobacteria from Cave Moonmilk Deposits. *Antibiotics* 7, 28.
2. Agrawal, S., Acharya, D., Adholeya, A., Barrow, C.J., and Deshmukh, S.K., (2017). Nonribosomal Peptides from Marine Microbes and Their Antimicrobial and Anticancer Potential. *Front. Pharmacol.* 8:828.
3. Angert, E.R., Northup, D.E., Reysenbach, A.-L., Peek, A.S., Goebel, B.M., and Pace, N.R. (1998) Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogist*, 83:1583–1592
4. Antony-Babu, S., Stien, D., Eparvier, V., Parrot, D., Tomasi, S., and Suzuki, M.T. (2017). Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Sci. Rep.* 7, 11089.
5. Atlas, R.M. (2010). *Handbook of microbiological media* (Washington, D.C. : Boca Raton, FL: ASM Press ; CRC Press/Taylor & Francis).
6. Ayuso-Sacido, A., Genilloud, O. (2005). New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups. *Microb. Ecol.* 49, 10–24.
7. Barnard, A.M.L., Bowden, S.D., Burr, T., Coulthurst, S.J., Monson, R.E., and Salmond, G.P.C. (2007). Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 1165–1183.
8. Barton, H.A., and Luiszer, F. Microbial metabolic structure in a sulfidic cave hot spring: potential mechanisms of biospeleogenesis (2005). *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 67, no. 1, p. 28-38.
9. Barton, H., Taylor, N., Kreate, M., Springer, A., Oehrle, S., and Bertog, J. (2007). The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. *Int. J. Speleol.* 36, 93–104.
10. Barton, H.A., Taylor, N.M., Lubbers, B.R., and Pemberton, A.C. (2006). DNA extraction from low-biomass carbonate rock: An improved method with reduced contamination and the low-biomass contaminant database. *J. Microbiol. Methods* 66, 21–31.
11. Bruijn, F.J. de. *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria.* (2016) John Wiley & Sons, Inc.
12. Canganella, F., Bianconi, G., Gambacorta, A., Kato, C., and Uematsu, K. (2002). Characterisation of Heterotrophic Microorganisms Isolated from the “Grotta Azzura” of Cape Palinuro (Salerno, Italy). *Mar. Ecol.* 23, 1–10.
13. Chen, Y., Wu, L., Boden, R., Hillebrand, A., Kumaresan, D., Moussard, H., Baciu, M., Lu, Y., and Colin Murrell, J. (2009). Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *ISME J.* 3, 1093–1104.
14. Donadio, S., Monciardini, P., and Sosio, M. (2007). Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1073.
15. Engel, A.S. (2007). Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 69, no. 1, p. 187–206.
16. Engel, A.S., Lee, N., Porter, M.L., Stern, L.A., Bennett, P.C., and Wagner, M. (2003). Filamentous “Epsilonproteobacteria” Dominate Microbial Mats from Sulfidic Cave Springs. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5503–5511.
17. Engel, A.S., Porter, M.L., Stern, L.A., Quinlan, S., and Bennett, P.C. (2004). Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “Epsilonproteobacteria.” *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 31–53.

18. Finking, R., and Marahiel, M.A. (2004). Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 453–488.
19. Gomes, E.S., Schuch, V., and de Macedo Lemos, E.G. (2013). Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 44, 1007–1034.
20. Gonzalez, J.M., Portillo, M.C., and Saiz-Jimenez, C. (2006). Metabolically active Crenarchaeota in Altamira Cave. *Naturwissenschaften* 93, 42–45.
21. González, O., Ortíz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A.L., Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., and Campos-García, J. (2017). Non-ribosomal Peptide Synthases from *Pseudomonas aeruginosa* Play a Role in Cyclodipeptide Biosynthesis, Quorum-Sensing Regulation, and Root Development in a Plant Host. *Microb. Ecol.* 73, 616–629.
22. Gupta, V.K, Maria G. T., Anthonia O., Mohtashim L., (2015). Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications. John Wiley & Sons Inc.
23. Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., and Bechthold, A. (2007). Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep* 24, 162–190.
24. Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., and Peterson, S.B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 15–25.
25. Hodges, T.W., Slattery, M., and Olson, J.B. (2012). Unique Actinomycetes from Marine Caves and Coral Reef Sediments Provide Novel PKS and NRPS Biosynthetic Gene Clusters. *Mar. Biotechnol.* 14, 270–280.
