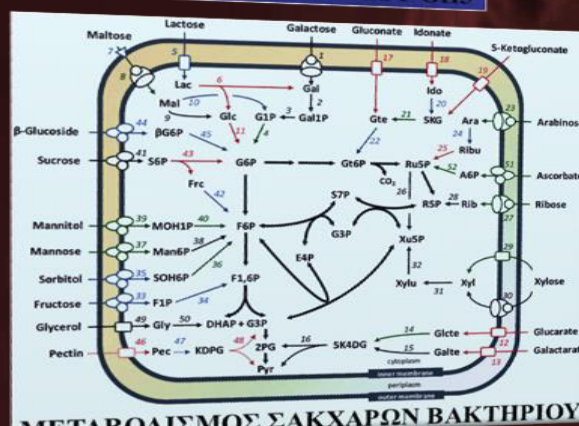
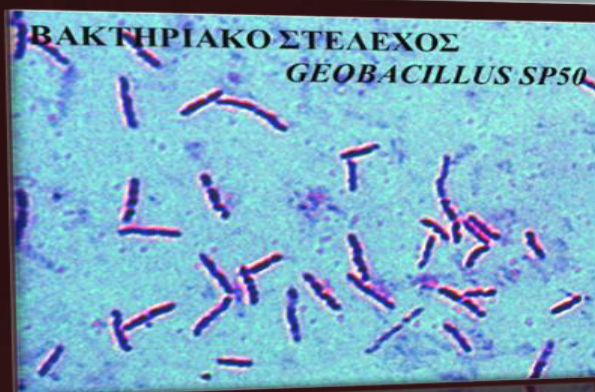
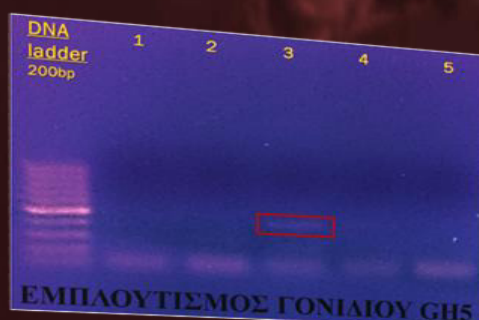




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ – ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μ.Δ.Ε. «Μικροβιακή Βιοτεχνολογία»

Συγκριτική φυσιολογική μελέτη στελεχών του γένους *Geobacillus*



Επιβλέπων Καθηγητής
Δημήτρης Γ. Χατζηνικολάου

Διπλωματική εργασία του Στυλιανού Π. Βαρασσά

ΑΜΜ: 248009

Αθήνα, Οκτώβριος 2016

Π.Μ.Σ. «ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Διπλωματική εργασία

τουφοιτητή

ΑΜΜ: 248009

Στυλιανού Π. Βαρασσά

Με θέμα :

**Συγκριτική φυσιολογική μελέτη
στελεχών του γένους *Geobacillus***

ΑΘΗΝΑ 2016

“Imagination is more important
than knowledge”

— Albert Einstein

**Στους γονείς μου και
στον αδελφό μου**

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βοτανικής - Μικροβιολογίας, του τμήματος Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων καθηγητή κ. Δημήτριο Χατζηνικολάου (Επικ. Καθηγητή), ο οποίος στάθηκε δίπλα μου με ιδιαίτερη προσοχή και συμπαράσταση, με καθοδήγησε σε όλα τα στάδια του πειράματος και συνέβαλλε τα μέγιστα ώστε η παρούσα ερευνητική εργασία να είναι πλήρης και άρτια. Παράλληλα τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υπομονή και την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ερευνητική του ομάδα για ένα μακρύ χρονικό διάστημα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναστασία Γαλανοπούλου και την Δάφνη Γεωργιάδου, οι οποίες με καθοδήγησαν με ιδιαίτερη φροντίδα κατά τη διάρκεια του ενός έτους που εργάστηκα κοντά τους στο εργαστήριο καθώς και για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές. Το ενδιαφέρον και οι παρατηρήσεις τους τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας υπήρξαν για μένα πολύτιμα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω και στα υπόλοιπα παιδιά που εργαστηρίου μας, και συγκεκριμένα στον Θανάση, την Αλεξάνδρα, και τον Γιώργο, για την άψογη συνεργασία που είχαμε καθόλη την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, αφιερώνοντας της την εν λόγω μεταπτυχιακή διατριβή, για την όλη υποστήριξη, συμπαράσταση τους προς εμένα και την πίστη τους ως προς τις δυνατότητες μου.

Αθήνα,

Οκτώβριος 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. <u>Πρόλογος</u>	4
2. <u>Περιεχόμενα</u>	5
3. <u>Περίληψη</u>	8
4. <u>Εισαγωγή</u>	9
A1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	
A2. ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	
A3. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ & ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΜΥΝΗΜΑΤΑ	
ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ	
A4. ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	
A5. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	
A6. ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	
5. <u>Υλικά και Μέθοδοι</u>	26
B1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	
B2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	
B3. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	
B4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ	
B5. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ	
B6. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ	
B7. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ	
B8. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	

- B9. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ
- B10. ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ
- B11. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ DNA
- B12. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
- B13. ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ
- B14. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗΣ GH5
- B15. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΟΥ

6. **Αποτελέσματα**.....**43**

- Γ1. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ
- Γ2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
- Γ3. ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ SP24 & SP50 ΕΝΤΟΣ
ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ΤΩΝ ΓΕΩΒΑΚΙΛΛΩΝ
- Γ4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ
- Γ5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟ-ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ
- Γ6. ΕΥΡΕΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
- Γ7. ΕΥΡΕΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ pH ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
- Γ8. ΕΥΡΕΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ NaCl ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΥΠΟ
ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
- Γ9. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SP50 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ
ΑΝΘΡΑΚΑ
- Γ10. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ SP24 & SP50
ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ
- Γ11. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SP50 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ
ΑΖΩΤΟΥ

- Γ12. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ
ΓΕΩΒΑΚΙΛΛΩΝ
- Γ13. ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ 16S rDNA ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ
- Γ14. ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΕΝΔΟ-ΓΛΟΥΚΑΝΑΣΗΣ CelA/GH5
ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SP50
- Γ15. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗΣ GH5
- Γ16. ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ GH5 ΤΟΥ *GEOBACILLUS*
SP50
- Γ17. ΕΡΕΥΣΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ Km ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ GH5
- Γ18. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΗΝ
ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ GH5
- Γ19. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ GH5
- Γ20. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΜΕΝΩΝ
ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ

7. <u>Συζήτηση</u>	102
8. <u>Βιβλιογραφία</u>	106

Συγκριτική μελέτη στελεχών του γένους *Geobacillus*

Πριν περίπου δύο δεκαετίες, η επιστημονική κοινότητα άρχισε να χρησιμοποιεί πιο εντατικά στελέχη του γένους των γεωβακίλλων, αφού είναι σε θέση τα συγκεκριμένα βακτήρια να παράγουν από διάφορα ένζυμα μέχρι βιοκαύσιμα. Στην συγκεκριμένη διπλωματική διατριβή, μελετήθηκαν δύο στελέχη γεωβακίλλων, του κλάδου «kaustophilus», τα *Geobacillus* *sp24* & *sp50*, ώστε να πραγματοποιηθεί μία συγκριτική μελέτη στα στελέχη αυτά, τα οποία έχουν συλλεχθεί από την περιοχή της Νέας Καμένης στην Σαντορίνη. Στόχος λοιπόν είναι η πληρέστερη κατανόηση της φυσιολογίας των δύο αυτών βακτηρίων, και συγκεκριμένα του στελέχους *sp50*, που πέρα από την παραγωγή ξυλανασών, έχει και κυτταρινολυτική ικανότητα, κάνοντας το σχεδόν μοναδικό, αφού βιβλιογραφικά ελάχιστα στελέχη του γένους *Geobacillus* έχει βρεθεί ότι παράγουν κυτταρινάσες. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος του *Geobacillus* *sp50*, σε συνδυασμό με διάφορα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της μεταπτυχιακής αυτής διπλωματικής εργασίας, δείχνουν πως το συγκεκριμένο βακτήριο έχει μεγάλη βιοτεχνολογική σημασία για την παραγωγή ενέργειας (βιοκαυσίμων) από διάφορες ανανεώσιμες πηγές.

Επιβλέποντες Καθηγητές:

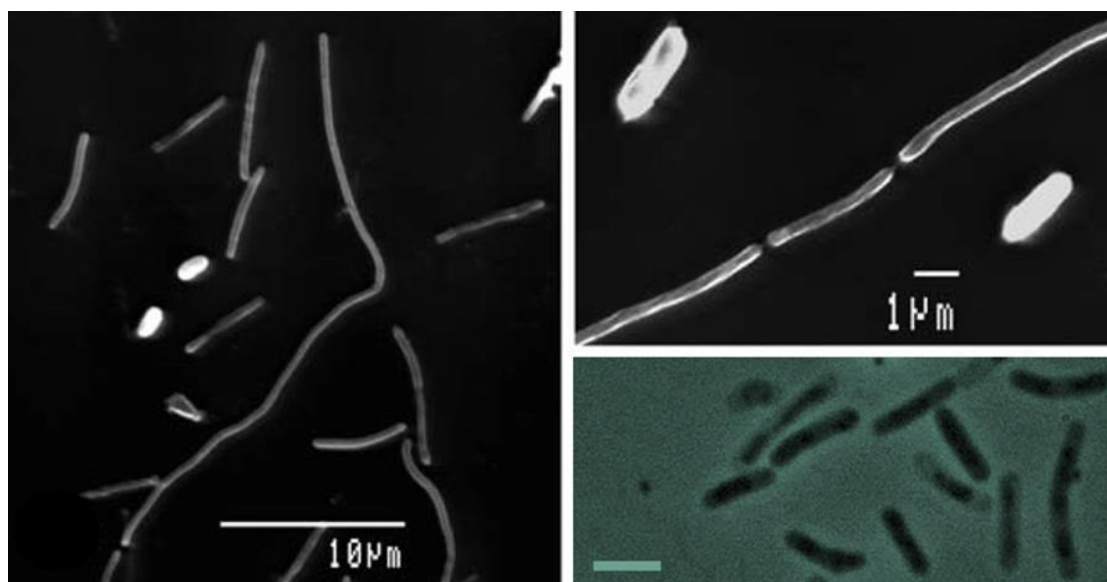
- κ. Δημήτριος Γ. Χατζηνικολάου, Επίκ. Καθηγητή (επιβλέπων)
- κα. Αμαλία Δ. Καραγκούνη-Κύρτσου, Καθηγήτρια
- κ. Βασίλειος Ν. Κουβέλης, Επίκ. Καθηγητή

Εισαγωγή

A1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα διαφορετικά είδη του γένους των γεωβακίλλων (*Geobacillus* sp) είναι θετικά κατά Gram αερόβια βακτήρια, ή δυνητικά αναερόβια, που σχηματίζουν σπόρια (**Hussein et al, 2015**). Ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των βακίλλων, και πριν το 2001, είχαν ομαδοποιηθεί ως θερμόφιλες παραλλαγές του γένους *Bacillus*, αλλά με συσσώρευση διαφόρων αποδείξεων, ομαδοποιήθηκαν εν τέλει ως μία διαφορετική υποομάδα θερμόφιλων μικροοργανισμών, που υποστηρίζεται από την ανάλυση του 16S rRNA, αναταξινομώντας τους γεωβακίλλους σε ξεχωριστό γένος (**Nazina et al, 2001**). Το πιο χαρακτηριστικό είδος του γένους των γεωβακίλλων είναι το θερμόφιλο βακτήριο *Geobacillus stearothermophilus* (Brüx et al, 2006).

Η πλειοψηφία των στελεχών του γένους των γεωβακίλλων μπορεί να αυξηθεί σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 45 έως 70 °C, ενώ μπορούν σχετικά εύκολα να απομονωθούν από διάφορες περιοχές, όπως γεωργικές εκτάσεις, ιαματικές πηγές και βαθιές γεωθερμικές τοποθεσίες. Ωστόσο, εδώ και καιρό είναι γνωστό πως οι γεωβάκιλλοι μπορούν να απομονωθούν από ένα ευρύ φάσμα ενδιαιτημάτων με σχετικά χαμηλή θερμοκρασία, όπως εύκρατα εδάφη, θαλάσσιοι τάφροι και ορεινές περιοχές. Κάποια στελέχη μάλιστα, μπορούν να αναπτύσσονται ιδιαίτερα ικανοποιητικά σε θερμοκρασίες που δεν ξεπερνούν τους 30 °C . Αυτή η παράδοση κατανομή έχει μελετηθεί πρόσφατα (**Zeigler et al, 2014**), και αποδίδεται στην ικανότητα των γεωβάκιλλων να παράγουν σπόρια.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Απεικονίζονται βακτηριακά κύτταρα και σπόρια του είδους *Geobacillus stearothermophilus* με την χρήση α) οπτικού μικροσκοπίου (πράσινο – κλίμακα 2μm) και β,γ) ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (μαύρο) (**Η εικόνα προέρχεται συνδυαστικά από Marchant and Barat, 2010; Logan, 2014**).

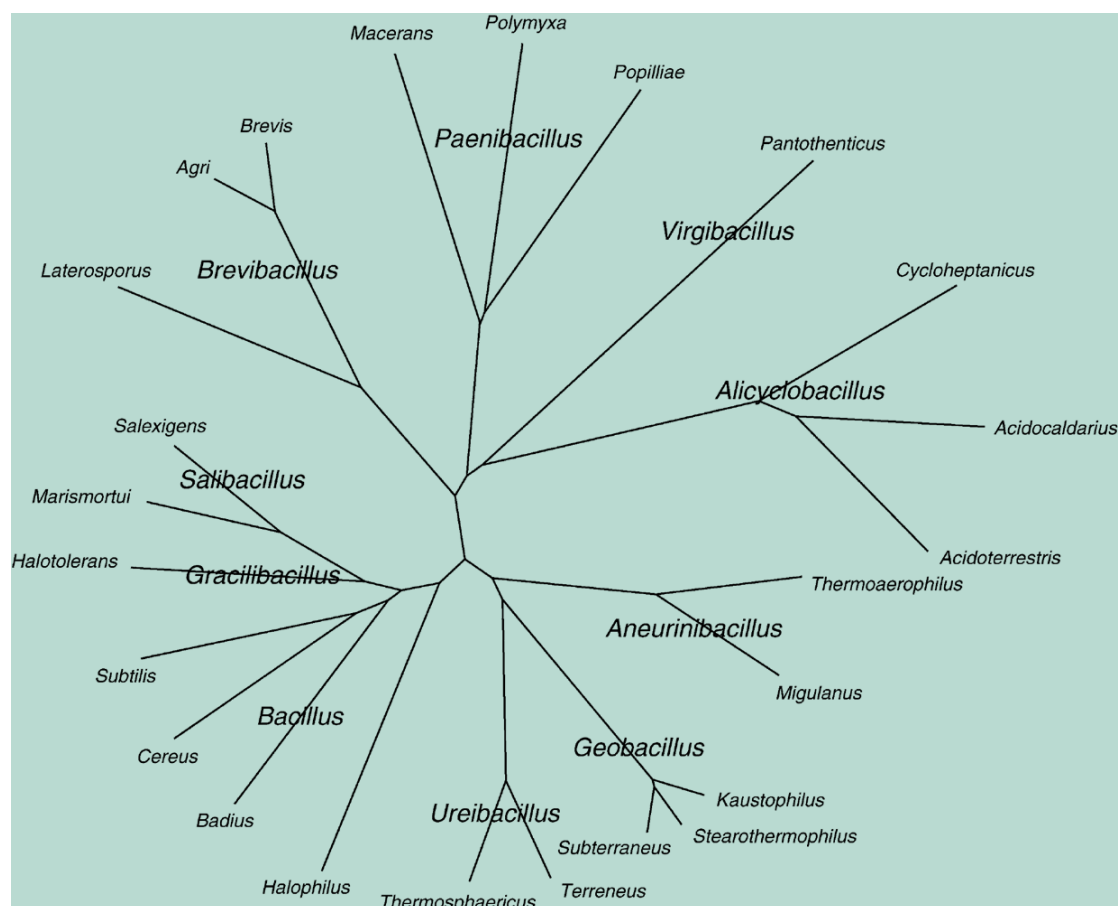
Είναι καλά τεκμηριωμένο πως τόσο το γένος *Bacillus* όσο και το *Geobacillus* μπορούν να παράγουν σπόρια, και να είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV), την αποξήρανση και τη θερμική απενεργοποίηση (**Setlow, 2006**). Επιπλέον, τα σπόρια των γεωβακίλλων όταν απελευθερωθούν στην κατώτερη ατμόσφαιρα, χάρη στο μικρό τους μέγεθος, έχουν την δυνατότητα να παραμένουν αερομεταφερόμενα για πολύ περισσότερο από ότι ένα τυπικό βακτήριο. Τα σπόρια των γεωβακίλλων έχουν διάμετρο περίπου 1 μm και μπορούν να παραμένουν στην ατμόσφαιρα σε αναστολή για μεγάλα χρονικά διαστήματα (**Burrows et al, 2009**). Η ικανότητα λοιπόν αυτή των σπορίων, να παραμένουν σε αναστολή για μεγάλες χρονικές περιόδους, αρκεί ώστε να γίνονται διηπειρωτικές «μετακινήσεις» των γεωβακίλλων, και μπορεί να εξηγήσει εύκολα την ευρεία διανομή των σπορίων των διαφόρων ειδών του γένους των γεωβακίλλων (*Geobacillus* spp.), σε περιοχές όπου είναι ανίκανα τα συγκεκριμένα βακτήρια να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν.

A2. ΦΥΛΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στην αρχή της προηγούμενης δεκαετίας, το γένος των γεωβακίλλων διαιρέθηκε σε οκτώ είδη (**Nazina et al, 2001**), βάσει συνδυασμού γονιδιακής ανάλυσης της 16S rRNA αλληλουχίας και φυσικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών. Δύο (2) ήταν τα νέα είδη που καταχωρήθηκαν ως γεωβάκιλλοι και αυτά ήταν το *Geobacillus subterraneus* και το *Geobacillus uzenensis*, ενώ έξι (6) μεταφέρθηκαν από την ομάδα 5 του γένους *Bacillus*, και συγκεκριμένα τα *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus kaustiphilus*, *Geobacillus thermoglycosidasius* και *Geobacillus thermodenitrificans*.

Στις αρχές της δεκαετίας (2011-2013), ένας σημαντικός αριθμός νέων ειδών προτάθηκαν ότι ανήκουν στους γεωβάκιλλους (Genus *Geobacillus*). Ο ερευνητής βασίστηκε κυρίως στο γονίδιο 16S rRNA, αλλά το συγκεκριμένο γονίδιο-αλληλουχία, έχει αποδειχθεί ότι ορισμένες φορές οδηγεί σε λανθασμένη ταξινόμηση, με το γονίδιο *recN* (ή με συνδυασμό των γονιδιακών αλληλουχιών 16S rRNA & *recN*) να προσφέρεται ως ένας καλύτερος φυλογενετικός δείκτης για κοντινά συγγενικά είδη (**Zeigler, 2005**). Πιο συγκεκριμένα με βάση τα 16S rRNA και *recN*, το γένος *Geobacillus* περιλαμβάνει σήμερα 11 είδη: a) *G. stearothermophilus*, b) *G. caldoxylosilyticus*, c) *G. jurassicus*, d) *G. subterraneus*, e) *G. thermoantarticus*, f) *G. thermocatenulatus*, g) *G. thermodenitrificans*, h) *G. thermoglycosidasius*, j) *G. thermoleovorans*, i) *G. toebii*, & k) *G. uzenensis* (**Logan, 2014**). Με βάση το γονίδιο *recN*, εννέα (9) αναγνωρίστηκαν διαφορετικές ομάδες με υψηλά ποσοστά bootstrap (bootstrap υποστήριξη κλάδου). Πέντε από αυτά αντιστοιχούσαν σαφώς με τα *G. stearothermophilus*, *G. toebii*, *G. caldoxylosilyticus*, *G. thermoglycosidasius* & *G. thermodenitrificans*, ενώ μία ομάδα αποτελείται μόνο από το στέλεχος (*Geo*)*Bacillus*

thermoantarticus, με τον Zeigler και την ερενητική του ομάδα να υποστηρίζει ότι πρέπει να χαρακτηριστεί ως *G. thermoglycosidasius*. Η ταξινόμηση των υπολοίπων τριών (3) ομάδων είναι λίγο αμφιλεγόμενη, με την μία από αυτές να καλύπτει τρία διαφορετικά είδη, τα *G. thermoleovorans*, *G. thermocatenulatus* & *G. kaustophilus*. Οι άλλες δύο ομάδες αποτελούνται από τα *G. subterraneus* & *G. uzenensis* (Studholme, 2014).



ΕΙΚΟΝΑ 2: Φυλόγραμμα που δείχνει τις φυλογενετικές σχέσεις των γεωβακίλλων (genus *Geobacillus*) με άλλα σχετικά γένη *Bacillus* (Marchant and Banat, 2010).

Πολλές γονιδιωματικές αλληλουχίες έχουν καταχωρηθεί από το 2004 για διάφορα είδη του γένους των γεωβακίλλων (Studholme, 2014), επιτρέποντας έτσι την ανάλυση δυνητικών μεταβολικών χαρακτηριστικών του γένους, καθώς και την μελέτη της δομής των γονιδιωμάτων. Το G+C περιεχόμενο διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών ειδών του γένους *Geobacillus*, και συγκεκριμένα το βακτήριο *G. thermoleovorans* έχει 52% ποσοστό G+C στο γονιδίωμα του, ενώ τα *G. vulcani* 53%, *G. lituanicus* 52,5%, *G. kaustophilus* 51,9%, *G. thermocatenulatus* 55%, *G. denitrificans* 48,9%, το δυνητικά αναερόβιο *G. caldxylosylitus* 44%, *G. toebii* 43,9%, & *G. thermoglucosidasius* 43,9%. Το βακτήριο *Geobacillus stearothermophilus* έχει επίσης ποσοστό G+C περίπου 43,8%, κοντά με αυτό του *G. thermoglucosidasius*, έστω αν και πιο συγγενικό είναι με το βακτήριο *G. thermodenitrificans*.

<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i>
<i>Geobacillus debilis</i>
<i>Geobacillus gargensis</i>
<i>Geobacillus jurassicus</i>
<i>Geobacillus kaustophilus</i>
<i>Geobacillus lituanicus</i>
<i>Geobacillus pallidus</i>
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Geobacillus subterraneus</i>
<i>Geobacillus tepidamans</i>
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>
<i>Geobacillus toebii</i>
<i>Geobacillus uzenensis</i>
<i>Geobacillus vulcani</i>