26. Holmes, A.J., Tujula, N.A., Holley, M., Contos, A., James, J.M., Rogers, P., and Gillings, M.R. (2001). Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environ. Microbiol.* 3, 256–264.
27. Hose, L.D., Palmer, A.N., Palmer, M.V., Northup, D.E., Boston, P.J., and DuChene, H.R. (2000). Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst environment. *Chem. Geol.* 169, 399–423.
28. Humphreys, W.F. (1999). Physico-chemical profile and energy fixation in Bundera Sinkhole, an anchialine remiped habitat in north-western Australia. *J. R. Soc. West. Aust.* 10.
29. Hutchens, E., Radajewski, S., Dumont, M.G., McDonald, I.R., and Murrell, J.C. (2004). Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* 6, 111–120.
30. Ikner, L.A., Toomey, R.S., Nolan, G., Neilson, J.W., Pryor, B.M., and Maier, R.M. (2007). Culturable Microbial Diversity and the Impact of Tourism in Kartchner Caverns, Arizona. *Microb. Ecol.* 53, 30–42.
31. Laiz, L., Groth, I., Gonzalez, I., and Saiz-Jimenez, C. (1999). Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *J. Microbiol. Methods* 36, 129–138.
32. Luminita Vlasceanu, Serban M. Sarbu (2000). Acidic Cave-Wall Biofilms Located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiol. J.* 17, 125–139.
33. de Lurdes N. Enes Dapkevicius, M. (2013). Cave Biofilms and Their Potential for Novel Antibiotic Discovery. In *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery*, N. Cheeptham, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 35–45.
34. Macalady, J.L., Lyon, E.H., Koffman, B., Albertson, L.K., Meyer, K., Galdenzi, S., and Mariani, S. (2006). Dominant Microbial Populations in Limestone-Corroding Stream Biofilms, Frasassi Cave System, Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5596–5609.
35. Macalady, J.L., Jones, D.S., and Lyon, E.H. (2007). Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environ. Microbiol.* 9, 1402–1414.
36. Maciejewska, M., Adam, D., Martinet, L., Naômé, A., Całusińska, M., Delfosse, P., Carnol, M., Barton, H.A., Hayette, M.-P., Smargiasso, N., et al. (2016). A Phenotypic

- and Genotypic Analysis of the Antimicrobial Potential of Cultivable Streptomyces Isolated from Cave Moonmilk Deposits. *Front. Microbiol.* 7.
37. Meisinger, D.B., Zimmermann, J., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Wanner, G., Schmid, M., Bennett, P.C., Engel, A.S., and Lee, N.M. (2007). In situ detection of novel Acidobacteria in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). *Environ. Microbiol.* 9, 1523–1534.
 38. Metsä-Ketelä, M., Salo, V., Halo, L., Hautala, A., Hakala, J., Mänttä-Välijoki, P., and Ylihonko, K. (1999). An efficient approach for screening minimal PKS genes from Streptomyces. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 1–6.
 39. Northup, D.E., Barns, S.M., Yu, L.E., Spilde, M.N., Schelble, R.T., Dano, K.E., Crossey, L.J., Connolly, C.A., Boston, P.J., Natvig, D.O., et al. (2003). Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. *Environ. Microbiol.* 5, 1071–1086.
 40. Northup, D.E., Dahm, C.N., Melim, L.A., Spilde, M.N., Crossey, L.J., Lavoie, K.H., and Mallory, L.M. Diana E. Evidence for geomicrobiological interactions in Guadalupe caves. *Journal of Cave and Karst Studies* 62(2): 80-90.
 41. Northup E., Kathleen H. Lavoie, D. (2001). Geomicrobiology of Caves: A Review. *Geomicrobiol. J.* 18, 199–222.
 42. Porter, M.L., and Engel, A.S. (2008). Diversity of Uncultured Epsilonproteobacteria from Terrestrial Sulfidic Caves and Springs. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4973–4977.
 43. Porter, M., Summers Engel, A., Kane, T., and Kinkle, B. (2009). Productivity-diversity relationships from chemolithoautotrophically based sulfidic karst systems. *Int. J. Speleol.* 38, 27–40.
 44. Pronk, M., Goldscheider, N., and Zopfi, J. (2009). Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. *Hydrogeol. J.* 17, 37–48.
 45. Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., et al. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 146–167.
 46. Rusznyák, A., Akob, D.M., Nietzsche, S., Eusterhues, K., Totsche, K.U., Neu, T.R., Frosch, T., Popp, J., Keiner, R., Geletneky, J., et al. (2012). Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic herrenberg cave. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1157–1167.