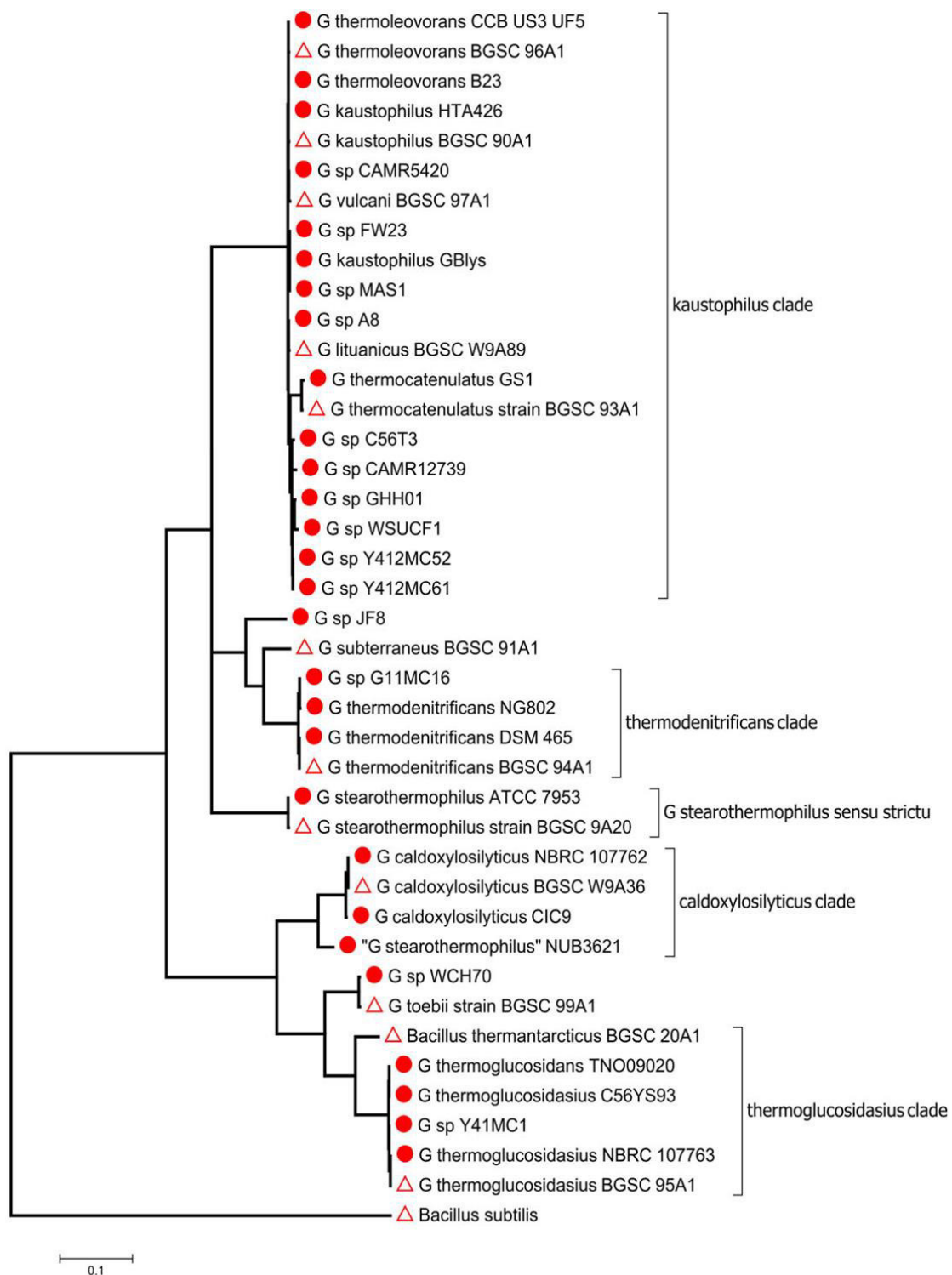
ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Παρουσίαση όλων των ταυτοποιημένων ειδών εντός του γένους των *Geobacillus* (Marchant and Barat, 2010).

Είναι γνωστό ότι τα μέλη του γένους *Geobacillus* δεν έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε G+C, σε αντίθεση με τα μεσόφιλα και θερμόφιλα ακτινοβακτήρια, ενώ έχουν γονίδια για την παραγωγή βακτηριακών «ιστόνων» (histone - like proteins), οι οποίες επιτρέπουν στο βακτηριακό χρωμόσωμα να πακετάρεται ιδιαίτερα ικανοποιητικά σε υψηλές θερμοκρασίες (55 - 75°C). Με τον τρόπο αυτό, αυξάνεται επίσης και το σημείο τήξης, T_m, του βακτηριακού DNA (Takami et al, 2003). Το μέσο μέγεθος του γονιδιώματος των γεωβακίλλων κυμαίνεται από 3,5 έως 3,9 Mbp. Τα μικρότερα γονιδιώματα έχουν βρεθεί στον κλάδο "*kaustophilus*", και τα μεγαλύτερα στον κλάδο "*thermoglucosidasius*". Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στην αναερόβια ανάπτυξη, σε περιοχές CRISPR, καθώς και σε γονίδια που υπάρχουν πιθανότατα μέσα σε μεταθετά στοιχεία, όπως συμβαίνει για το γονιδίωμα του *Geobacillus thermoglucosidasius*. Ανάλυση του αριθμού των τρανσποζασών (transposases) στα γονιδιώματα του *G. kaustophilus* HTA46 (Takami et al, 2004), *G. thermodenitrificans* NG890-2 (Feng et al, 2007), *G. thermoglucosidasius* C56-YS93 & *G. thermoleovorans* CCB_US.3_UF5 (Muhd et al, 2012), έδειξε ότι τον υψηλότερο αριθμό των IS/μεταθετών στοιχείων διαθέτουν οι γεωβάκιλλοι του κλάδου του "*kaustophilus*". Το βακτήριο *Geobacillus kaustophilus* κωδικοποιεί περίπου 95 τρανσποζάσες, εκ των οποίων οι 19 είναι συνδεδεμένες με IS-like στοιχεία (transposons), όπως ISBST12, IS654, IS5377, IS642, IS604, & IS3. Ακόμα, το *G. thermoleovorans* κωδικοποιεί 105 τρανσποζάσες σε IS στοιχεία, και συγκεκριμένα στα IS204, IS5377, IS1001, IS1096, IS1165, IS605, IS654, IS605 & IS116. Στον κλάδο "*kaustophilus*" υπάρχουν κοινά σε όλα τα στελέχη τα IS στοιχεία IS5377

& IS654 (**Hussein et al, 2015**). Στο γονιδίωμα του *G. thermodenitrificans* έχουν χαρακτηριστεί 14 τρानσποζάσες, με τις 16 από αυτές να υπάρχουν σε IS στοιχεία (IS elements): IS426 & IS605. Το γονιδίωμα του *G. thermoglucosidasius* κωδικοποιεί 41 τρानσποζάσες με σχεδόν όλες να υπάρχουν σε τρानσποζόνια (IS4, IS3, IS911, IS116, IS110, IS902, IS653). Αυτά τα 4 στελέχη έχουν επίσης αναλυθεί για την ύπαρξη CRISPR αλληλουχιών. Βρέθηκε ότι στο στέλεχος *G. thermoglucosidasius* C56_YS93, υπάρχουν στο γονιδίωμα του πολλά σχετικά μοτίβα και το συγκεκριμένο βακτήριο κωδικοποιεί πάνω από 112 CRISPR - πρωτεΐνες (Cas5, Cas6, Cst1, Cas8a1, Cas3, Cas1, Cas2, Cmr3, Cmr5, Crm2, Crm1, Csx1, Csm6, Cas4 & Csh2) (**Sorek et al, 2013**). Αντίθετα, το στέλεχος *G. kaustophilus* HTA46 κωδικοποιεί μόνο 1 χαρακτηρισμένη CRISPR - ελικάση, η οποία επίσης βρέθηκε και στο *G. thermoleovorans* CCB_US.3_UF5. Το βακτήριο *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 βρέθηκε να κωδικοποιεί την ίδια προ-αναφερθείσα CRISPR-ελικάση των στελεχών *kaustophilus/thermoleovorans*, μαζί όμως με μία ακόμα πρωτεΐνη, την Cas2.

Όσον αφορά την γονιδιωματική οργάνωση στους γεωβακίλλους, η σύγκριση στα τέσσερα καλά μελετημένα στελέχη *Geobacillus*, *G. kaustophilus* HTA46 (**Takami et al, 2004**), *G. thermodenitrificans* NG80-2 (**Feng et al, 2007**), *G. thermoglucosidasius* C56-YS93 και *G. thermoleovorans* CCB_US.3_UF5 (**Muhd et al, 2012**), δείχνει μία σημαντική αναδιάταξη της γονιδιωματικής οργάνωσης στους γεωβακίλλους, που φαίνεται να σχετίζεται με την πρώιμη απόκλιση/διαχωρισμό σε υποχρεωτικά αερόβιο και δυνητικά/προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, με την χρήση του γενετικού τύπου recN, στον κλάδο «*kaustophilus*» (*G. thermoleovorans* & *G.kaustophilus*) υπάρχει υψηλότερη διατήρηση της γονιδιωματικής οργάνωσης. Επιπρόσθετα, σύγκριση του *G. thermoglucosidasius* με το *G. kaustophilus*, παρά τις μεγάλες διαφορές που υπάρχουν στο γονιδίωμά τους, εμφανίζονται και σημαντικές ομοιότητες, κάτι που παρατηρείται και μεταξύ στα *G. thermoleovorans* & *G. thermodenitrificans*, δείχνοντας ότι παρά τη μεγάλη φυλογενετική απόσταση εντός του γένους *Geobacillus*, υπάρχει και ένας υψηλός βαθμός διατήρησης. Τέλος, η σύγκριση μεταξύ του *G. thermoglucosidasius* με το *G. thermodenitrificans* ενισχύει το επιχείρημα ότι η κύρια αναδιάταξη/διαφορά του γονιδιώματος σχετίζεται με το διαχωρισμό των αερόβιων από τα δυνητικώς αναερόβια στελέχη.

Αξίζει να σημειωθεί πως στο γονιδίωμα των διαφόρων στελεχών γεωβακίλλων, έχουν βρεθεί ενσωματωμένοι βακτηριοφάγοι. Συγκεκριμένα, προφάγοι έχουν βρεθεί στα γονιδιώματα των *G. kaustophilus*, *G. thermoleovorans*, & *G. thermodenitrificans*, αλλά δεν έχουν εντοπιστεί στο *G. thermoglucosidasius*. Στο *G. thermoleovorans*, ο προφάγος phiOH2 έχει μήκος 45,7 kb και περίπου 150 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) (**Hussein et al, 2015**). Στο *G. kaustophilus*, ο φάγος (phiLBB_P123) έχει 48 ORFs με μέγεθος 52,6 kb, αντίθετα στο *G. thermodenitrificans*



ΕΙΚΟΝΑ 3: Φυλογενετικές - εξελικτικές σχέσεις εντός του γένους *Geobacillus* (Hussein et al, 2015), με την χρήση των φυλογενετικών μεθόδων Neighbor-Joining & Maximum Parsimony. Η εξελικτική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα MEGA6 (Tamura et al, 2013; Studholme, 2014) (Τα τρίγωνα συμβολίζουν στελέχη γεωβακίλλων που έχουν αλληλουχημένο πλήρως το γονιδίωμά τους, ενώ με κύκλο αυτά που έχουν απλώς μελετηθεί ως προς τα γονίδια 16S & recN).

υπάρχει στο βακτηριακό γονιδίωμα ο ιός E2 με συνολικό μέγεθος 61 kb. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι δεν υπάρχουν κοινές αλληλουχίες προφάγων στα διάφορα στελέχη, και ότι η θέση ενσωμάτωσης τους διαφέρει στο ξενικό DNA. Η

αφθονία των αλληλουχιών CRISPR και των γονιδίων Cas που βρίσκονται στο γονιδίωμα του *G. thermoglucosidasius* θα μπορούσε να εξηγήσει την απουσία της αλληλουχίας του γονιδιώματος του προφάγου μέσα στο DNA του στελέχους (Marchant and Banat, 2010). Ακόμα, μερικά από τα στελέχη των γεωβακίλλων έχουν ένα ή περισσότερα μεγάλα πλασμίδια στο γονιδίωμά τους. Πλασμίδια τέτοιου τύπου (Mega_plasmids) έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί στα ακόλουθα στελέχη: *G. kaustophilus* HTA26 (pHTA426), *G. stearothermophilus* STK (pSTK1), *G. thermoglucosidasius* NCIMB11955 (pGTH11955-1), *G. thermoglucosidasius* C56-YS93 (pC56-YS93) & *G. thermodenitrificans* NG80 (pNG80-2).

A3. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ & ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΜΥΝΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Στελέχη γεωβακίλλων που καταγράφονται ως προαιρετικά αναερόβια ή με αναερόβιο μεταβολισμό, είναι αυτά που παράγουν μέσω ζύμωσης γαλακτικό οξύ, μυρμηκικό, οξικό οξύ, αιθανόλη και ηλεκτρικό οξύ. Ωστόσο, μερικά έχουν επίσης βρεθεί να παράγουν R,R,2,3-βουτανιοδιόλη (Xiao et al, 2012). Με βάση την παρουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν την πυροσταφυλική – μυρμηκική λυάση (PFL ή μυρμηκική ακετυλοτρανσφεράση) και το ένζυμο PFL-ενεργοποίησης, το γένος των γεωβακίλλων χωρίζεται στο σαφώς υποχρεωτικά αερόβιο σύμπλεγμα, που αποτελείται από το κλάδο «*kaustophilus*», περιλαμβάνοντας τα *G. thermoleovorans*, *G. thermocatenulatus* & *G. kaustophilus*, τον κλάδο «*denitrificans*», που περιέχει κυρίως το *G. thermodenitrificans* (που και ούτε και αυτή η ομάδα γεωβακίλλων έχει την ικανότητα ζύμωσης), και την πραγματικά «ζυμωτική» ομάδα των *G. caldoxylosylitis*, *G. toebii*, *G. thermoglucosidasius* (*thermoglucosidasius* “clade”). Ωστόσο, το βακτήριο *G. stearothermophilus* αποτελεί εξαίρεση σε αυτόν τον κανόνα, αφού το στέλεχος *G. stearothermophilus* ATCC7953, σύμφωνα με την recN ανάλυση, είναι στενά συνδεδεμένο με το στέλεχος *G. stearothermophilus* BGSC9A20 και κωδικοποιεί τα συγκεκριμένα γονίδια (PFL, PFL-activating enzyme), παρά το γεγονός ότι το είδος *G. stearothermophilus* είναι φυλογενετικά κοντά στους κλάδους «*kaustophilus*» & «*denitrificans*».

Με βάση γονιδιωματικές αναλύσεις, η ικανότητα κάποιων στελεχών των γεωβακίλλων να παράγουν βουτανιοδιόλη, χάρη στην παρουσία ενός γονιδίου που κωδικοποιεί την R,R-βουτανιοδιολική αφυδρογονάση, φαίνεται ότι βρίσκεται μόνο στα πραγματικά δυνητικά αναερόβια στελέχη γεωβακίλλων, όπως στα *G. toebii* & *G. thermoglucosidasius*, ενώ δεν υπάρχει στο *G. caldoxylosylitis*. Όλα τα είδη γεωβακίλλων διαθέτουν το ένζυμο της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Τυπικά, τα διάφορα είδη κωδικοποιούν δύο (2) ένζυμα που ευθύνονται για την παραγωγή NAD & FAD, κατά τη διάρκεια παραγωγής γαλακτικού οξέος υπό περιοριστικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, όπου η οξειδωτική φωσφορυλίωση (αναπνευστική αλυσίδα) δεν είναι σε θέση να αναπληρώσει το NADH & FADH₂ αρκετά γρήγορα

(Hussein et al, 2015). Λόγω της σχετικά χαμηλής διαλυτότητας του οξυγόνου στο φυσιολογικό εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξης των στελεχών των γεωβακίλλων, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως «αποθήκη» οξειδοαναγωγής, για να επιτρέψει τη συνέχιση του βακτηριακού μεταβολισμού. Σε στελέχη, στα οποία παρατηρείται ζύμωση, αυτό (γαλακτικό οξύ) αποτελεί την κύρια οδό ζύμωσης, καθώς «πέφτει» η ποσότητα οξυγόνου, με την οδό – μονοπάτι PFL να κυριαρχεί πλήρως υπό αναερόβιες συνθήκες (clade “*thermoglucoasidarius*”).

Προκύπτει λοιπόν το ερώτημα, αν τα διάφορα στελέχη του γένους *Geobacillus* μπορούν να αναπτύσσονται πλήρως αναερόβια. Ενώ κάποια στελέχη έχουν διακριτά λειτουργικά μονοπάτια ζύμωσης και μπορούν να καλλιεργηθούν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις κυττάρων κάτω από φαινομενικά αναερόβιες συνθήκες, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μικρή ποσότητα οξυγόνου είναι «απαραίτητη» για τη ζυμωτική ανάπτυξη του *G. thermoglucoasidarius* και την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων κυττάρων. Η ποσότητα του οξυγόνου που παρέχεται για να επιτευχθεί η υψηλή κυτταρική συγκέντρωση είναι πάρα πολύ χαμηλή για να συμμετέχει στον κεντρικό μεταβολισμό, αλλά βελτιώνει σίγουρα το ρυθμό ανάπτυξης (Tang et al, 2009). Διάφορα στελέχη γεωβακίλλων μπορούν να αναπτυχθούν εξαιρετικά γρήγορα και αερόβια σε πλούσια μέσα ανάπτυξης, με το βακτήριο *G. thermoglucoasidarius* 11955 να αυξάνεται με ρυθμούς διπλασιασμού που προσεγγίζουν τις 2 ώρες στους 65 °C, θερμοκρασία που είναι οριακά κάτω από την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους (Logan, 2014). Η αναερόβια ανάπτυξη είναι πιο αργή. Η ανάπτυξη των γεωβακίλλων μπορεί να γίνει τόσο αερόβια όσο και αναερόβια σε θρεπτικό μέσο ορυκτών αλάτων, αλλά μερικά στελέχη απαιτούν συμπλήρωση με βιοτίνη.

Τα διάφορα *Geobacillus* spp. φαίνεται πως μπορούν και διατηρούνται ικανοποιητικά κυρίως στους 60-65°C, και μάλιστα σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο. Αν και τα κύτταρα μπορούν να διατηρούνται χωρίς προβλήματα για εκτεταμένες περιόδους σε «φτωχά» θρεπτικά μέσα, τείνουν κάποιες φορές να λύνονται ως αποτέλεσμα της ταχείας έλλειψης τροφής στο περιβάλλον τους, με στόχο την επιβίωση της αποικίας (Pavlostathis et al, 2006). Αυτό το φαινόμενο, μπορεί να εξηγηθεί πιθανότατα από την ύπαρξη διαφόρων ρυθμιστικών παραγόντων, οι οποίοι οδηγούν στην βακτηριακή λύση. Όπως συμβαίνει και στους μεσόφιλους συγγενείς των γεωβακίλλων (*Bacillus subtilis*), όλα τα είδη γεωβακίλλων κωδικοποιούν την πλειονότητα των γονιδίων που ευθύνονται για την παραγωγή – δημιουργία σπορίων (Zeigler, 2014). Έτσι, αυτή η απόκριση μπορεί να συνδεθεί με την διαδικασία της σπορίωσης, ακόμα και αν η υπερβολικά ταχεία πείνα, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων από το περιβάλλον, αποτυγχάνει να παράξει βιώσιμα σπόρια. Σύγκριση των ομολόγων γονιδίων σπορίωσης στα προσδιορισμένα γονιδιώματα, δείχνει ότι στους γεωβακίλλους υπάρχουν 67 από τα 75 βασικά γονίδια που

ευθύνονται για την παραγωγή σπορίων (Galperin et al, 2012; Zeigler, 2014), με τις υπόλοιπες 8 πρωτεΐνες να μην φαίνεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες/απαραίτητες για την σπορίωση.

Αναπόσπαστο μέρος της συνολικής διαδικασίας της σπορίωσης είναι η φυσική ικανότητα των βακτηρίων του γένους *Bacillus* να μετασχηματίζονται (δηλ. της μεταφοράς γενετικού υλικού από έναν οργανισμό σε άλλον). Όπως και στην σπορίωση, έτσι και εδώ στον μετασχηματισμό, πολλά από τα γονίδια που εμπλέκονται στην διαδικασία του μετασχηματισμού είναι παρόντα και στους γεωβακίλλους (Kovacs et al, 2009). Όπως λοιπόν και στο *Bacillus cereus*, τα διάφορα είδη *Geobacillus* (με εξαίρεση το *G. caldoxylosilyticus* NBRC107762, το οποίο έχει τα ορθόλογα πρωτεϊνικά σύμπλοκα comGE & comGG), φαίνεται πως στερούνται των συμπλόκων comFB, comGE & comGG (συμμετέχουν στην πορεία του μετασχηματισμού [transformation]) (Mironczuk et al, 2008). Το στάδιο εκείνο της φυσιολογικής κατάστασης του βακτηρίου, που δίνει και τη μεγαλύτερη συχνότητα μετασχηματισμού στα κύτταρα δέκτες, ονομάζεται δεκτικότητα (competence) του μικροοργανισμού (Notani and Setlow, 1974). Οπότε, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η «φυσική» ικανότητα των *Geobacillus* spp. είναι το να είναι δεκτικά, και αυτό αποτελεί ένα ακόμη χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ομάδας βακτηρίων, χωρίς όμως οι συνθήκες αυτές να έχουν πλήρως καθοριστεί. Είναι ενδιαφέρον, πως έχει υπάρξει μία ερευνητική εργασία, όπου αναφέρεται ότι γεωβάκιλλοι μετασχηματίστηκαν φυσικά, από μόνοι τους χωρίς «επέμβαση», αλλά σαφή δεδομένα δεν έχουν δοθεί (Zhang et al, 2010).

A4. ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Σε μία πρόσφατη έρευνα (De Maayer et al, 2014),δείχθηκε ότι τα περισσότερα από τα πλήρη ή μερικώς αλληλουχημένα στελέχη των γεωβακίλλων (*Geobacillus* spp.) έχουν μία ποικιλία από γονίδια αποδόμησης – αποικοδόμησης της ημικυτταρίνης, μέσα σε ένα γονιδιωματικό νησί (gene cluster) συνήθως, αν όχι αποκλειστικά, μεταξύ του γονιδίου echD (ενοϋλο-συνένζυμο A (Co-A) υδρατάσης) και του nhr, ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μία διοξυγενάση του νιτροπροπανίου. Σύγκριση της περιεκτικότητας σε G+C μεταξύ των γονιδίων στο γενωμικό νησί (genomic island) και του υπολοίπου βακτηριακού γονιδιώματος στους γεωβακίλλους, δείχνει ότι το νησί αποκτήθηκε από έναν οργανισμό με χαμηλή περιεκτικότητα σε G+C, και αυτό συνέβη σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητα γεγονότα σε διαφορετικά στελέχη.

Με βάση την εκτεταμένη έρευνα για την αποδόμηση της ημικυτταρίνης (υδρόλυση πολυσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών) στο γεωβάκιλλο *G. stearothermophilus* T6 (Alalouf et al, 2011; Salama et al, 2012; Shulami et al, 2012; Tabachnikov and

Shoham, 2013), η ταυτοποίηση των ορθόλογων γονιδίων σε διάφορα στελέχη δείχνει ότι τόσο η ίδια η αλληλουχία των γονιδίων όσο και η διάταξη τους μέσα στο γονιδιωματικό νησί (gene order – συνταϊνικότητα) είναι εξαιρετικά μεταβλητή. Από μελέτες προκύπτει ότι τα διάφορα στελέχη γεωβακίλλων εκκρίνουν πλήρως ένα μικρό αριθμό υδρολασών (**Lynd et al, 2002**), που αποικοδομούν συνήθως μη-κρυσταλλικά πολυμερικά υποστρώματα, παράγοντας μικτού μήκους ολιγοσακχαρίτες (ολιγομερή), που έπειτα είναι σε θέση να μεταφερθούν στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου. Αυτά τα ολιγομερή [πολυμερή σακχάρων εξόζης (γλυκόζης) ή πεντόζης (ξυλόζης)] στη συνέχεια υδρολύονται περαιτέρω προς τα μονομερή τους, από μη-εκκρινόμενες υδρολάσες (π.χ. ξυλοσιδάσες, ενδοξυλανάσες, γαλακτοσιδάσες, γλυκουρονιδάδες, φερουλοϋλ-εστεράσες, γλυκοσιδάσες, εξωγλυκανάσες, ενδογλυκανάσες κ.τ.λ.) στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτή η καταβολική στρατηγική αποκαλύπτει μία αξιοσημείωτη απόδοση του μεταβολισμού των γεωβακίλλων, χρησιμοποιώντας ένα ελάχιστο αριθμό εκκρινόμενων ενζύμων, και την αυξημένη «εξοικονόμηση» ενέργειας του κυττάρου μέσω της μεταφοράς ολιγομερών και όχι μονομερών, με την μετέπειτα εσωτερική τους υδρόλυση.