 47. Sahl, J.W., Fairfield, N., Harris, J.K., Wettergreen, D., Stone, W.C., and Spear, J.R. (2010). Novel Microbial Diversity Retrieved by Autonomous Robotic Exploration of the World’s Deepest Vertical Phreatic Sinkhole. *Astrobiology* 10, 201–213.
 48. Sánchez-Gómez, S., Ferrer-Espada, R., Stewart, P.S., Pitts, B., Lohner, K., and Martínez de Tejada, G. (2015). Antimicrobial activity of synthetic cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferricin against *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cultures and biofilms. *BMC Microbiol.* 15.
 49. Sanchez-Moral, S., Canaveras, J.C., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C., Bedoya, J., and Luque, L. (2003). Biomediated Precipitation of Calcium Carbonate Metastable Phases in Hypogean Environments: A Short Review. *Geomicrobiol. J.* 20, 491–500.
 50. Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., and Rölleke, S. (2002a). Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Environ. Microbiol.* 4, 392–400.
 51. Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Pinar, G., Lubitz, W., and Rölleke, S. (2002b). Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 7–11.
 52. Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., and Rölleke, S. (2002c). Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Environ. Microbiol.* 4, 392–400.

53. Shabarova, Tatiana (2013). Life in subsurface pools: Insight into microbial diversity and dynamics in the endokarst environment., University of Zurich, Faculty of Science.
54. Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 285–295.
55. Snider, J., Goin, C., Miller, R., Boston, P., and Northup, D. (2009). Ultraviolet radiation sensitivity in cave bacteria: evidence of adaptation to the subsurface? *Int. J. Speleol.* 38, 11–22.
56. Song, Z., Han, Z., Lv, S., Chen, C., Chen, L., Yin, L., and Cheng, J. (. Synthetic polypeptides: from polymer design to supramolecular assembly and biomedical application. *Chem Soc Rev* 46, 6570–6599.
57. Spear, J.R., Barton, H.A., Robertson, C.E., Francis, C.A., and Pace, N.R. (2007). Microbial Community Biofabrics in a Geothermal Mine Adit. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6172–6180.
58. Spilde, M.N., Northup, D.E., Boston, P.J., Schelble, R.T., Dano, K.E., Crossey, L.J., and Dahm, C.N. (2005). Geomicrobiology of Cave Ferromanganese Deposits: A Field and Laboratory Investigation. *Geomicrobiol. J.* 22, 99–116.
59. Summers Engel, Megan L. Porter, Bri, A. (2001). Ecological Assessment and Geological Significance of Microbial Communities from Cesspool Cave, Virginia. *Geomicrobiol. J.* 18, 259–274.
60. Tomczyk-Żak, K., and Zielenkiewicz, U. (2016). Microbial Diversity in Caves. *Geomicrobiol. J.* 33, 20–38.
61. Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C., and Kolter, R. (2013). Interspecies Interactions Stimulate Diversification of the *Streptomyces coelicolor* Secreted Metabolome. *MBio* 4.
62. Uguru, G.C., Stephens, K.E., Stead, J.A., Towle, J.E., Baumberg, S., and McDowall, K.J. (2005). Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*: Activation of antibiotic-specific regulation. *Mol. Microbiol.* 58, 131–150.
63. Vargas-Straube, M.J., Cámara, B., Tello, M., Montero-Silva, F., Cárdenas, F., and Seeger, M. (2016). Genetic and Functional Analysis of the Biosynthesis of a Non-Ribosomal Peptide Siderophore in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLOS ONE* 11, e0151273.
64. Veselova, M., Kholmeckaya, M., Klein, S., Voronina, E., Lipasova, V., Metlitskaya, A., Mayatskaya, A., Lobanok, E., Khmel, I., and Chernin, L. (2003). Production of N-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria. *Folia Microbiol. (Praha)* 48, 794–798.
65. Vlasceanu, L., Popa, R., and Kinkle, B.K. (1997). Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3123–3127.
66. Zacchetti, B., Smits, P., and Claessen, D. (2018). Dynamics of pellet fragmentation and aggregation in liquid-grown cultures of *Streptomyces lividans*. *BMC Microbiology* 2011, 11:243
67. Zhao Y., Xiang S., Dai X., Yang K. (2013) A simplified diphenylamine colorimetric method for growth quantification. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5069–5077
68. Zhou, J., Gu, Y., Zou, C., and Mo, M. (2007). Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou province, southwest of China. *J. Microbiol. Seoul Korea* 45, 105–112.