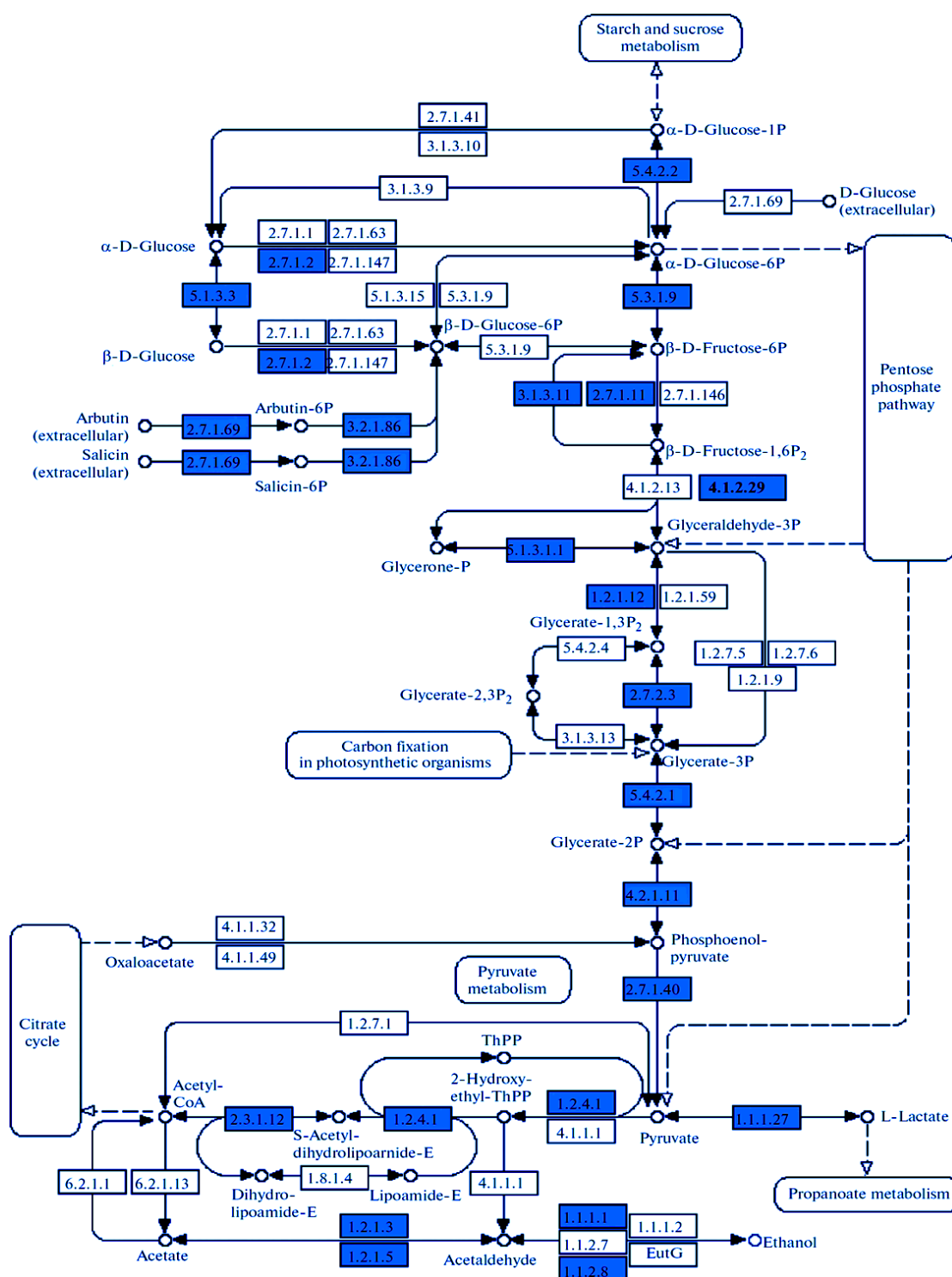
Δεν υπάρχουν ενδείξεις για πραγματική κυτταρινολυτική δραστηριότητα (ικανότητα αποικοδόμησης της κρυσταλλικής κυτταρίνης) σε *Geobacillus* spp., αν και εξωκυτταρικά ένζυμα, που φαίνεται να έχουν δραστικότητα ενδογλυκανάσης (μάλλον χαμηλής εξειδίκευσης cellulases GH5) (**Aspeborg et al, 2012**), έχουν ανιχνευθεί. Ωστόσο, οι ξυλανάσες GH10 εκκρίνονται από πολλά στελέχη (**Blazs et al, 2013; Liu et al, 2013**) και οι GH43_ενδο-α,1,5-αραβινανάσες από πολύ λιγότερα (**Shulami et al, 2011; De Maayer et al, 2014**). Στο στέλεχος *G. stearothermophilus* T6, το γενωμικό «νησί» κωδικοποιεί 13 γονιδιακές ομάδες (gene clusters), που έχουν μήκος 76,1 kb (**De Maayer et al, 2014**). Ένα σύμπλεγμα (cluster) περιλαμβάνει το γονίδιο της ξυλανάσης, που μεταγράφεται μαζί με το γονίδιο του μεταφορέα (transporter) των ξυλοολιγοσακχαριτών, ενώ ακολουθούν άλλες δύο ομάδες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση των ξυλοολιγοσακχαριτών, και για την μετέπειτα χρήση της ξυλόζης. Το συγκεκριμένο στέλεχος είναι επίσης ικανό να αποικοδομεί την πηκτίνη, χάρη το gene cluster της αραβινάνης, το οποίο περιλαμβάνει το γονίδιο *abnA*, που κωδικοποιεί την GH43-α,1,5-αραβινάση, και το γονιδιακό «σύμπλεγμα» *abnEFG*, το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταφορέα αραβινοσακχαριτών. Ακόμα, κωδικοποιεί πρωτεϊνικά σύμπλοκα για τον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό της αραβινοφουρανόζης (*abnF* – κωδικοποιεί μία αραβινοφουρανοσιδάση), μεταφορείς αραβινόζης και ένζυμα για τον μεταβολισμό της αραβινόζης.

Οι κύριες εμπορικές α-αμυλάσες προέρχονται από το *Bacillus amyloliquefaciens* και το *Bacillus licheniformis* και είναι ιδιαίτερα θερμοσταθερές (Termamyl, μία

τροποποιημένη εκδοχή του ενζύμου αμυλάση του *B. licheniformis*, που είναι ενεργή στους 110°C (Nielsen and Borchert, 2000). Επομένως, δεν είναι τυχαίο ότι πολλά στελέχη των γεωβακίλλων παράγουν επίσης α-αμυλάσες, με εξαιρετική θερμοσταθερότητα (Suvd et al, 2001; Offen et al, 2015). Οι α-αμυλάσες έχουν την τάση να διασπούν στο άμυλο, διασπώντας τους 1,4 δεσμούς, αλλά για πλήρη διάσπαση του τελευταίου, απαιτείται ένζυμο που διασπά και τους 1,6 δεσμούς. Στην εμπορική αποδόμηση του αμύλου, η κατεργασία του γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες, χρησιμοποιώντας α-αμυλάση και μυκητιακές γλυκοαμυλάσες. Ακόμα, κάποιοι γεωβάκιλλοι πέρα από α-αμυλάσες, παράγουν και άλλα ένζυμα αποικοδόμησης (διάσπασης) των 1,4 και 1,6 δεσμών του αμύλου. Αυτά ανήκουν σε μία νέα κατηγορία, γνωστά και ως νεοπουλουανάσες (neopullulanases), διασπώντας αμφότερα 1-4 & 1-6 δεσμούς (Kuriki et al, 1988; Takata et al, 1992; Lee et al, 2002).

Πρέπει να σημειωθεί πως οι γεωβάκιλλοι έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν αλειφατικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες ως πηγή άνθρακα. Ακόμα, κάποια στελέχη μπορούν να μετασχηματίζουν διάφορες ενώσεις στεροειδών, αλλά το γεγονός δεν έχει μελετηθεί συστηματικά. Ένα κοινό σε πολλά βακτήρια οπερόνιο αποδόμησης αλκανίων είναι το alkBFGHJKL (Weutzel et al, 2007), με το πρώτο ORF να κωδικοποιεί μία μεμβρανο-συνδεόμενη αλκανιο-μονοοξυγενάση την alkB, η οποία είναι ενεργή-λειτουργική για μεσαίου μήκους αλκάνια (C6-C18). Μία alkB ομόλογη πρωτεΐνη έχει εμπλουτιστεί – ενισχυθεί με PCR από το βακτηριακό στέλεχος *G. thermoleovorans* T70, και φαίνεται να επάγεται η λειτουργία της από την παρουσία ή όχι δεκαεξανίων στο μείγμα των αλκανίων που υπάρχουν στο περιβάλλον καθώς και μεγαλύτερων σε μέγεθος αλκανίων (Marchant et al, 2006). Μέχρι σήμερα, alkB ένζυμα (ομόλογα) έχουν βρεθεί στο γεωβάκιλλο *Geobacillus* sp. MH-1 (Liu et al, 2009), και στο *Geobacillus subterraneus* K (Korshunova et al, 2011), καθώς επίσης και ένα ένζυμο που διασπά εντεκάνια (11-alkane), που έχει απομονωθεί από συγκεκριμένα στελέχη γεωβακίλλων (Tourova et al, 2008). Το *Geobacillus denitrificans* NG80-2 έχει επίσης δειχθεί ότι αναπτύσσεται παρουσία αλκανίων μακράς αλυσίδας (C15-C36), χρησιμοποιώντας μία πλασμιδιακή μονοοξυγενάση, την LadA. Σαφώς και η ικανότητα τους να μεταβολίζουν πολύ μεγάλους σε αριθμό ανθράκων υδρογονάνθρακες ενισχύεται από την παρουσία υψηλών θερμοκρασιών, οι οποίες επιτρέπουν στο υδρογονανθρακικό υπόστρωμα να βρίσκεται σε πιο διαλυτή υγρή μορφή. Παρόλο που το ένζυμο LadA αρχικά θεωρούταν ότι ήταν εξωκυτταρικό και ότι λειτουργούσε χωρίς συμπαράγοντες, σήμερα είναι γνωστό ότι περιέχει ένα μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης (FMN) και ότι απαιτεί για την ενεργοποίηση του μία NADPH-εξαρτώμενη FMN αναγωγή. Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου LadA του *G. thermodenitrificans* NG80-2 έχει διευκρινιστεί σε σύμπλεγμα κρυστάλλων με το FMN (Wang et al, 2006; Feng et al, 2007; Li et al, 2008). Γονίδια LadA έχουν περιγραφεί στα *G. thermoleovorans* B23,

Geobacillus sp. GHH01, G11MC16, Y6, 1MC1 & *G. thermoglycosidasius* C56-Y593 (Boonmak et al, 2014). Στα παραπάνω στελέχη, τα γονίδια *LadA* υπάρχουν σε οπερόνια μαζί με το γονίδιο που κωδικοποιεί την αναγωγή FMN.



EIKONA 4: Μονοπάτι γλυκόλυσης από την βάση δεδομένων KEGG, που περιγράφει την διαδικασία στο γένος *Geobacillus*. Συγκεκριμένα το ενζυμικό μονοπάτι αναφέρεται στο είδος *Geobacillus stearothermophilus* (Lee et al, 2010; He et al, 2014; Rozanov et al, 2014).

Οι γεωβάκιλλοι έχουν επίσης τη δυνατότητα να μεταβολίζουν και αρωματικές ενώσεις, έχοντας πρωτομελετηθεί από τα μέσα της δεκαετίας του 1970, όπου βέβαια αναφέρονταν ως θερμόφιλα *Bacillus* spp. (Buswell and Twomey, 1975). Από τότε διάφορα στελέχη *Geobacillus* spp. με δυνατότητα αποικοδόμησης φαινόλης έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί, συμπεριλαμβανομένου των *G. stearothermophilus* DSM 6285 (Omokoko et al, 2008) & *G. thermoglucosidasius* A7 (Duffner et al, 2000). Το μονοπάτι αποικοδόμησης της φαινόλης στο βακτήριο *G. stearothermophilus* DSM 6285, κωδικοποιείται από DNA μήκους 20,2 kb, περιέχοντας 15 ORFs, που βρίσκονται σε ένα πλασμίδιο (megaplasmid) χαμηλής αντιγραφικότητας (Omokoko et al, 2008). Συγκεκριμένα, κάποια από τα γονίδια που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της φαινόλης είναι η φαινολική υδροξυλάση (PheA) (Kirchner et al, 2003), η κατεχολική-2,3-διοξυγενάση, η αφυδρογονάση της ακεταλδεϋδης κ.τ.λ. (Duffner et al, 2000; Omokoko et al, 2008). Το ORF pheR φαίνεται να κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη – μεταγραφικό παράγοντα του μεταβολισμού της φαινόλης (Omokoko et al, 2008). Πολλά στελέχη των γεωβακίλλων μπορούν επίσης να μεταβολίζουν το βενζόλιο και άλλους πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως τα *G. thermodenitrificans*, *G. caldoxylosylitis*, *G. toebii* & *G. oleovorans* (Marchant et al, 2002). Όλοι οι γεωβάκιλλοι μεταβολίζουν τους υδρατάνθρακες τόσο με την γλυκόλυση όσο και με το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (Hussein et al, 2005). Δεν υπάρχει το μονοπάτι Entner – Doudoroff στους γεωβακίλλους, όπως στους αρχαίους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (Liu et al, 2008), λόγω έλλειψης του ενζύμου φωσφογλυκονική αφυδατάση (Alm et al, 2005; Tang et al, 2007). Ο κύκλος του Krebs (TCA) υφίσταται κανονικά στα διάφορα *Geobacillus* spp (Tang et al, 2009).

A5. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι γεωβάκιλλοι έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν εμπορικά αξιοποιήσιμα ένζυμα, όπως αμυλάσες και ημικυτταρινάσες, με απότοκο τα διάφορα στελέχη *Geobacillus* sp. να γίνονται αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης. Όσον αφορά την μεταβολική μηχανική για την παραγωγή καυσίμων και διαφόρων χημικών προϊόντων, η πιο ευρέως μελετημένη βιοτεχνολογική εφαρμογή των γεωβακίλλων είναι η ζύμωση για την παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς, μία προσπάθεια που έχει εστιαστεί κυρίως στο γεωβάκιλλο *G. thermoglucosidasius*. Η ανάπτυξη στους 60 – 70°C διευκολύνει την συνεχή απομάκρυνση των πτητικών προϊόντων της ζύμωσης (π.χ. το σημείο ζέσεως της αιθανόλης είναι στους 78 °C), ενώ αποφεύγεται η υπερβολική φθορά του μηχανολογικού εξοπλισμού (Cripps et al, 2009). Επιπλέον, οι υψηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης των συγκεκριμένων μικροοργανισμών μειώνουν πιθανά προβλήματα μόλυνσης από μολυσματικούς μεσόφιλους παράγοντες. Ιδιαίτερα, η

ικανότητα τους να αποικοδομούν και να υποβαθμίζουν ένα ευρύ φάσμα των ολιγομερών υδατανθράκων, τους διακρίνει από άλλα βακτήρια.

Η βιοαιθανόλη (C_2H_5OH) είναι πλέον ένα καθιερωμένο βιοκαύσιμο, που αποτελεί το αντικείμενο εμπορικής παραγωγής πρώτης γενιάς (σακχαρόζη από ζαχαροκάλαμο και γλυκόζη από καλαμπόκι/σίτος) αλλά και πιο πρόσφατα δεύτερης γενιάς προϊόν (λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες). Επιπρόσθετα, παρά την αξία της ως καύσιμο υψηλών οκτανίων, έχει εκτεταμένες δευτεροταγείς εφαρμογές (π.χ. αιθυλένιο, ανώτερες αλκοόλες). Η ίδια η αιθανόλη είναι βιοαποικοδομήσιμη και έχει χαμηλή τοξικότητα, προκαλώντας μικρή περιβαλλοντική ρύπανση (**Hansen et al, 2005**). Στις Η.Π.Α., πρώτης γενιάς παραγόμενη αιθανόλη έχει πλέον κορεσμένη ζήτηση για ένταξη στο 10% των αμερικανικών υγρών καυσίμων (**Bajpai, 2013**). Η αιθανόλη είναι ένα φυσικό, αλλά όχι το κύριο προϊόν της δυνητικά αναερόβιας ζύμωσης των γεωβακίλλων. Μετά από την απενεργοποίηση του βιοχημικού μονοπατιού του L - γαλακτικού οξέος, ήταν αναμενόμενο ότι τα προϊόντα της ζύμωσης θα καθορίζονταν από το εναπομείνοντα μονοπάτι PFL (**Eram and Ma, 2013**). Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (Pdh) είναι ακόμα ενεργή υπό αναερόβιες συνθήκες, όπως και στο βακτήριο *Bacillus subtilis* (**Tang et al, 2013**). Με απενεργοποίηση και του μονοπατιού PFL και αυξορρυθμιζόμενη έκφραση του γονιδίου Pdh, η παραγωγή της αιθανόλης αυξάνεται σημαντικά (**Cripps et al, 2009**). Οι υψηλές αποδόσεις αιθανόλης με την χρήση γλυκόζης ως πηγής άνθρακα, επιτεύχθηκαν με μία τριπλή "μετάλλαξη" (Δldh , $\Delta prfB$ και pdh^*up) στο στέλεχος *G. thermoglucosidasius* TM242 (**Cripps et al, 2009; Taylor et al, 2009**). Μία εναλλακτική οδός για την αύξηση της παραγωγής της αιθανόλης είναι μέσω της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (Pdc, EC 4.1.1.1), με την χρήση της μεταβολικής πορείας ζύμωσης από τον *Saccharomyces cerevisiae* και τα βακτήρια *Zymomonas mobilis* & *Zymobacter palmae*. Το ένζυμο Pdc καταλύει την μη - οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακεταλδεΐδη, η οποία στην συνέχεια μετατρέπεται σε αιθανόλη με αλκοολική αφυδρογονάση (Adh, EC 1.1.1.1). Μέχρις στιγμής ένα Pdc ένζυμο θερμόφιλης προέλευσης δεν έχει αποκαλυφθεί, και ετερόλογη έκφραση των δύο PDC πρωτεϊνών από τα βακτήρια *Z. mobilis* & *Z. palmae* στο γεωβάκιλλο *G. thermoglucosidasius* δεν καταλήγει σε λειτουργική δραστηριότητα του ενζύμου σε θερμοκρασίες άνω των 55 °C (**Thompson et al, 2008**). Ακόμα, βιοσύνθεση ισοβουτανόλης καταγράφηκε σε υψηλές θερμοκρασίες, και παράχθηκαν 3,3 g/L ισοβουτανόλης από γλυκόζη στους 50°C, ενώ οι τιμές από την κατανάλωση κελλοβιόζης ήταν χαμηλότερα, στα 0,6 g/L ισοβουτανόλης (**Lin et al, 2014**). Αυτό επιτεύχθηκε με την υπερέκφραση των γονιδίων, που κωδικοποιούνται από το στέλεχος *G. thermoglucosidasius* DSM2542.

Σχετικά με τα ένζυμα για βιοκατάλυση, αρχικά οι πρωτεάσες έχουν μία μακρά ιστορία στις βιομηχανικές διεργασίες, όπως η επεξεργασία δερμάτων, εκτός από τα

απορρυπαντικά, σύνθεση πεπτιδίων, εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων, καθώς και διάφορες άλλες εφαρμογές της βιοτεχνολογίας (Haki and Rakshit, 2003). Οι θερμοσταθερές πρωτεάσες έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από ένα αριθμό μεγάλο αριθμό γεωβακίλλων με βάση γονιδιωματικές αναλύσεις (Hawumba et al, 2002; Chen et al, 2004; Zhu et al, 2007; Iqbal et al, 2015). Ακολουθούν οι καρβοξυλεστεράσες και οι λιπάσες. Και οι δύο, καρβοξυλεστεράσες (E.C 3.1.1.1) και λιπάσες (E.C. 3.1.1.3), καταλύουν την υδρόλυση των εστέρων καρβοξυλίου (Jaeger et al, 1999). Οι λιπάσες έχουν μία προτίμηση στα αδιάλυτα στο νερό υποστρώματα και υδρολύουν τα τριγλυκερίδια μακράς αλυσίδας (Bornscheuer et al, 2002). Οι λιπάσες χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη βιομηχανία καλλυντικών, για τη σύνθεση εστέρων που βελτιώνουν την εμφάνιση και την ολίσθηση των προϊόντων προσωπικής φροντίδας (Ansorge-Schumacher and Thum, 2013). Στη βιομηχανία τροφίμων, οι λιπάσες συμμετέχουν σε μεγάλο βαθμό στην παρασκευή τυριού, και στην σύνθεση των εστέρων στην ζάχαρη (Khanniri et al, 2015). Μέχρι σήμερα, θερμοσταθερές λιπάσες έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από γεωβάκιλλους, όπως το *G. thermodenitrificans* IBRL-EPA (Balan et al, 2012). Σε αντίθεση με τις λιπάσες, οι καρβοξυλεστεράσες καταλύουν την διάσπαση εστερικών δεσμών σε μικρού μήκους αλυσίδες (μικρότερες από 8C), με προτίμηση υδατοδιαλυτά υποστρώματα (Panda and Gowrishankar, 2005). Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί θερμοσταθερές καρβοξυλεστεράσες από πληθώρα γεωβακίλλων, όπως τα βακτήρια *G. stearothermophilus* ATCC12980 & ATCC7954 (Abdelal and Lu, 2004), *G. thermoleovorans* YN (Soliman et al, 2014), *G. thermodenitrificans* T2 (Yang et al, 2013), *G. thermodenitrificans* CMB-A2 (Charbonneau et al, 2010), *G. kaustophilus* HTA426 (Montoro-Garcia et al, 2009). Επιπλέον, μία υποοικογένεια καρβοξυλεστερασών έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη βιομηχανία βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς, καθώς περιλαμβάνει τις εστεράσες acetylxytan (ακετυλοξυλάνης) (EK 3.1.1.72), οι οποίες υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς των ομάδων ακετυλίου από τις ομάδες ξυλόξης στο πολυμερές της ξυλάνης. Μελέτες έχουν δείξει ότι η εισαγωγή των acetylxytan εστερασών σε μείγματα ημικυτταρίνης, βελτιώνει την προσβασιμότητα των ξυλανασών στο σκελετό της ξυλάνης (Zhang et al, 2011).

Άλλα ένζυμα με βιοτεχνολογική σημασία είναι η ισομεράση της L-αραβινόζης και οι φωσφορυλάσες νουκλεοσιδίου πυριμιδίνης. Πιο αναλυτικά, η ισομεράση της L-αραβινόζης μετατρέπει την D-γαλακτόζη σε D-ταγκαρόζη (Seo, 2013), και η τελευταία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο γλυκαντικό προϊόν για δίαιτα και για την βελτίωση του διαβήτη του. Μία άλλη οικογένεια ενζύμων με μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον είναι οι φωσφορυλάσες νουκλεοσιδίου πυριμιδίνης, που με την παρουσία φωσφορικών ιόντων, καταλύουν την αναστρέψιμη διάσπαση του γλυκοσιδικού δεσμού των νουκλεοσιδίων πυριμιδίνης ή άλλων παρόμοιων παραγώγων. Στην πραγματικότητα οι PyNPs δεν κάνουν

διακρίσεις ανάμεσα στην ουριδίνη και στη θυμιδίνη, και δέχονται και τις δύο αυτές ενώσεις ως φυσικά της υποστρώματα, καθιστώντας αυτές τις πρωτεΐνες κατάλληλες ως βιοκαταλύτες για ενζυματική σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοτιδίων (**Vander-Heiden, 2011**). Αυτά τα ανάλογα νουκλεοτιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως "φάρμακα" για την αντιμετώπιση καρκινικών όγκων, καθώς και ως φαρμακευτικοί παράγοντες για την θεραπεία ιογενών λοιμώξεων (**De Clercq, 2011**).

Τέλος, όσον αφορά την αποικοδόμηση διάφορων περιβαλλοντικών ρύπων, λόγω της αύξησης των επιπέδων της περιβαλλοντικής ρύπανσης, έχει υπάρξει μία συντονισμένη προσπάθεια για να ανακαλυφθούν μικροοργανισμοί για την απομάκρυνση και εξουδετέρωση οργανικών ρύπων, ως ένας αποτελεσματικός και οικονομικός τρόπος περιβαλλοντικής εξυγίανσης - απορύπανσης (**Megharaj et al, 2011**). Η φαινόλη και οι φαινολικές ενώσεις αντιπροσωπεύουν μία από τις μεγαλύτερες ομάδες περιβαλλοντικών ρύπων, που οφείλονται σε ευρείες εφαρμογές διάφορων αντιβακτηριακών και αντιμυκητιακών παραγόντων. Η ικανότητα του γένους των γεωβακίλλων να μεταβολίζουν αρωματικές ενώσεις περιγράφηκε στις αρχές τις προηγούμενης δεκαετίας (**Feitkenhauer et al, 2003**). Αξίζει να σημειωθεί πως οι γεωβάκιλλοι μπορούν να υποβαθμίζουν αλκάνια, και μάλιστα μακράς αλυσίδας (**Feng et al, 2007**), ενώ είναι σε θέση να αποδομούν και το ακρυλαμίδιο, καθώς έχει βρεθεί πως οι ενώσεις του είναι νευροτοξικές, γενοτοξικές και πιθανώς καρκινογόνες (**Program, 2011**).

A6. ΣΤΟΧΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η πληρέστερη κατανόηση της φυσιολογίας δύο στελεχών του γένους *Geobacillus*, που προέρχονται από την περιοχή της Νέας Καμένης στη Σαντορίνη. Συγκεκριμένα, τα βακτηριακά στελέχη είναι τα *Geobacillus* sp24 και *Geobacillus* sp50. Το τελευταίο στέλεχος (sp50) έχει μεγάλη βιοτεχνολογική σημασία, αφού διαθέτει μία κυτταρινάση, κάτι το οποίο είναι σπάνιο στο γένος των γεωβακίλλων.

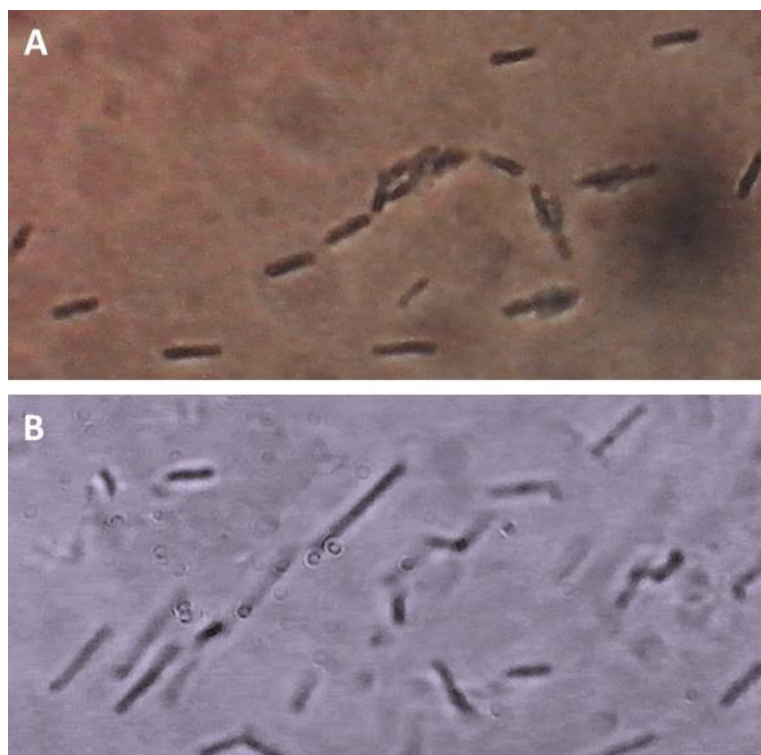
Υλικά & Μέθοδοι

B1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν είναι τα *Geobacillus sp24* και *Geobacillus sp50* (Stathopoulou et al, 2012). Τα στελέχη αυτά έχουν απομονωθεί το 2003 από την περιοχή της Νέας Καμμένης στην Σαντορίνη (Santorini, Greece, 25°25' N, 36°25' E) (Meintanis et al, 2006).

Η ταξινόμηση των συγκεκριμένων στελεχών σύμφωνα με την βάση δεδομένων NCBI είναι η εξής: *Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Geobacillus*.

Kingdom:	<i>Bacteria</i>
Phylum:	<i>Firmicutes</i>
Class:	<i>Bacilli</i>
Order:	<i>Bacillales</i>
Family:	<i>Bacillaceae</i>
Genus:	<i>Geobacillus</i>



ΕΙΚΟΝΑ 5: Άποψη των βακτηριακών στελεχών Α) *Geobacillus sp50* και Β) *Geobacillus sp24*, με χρήση οπτικού μικροσκοπίου και μεγένθυση x100 [κλίμακα: — 1μm].

B2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Πρωτόκολλο για DNA extraction:

Το πρωτόκολλο λοιπόν απομόνωσης προέρχεται από το DOE Joint Genome Institute, Bacterial genomic DNA isolation using CTAB (**Feil and Copeland, 2012**) (<http://jgi.doe.gov/user-program-info/pmo-overview/protocols-sample-preparation-information>).

B3. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η ανακαλλιέργεια των στελεχών σε τρυβλία NB (Nutrient Broth) γίνεται είτε από γλυκερόλες, είτε από τρυβλία του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους, που υπάρχουν αποθηκευμένα στους -80°C και -4°C αντίστοιχα.

B4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Για να μετρήσουμε την ποσότητα των σακχάρων (π.χ. γλυκόζη, ξυλόζη, σελλοβιόζη), εφαρμόζουμε την μέθοδο DNS. Συγκεκριμένα, το αντιδραστήριο 3,5-Dinitrosalicylic acid αντιδρά με τα αναγωγικά σάκχαρα (μονοσακχαρίτες - δισακχαρίτες), και από κίτρινο χρώμα που έχει, μετατρέπεται σε σκούρο καφέ. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 540nm.

Σύσταση DNS:

- 200ml dsH₂O
- 16g NaOH (pH=13,5)
- Διαλυτοποίηση
- 10g 3,5-Dinitrosalicylic acid
- 300g Potassium sodium tartrate tetrahydrate (triciNaK)
- dsH₂O up to 1000ml

Πρωτόκολλο χρήσης DNS:

- 100μl δείγμα καλλιέργειας
- 100μl H₂O
- 200μl DNS
- Στους 95-100°C για 5 min

- Παύση αντίδρασης με προσθήκη 1,6ml H₂O
- Συνολική Αναλογία: 1-[H₂O+Σάκχαρα δείγματος] / 1-[DNS] / 8-[dsH₂O] (1:1:8)
- Φωτομέτρηση στα 540nm για DNS
- Φωτομέτρηση στα 600nm για OD (οπτική πυκνότητα) κυττάρων [βιομάζας]

B5. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

Σε τρυβλία με μοναδική πηγή άνθρακα CMC, Avicell & Cell123 κάθε φορά, και με minimal medium (BGSC), επιστρώνουμε το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος (π.χ. sp24/sp50) και αφήνουμε τα τρυβλία σε θερμοκρασία επώασης 60°C για 24h. Μετά το πέρας το χρόνου επώασης, ρίχνουμε στο κάθε τρυβλίο 15 - 20ml της χρωστικής (Benzo) Congo_Red (disodium-4-amino-3-[4-[4-(1-amino-4-sulfonato-naphthalen-2-yl) diazenylphenyl]phenyl]diazanyl-naphthalene-1-sulfonate). Η συγκεκριμένη χρωστική βάφει την πηγή άνθρακα (δεσμούς κυτταρίνης) με κόκκινο χρώμα και δεν βάφει (κίτρινο χρώμα) την αποικοδομημένη κυτταρίνη λόγω απουσίας β-γλυκοσιδικών δεσμών. Την ύπαρξη κυτταρινολυτικών ενζύμων μπορούμε να την παρατηρήσουμε μόνο στην πηγή άνθρακα CMC (carboxy-methyl-cellulose), δηλαδή στην μερικώς άμορφη κυτταρίνη, και αυτό γιατί το πολυμερές όταν διασπάται από το ένζυμο (π.χ. CelA - GH5), αφήνει ελεύθερα -OH άκρα στην περιοχή του δεσμού που υπήρχε, με το τρυβλίο να βάφεται κίτρινο προς πορτοκαλί, αφού το αντιδραστήριο δεν μπορεί να αντιδράσει πλέον με το πολυμερές. Η κυτταρίνη Avicell είναι εντελώς κρυσταλλική, καθαρή – υψηλής ποιότητας, ενώ η κυτταρίνη Cell123 powder τελείως άμορφη. Η CMC κυτταρίνη με καρβοξυλικές ομάδες είναι πιο υδατοδιαλυτή. Πιο αναλυτικά, στο CMC το Congo_Red ενώνεται με τους β-γλυκοσιδικούς δεσμούς, βάφοντας κόκκινο, ενώ στα Avicell/Cell123 δεν αντιδρά ικανοποιητικά, με αποτέλεσμα να μη βάφει το τρυβλίο σωστά.

Πρωτόκολλο χρήσης Congo Red:

- Συγκέντρωση 1g/L χρωστικής
- Επώαση του τρυβλίου για 30' με την χρωστική
- Ξέπλυμα με NaCl 1M (1mol/L) (58g/L)
- Αφήνουμε το άλας 10', κάνοντας 2 τουλάχιστον πλύσεις

B6. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

(Παραθέτονται τα θρεπτικά μέσα στα αγγλικά)

MG Medium (Minimal Glucose Medium) - (Zeigler, 2001)

Minimal salts (below)	20ml
Agar, if desired	15g
Water	955ml
10% KOH (w/v)	0.68ml

After autoclaving, add 1 ml each of the following sterile stocks:

Nitrilotriacetic acid ^a	1.05 M
MgSO ₂ .7H ₂ O	0.59 M
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.91 M
FeSO ₂ .7H ₂ O	0.04 M

Then add to V_{final}=30ml of:

Glucose or other carbon sources, filter-sterilized 5% (w/v)

Minimal salts (do not sterilize; store refrigerated):

K ₂ HPO ₄	26.1g
KH ₂ PO ₄	11.3g
NH ₄ NO ₃	25.0g
Water	1000ml

^a**CAUTION:** Possible carcinogen. Dissolve by adding NaOH pellets directly to NTA and water, then adjust the pH to 6.5 with 1M NaOH. Filter sterilize and store at 25°C.

Basal Solid Medium - (Stathopoulou et al, 2012)

consisting of (g.L⁻¹) [pH=6.5]:

- NaNO₃, 3
- K₂HPO₄, 1
- KCl, 0.5

- CaCl_2 , 0.1
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5
- Yeast extract, 1
- Agar, 30
- trace elements solution*, 1 mL.L^{-1}
- Glucose or other carbon sources, filter-sterilized 5% (w/v)

Basal Liquid Medium - (Stathopoulou et al, 2012)

consisting of (g.L^{-1}) [pH=6,5]:

- NaNO_3 , 5
- KH_2PO_4 , 1
- K_2HPO_4 , 2
- KCl , 0.1
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5
- CaCl_2 , 0.01
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02
- yeast extract, 1
- trace elements solution*, 1 mL.L^{-1}
- Glucose or other carbon sources, filter-sterilized 5% (w/v)

Growth Medium DCS - (Shoham et al, 1993)

contained the following [pH=6,5]:

- vitamin assay Casamino Acids (Difco), 4.0 g/liter
- yeast extract, 0.2 g/liter
- MgSO_4 , 0.1 g/liter
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 g/liter
- K_2HPO_4 , 5 g/liter
- KH_2PO_4 , 5 g/liter
- D-xylose or D-Glucose or other carbon sources (autoclaved separately), 5.0 g/liter
- trace element solution, 1 ml/liter.

*The trace element solution contained the following (in grams per liter):

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.39
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.62
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.60
- MnSO_4 , 0.59
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.42
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.79
- Na_2MoO_4 , 0.70

The solution was kept at pH 2 and added after sterilization of the medium.

B7. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ

Μία συνήθης φυλογενετική ανάλυση αποτελείται από 4 βήματα:

- Στοιχίση (κατασκευή του μοντέλου και ταυτόχρονη εξαγωγή του φυλογενετικού συνόλου δεδομένων).
- Καθορισμός του μοντέλου αντικατάστασης (K2P, Kimura).
- Κατασκευή του δέντρου.
- Αξιολόγηση του δέντρου.

Με απώτερο σκοπό την παρουσίαση των φυλογενετικών σχέσεων στο γένος των γεωβακίλλων (*Geobacillus*), κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με διάφορες φυλογενετικές μεθόδους. Για την εξαγωγή αυτών των συμπερασμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρεις [3] μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης, η οποίες είναι η μέθοδος Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbor Joining), η μέθοδος της Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum parsimony), και η Μπεϊσιανή Συμπερασματολογία (Bayesian Inference).

B8. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

Οι εκκινητές (primers) είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την διεκπεραίωση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Τα μονόκλωνα αυτά ολιγονουκλεοτίδια λοιπόν, για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι αναγκαίο να έχουν μήκος από 20 έως 30 bp μέχρι 35 bp (κατά προτίμηση 30-35 ζβ). Αυτό χρειάζεται γιατί αν ο εκκινητής έχει μήκος κάτω από 18 bp μπορεί να οδηγήσει στο εμπλουτισμό μη ειδικών προϊόντων στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Το T_m των εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο των **Bolton και McCarthy** το 1962, ο οποίος αργότερα τροποποιήθηκε

από τους **Baldino** και συνεργάτες το 1989, και συγκεκριμένα για μήκη από 14 έως 70 νουκλεοτίδια: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 (\log_{10}[\text{K}^{+}]) + 0.41(\%[\text{G}+\text{C}]) - (675/\text{n})$, όπου n είναι ο αριθμός των ολιγονουκλεοτιδίων (corporate.thermofisher.com/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδιακών περιοχών 16S rDNA & CelA-GH5 στα στελέχη γεωβακίλλων *Geobacillus sp24/sp50* με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5'→3')	Μήκος (n)	T _m (°C)	Περιοχή (bp) εμπλουτισμού	Γονιδιακή περιοχή
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	20	60,1	1400	16S rDNA
1492R	CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT	20	58,7		
Geo_GH5_Bpu1102	CTA GCT CAG CCT ACT ACT CTT TGA ACA AAC	30	67,1	1000	CelA-GH5
Geo_GH5_NdeI_F	TTC CAT ATG ATG GAG CGT ACA CCA GTG GAA	30	66,8		

B9. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) συνοψίζεται στην *in vitro* ενίσχυση - εμπλουτισμό ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με την χρήση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας (**Kleppe et al, 1971; Mullis et al, 1986; Saiki et al, 1988**). Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μιμείται τη φυσική ικανότητα του κυττάρου να αντιγράφεται το DNA του χρησιμοποιώντας ένζυμα, δηλαδή τις DNA πολυμεράσες (**Saiki et al, 1986; Mullis and Faloona, 1987; Erlich, 1989; Delidow et al, 1993**). Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο είναι η DNA πολυμεράση Phusion. Είναι ιδιαίτερα θερμοσταθερή και για αυτό το λόγο είναι κατάλληλη για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση αφού δεν καταστρέφεται στην θερμοκρασία αποδιάταξης (**Schochetman et al, 1988; Mullis, 1990; Hadidi and Candresse, 2003**). Η Phusion DNA πολυμεράση (πολυμεράση συγκεκριμένης εταιρείας) έχει πολυμεριστική ικανότητα 5'→3', ενώ έχει επίσης και εξωνουκλεολυτική δράση 3'→5'. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, λοιπόν, απαιτείται το βακτηριακό DNA που θα χρησιμοποιηθεί σαν εκμαγείο για την παρασκευή αντιγράφων, η DNA πολυμεράση (Phusion DNA polymerase), ένα ζευγάρι εκκινητών με μήκος 20-30 bp, ένα μείγμα τριφωσφορικών

δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), καθώς και ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει στοιχεία που βελτιστοποιούν την αντίδραση και την δράση του ενζύμου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Σύγκριση των συνθηκών της αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και της αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μεγάλου μήκους (Phusion - long range PCR).

Συνθήκες PCR	16S rDNA	CeIA/GH5
1	98°C → 3min (Rmax)	98°C → 3min (Rmax)
2	98°C → 30sec (Rmax)	98°C → 30sec (Rmax)
3	(Tm+3)°C → 30sec (R=0.3)	(Tm<=3)°C → 30sec (R=0.3)
4	60°C → 1min (1min per kb) (Rmax)	69°C 1min (1min per kb) (Rmax)
5	Repeat 02-04 → nr of cycles 30-35	Repeat 02-04 → nr of cycles 30-35
6	72°C → 5min (Rmax)	72°C → 5min (1min per kb) (Rmax)
7	10°C → Hold (Rmax)	10°C → Hold (Rmax)

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Παρατίθενται τα πρωτόκολλα της αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και της αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μεγάλου μήκους (Phusion - long range PCR).

Πρωτόκολλο PCR	16S rDNA	CeIA/GH5
sdH20	12,45 µl	12,45 µl
Buffer C	4 µl	4 µl
MgCl2	Caρχ: 25mM 0,4 µl	Caρχ: 25mM 0,4 µl
dNTPs	Caρχ: 2,5mM 1 µl	Caρχ: 2,5mM 1 µl
DNA	Ποσότητα: 10-100ng 1 µl	Ποσότητα: 10-100ng 1 µl
Forward primer	Caρχ: 50pmol/µl 1 µl	Caρχ: 50pmol/µl 1 µl
Reverse primer	Caρχ: 50pmol/µl 1 µl	Caρχ: 50pmol/µl 1 µl
Enzyme	0,15 µl	0,15 µl

B10. ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου απαιτούν την πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών. Οι πολλαπλές στοιχίσεις είναι σημαντικό να γίνονται με μεγάλη ακρίβεια (Ogden and Rosenberg, 2006) ώστε να φανερώνεται τυχόν ομοιότητα μεταξύ των αλληλουχιών που χρησιμοποιούμε *in silico*. Ακόμα, φαίνονται οι

εξελικτικές αλλαγές-μεταβολές στις αλληλουχίες που χρησιμοποιούμε και με βάση αυτές πραγματοποιείται η μετέπειτα παρουσίαση των φυλογενετικών σχέσεων στους γεωβακίλλους που ερευνούμε σε πειραματικό επίπεδο.

Οι αλληλουχίες που εισάγονται (π.χ. 16S rDNA των *Geobacillus* sp24/sp50) για να γίνει η πολλαπλή στοίχιση ώστε να πραγματοποιηθεί εύρεση συντηρητικότητας, έχουν προηγουμένως μετατραπεί σε μορφή FASTA, μόνο όταν οι στοίχισεις γίνονται με το πρόγραμμα ClustalW2 (EBI-EMBL) (Blosum 62) (Thompson et al, 1994). Αντίθετα, οι πολλαπλές στοίχισεις που πραγματοποιούνται με το Megalign (Lasergene Program v.6) δεν απαιτούν οι αλληλουχίες να βρίσκονται σε FASTA format. Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων με τις διάφορες φυλογενετικές μεθόδους που χρησιμοποιήσαμε, οι αρχικές στοίχισεις των αλληλουχιών έγιναν με το λογισμικό Megalign (default parameters - προεπιλεγμένες παραμέτροι) (Clewley and Arnold, 1997) με την μέθοδο clustal W.

B11. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΥ DNA

Ο έλεγχος της ποιότητας των νουκλεϊνικών οξέων μετά την απομόνωση DNA, είναι σημαντικό βήμα ώστε να μπορούμε να αρχίσουμε τα πειράματα εμπλουτισμού με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Stulnig and Amberger, 1994). Με τον έλεγχο του DNA, λοιπόν, μπορούμε να ελαττώσουμε σε μεγάλο επίπεδο τον κίνδυνο όλη η διαδικασία του εμπλουτισμού να μην έχει το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδιακών περιοχών, και αυτό να οφείλεται στο DNA – μήτρα. Η αξιολόγηση της καθαρότητας του DNA γίνεται με την χρήση φάσματος απορρόφησης. Αρχικά, γίνεται μηδενισμός του φωτομέτρου, και υπολογίζεται ο λόγος A260/A280. Για να είναι το DNA καθαρό και χωρίς προσμίξεις μετά την απομόνωση DNA, ο λόγος A260/A280 πρέπει να παίρνει τιμές από 1,8 έως 2,0 (Sambrook and Russell, 2001; Franken et al, 1998). Οι τιμές που μετρήθηκαν στα δείγματα DNA του εργαστηρίου ήταν σε μεγάλο βαθμό ικανοποιητικές, κοντά στις αναμενόμενες – πρότυπες τιμές, κάτι το οποίο επαληθεύεται μετέπειτα από την επιτυχημένη ενίσχυση – εμπλουτισμό των γονιδίων στους υπό μελέτη οργανισμούς. Τιμές μικρότερες από 1,8, δηλώνουν παρουσία πρωτεϊνών, ενώ αντίθετα τιμές πάνω από 2, δείχνουν ύπαρξη RNA στο απομονωμένο DNA.

Πιο συγκεκριμένα, γίνεται WaveLength Scan στο φωτόμετρο από 320nm έως 220nm, με σάρωση 200nm/min. Ακολουθεί Baseline 1:50, δηλαδή 490μl H₂O & 10μl

ΤΕ, ενώ έπειτα μετράμε το δείγμα DNA που έχουμε στην ίδια αραιώση (x50). Μετράμε από το γράφημα τις τιμές απορρόφησης: A_{320} – τυφλό, A_{280} – πρωτεΐνες, A_{260} – DNA/RNA, A_{230} – οργανικές ενώσεις, και υπολογίζουμε την ποσότητα του DNA που έχουμε, θεωρώντας ότι $A_{260}=1$ αντιστοιχεί σε 50ng/μl.

B12. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Χρώση κατά Gram

Για την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών *Geobacillus* *sp24* & *sp50*, ως προς αν είναι Gram θετικοί ή Gram αρνητικοί, ετοιμάζουμε ένα παρασκεύασμα από κάθε μικροοργανισμό και στερεώνουμε τα βακτήρια πάνω από την φλόγα του λύχνου (**Gregersen, 1978; Karagouni, 2012**). Το παρασκεύασμα πρέπει να έχει τη σωστή συγκέντρωση κυττάρων, ώστε τα κύτταρα να είναι ευδιάκριτα.

Στη συνέχεια, ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- α) Χρωματίζουμε με κρυσταλλικό ιώδες για 30sec
- β) Ξεπλένουμε τη χρωστική με dsH_2O
- γ) Προσθέτουμε διάλυμα ιωδίου για 30sec
- δ) Ξεπλένουμε το παρασκεύασμα με dsH_2O
- ε) Αποχρωματίζουμε με διάλυμα αιθανόλης 95° και ξεπλένουμε με dsH_2O
- ζ) Προσθέτουμε διάλυμα σαφρανίνης για 30sec
- η) Ξέπλυμα με dsH_2O
- θ) Στέγνωμα του παρασκευάσματος σε διηθητικό χαρτί
- ι) Παρατήρηση σε φωτονικό μικροσκόπιο

Ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας

Η αναπνοή είναι μία από τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου και εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και την παρουσία των απαραίτητων ενζύμων για την αναγωγή του οξυγόνου. Τέτοια ένζυμα είναι η καταλάση και η οξειδάση (**Shi et al, 2010**).

- α) Η καταλάση είναι το ένζυμο που παράγεται σε πολλά βακτήρια και καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με σύγχρονη απελευθέρωση οξυγόνου:



Η παρουσία της δράσης του ενζύμου καταλάση εκτιμάται ως εξής: πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα μεταφέρεται με κρίκο εμβολιασμού μία αποικία του εκάστοτε μικροοργανισμού. Στη συνέχεια πάνω στην ποσότητα των κυττάρων προσθέτονται μερικές σταγόνες H_2O_2 3% διαλύματος. Εάν παρατηρηθεί δημιουργία φυσαλίδων, το βακτήριο είναι θετικό στην δοκιμή ύπαρξης του ενζύμου καταλάση. Το αντίθετο σημαίνει πως δεν έχει το ένζυμο, άρα είναι αναερόβιος μικροοργανισμός.

β) Η οξειδάση καθορίζει αν ένας μικροοργανισμός είναι σε θέση να οξειδώνει κάποιες αρωματικές αμίνες (π.χ. *p*-αμινοδιμεθυλαμίνη) (αρωματικές ουσίες), οπότε σχηματίζονται χρωματιστά προϊόντα. Αυτή η οξειδάση σχετίζεται σε ορισμένα είδη βακτηρίων με τη δράση του ενζύμου κυτοχρωμική οξειδάση. Η διαδικασία της βιοδοκιμής έχει ως εξής: Σε 2 μικρούς ογκομετρικούς σωλήνες τοποθετείται 1ml διαλύματος Ringer. Σε κάθε σωλήνα παρασκευάζουμε εναιώρημα από τις καλλιέργειες των στελεχών *sp24* & *sp50*, και αναμιγνύουμε με vortex για 1-2sec. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 1-2 σταγόνες αντιδραστήριου οξειδάσης (Kit) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Αναμιγνύουμε καλά και μετά από ένα λεπτό παρατηρούμε μακροσκοπικά τους σωλήνες. Η δημιουργία μπλε-μωβ χρώματος σημαίνει θετική αντίδραση οξειδάσης.

Σχηματισμός ενδοσπορίων

Είναι γνωστό ότι μερικές ομάδες βακτηρίων (όπως π.χ. τα *Clostridium* και τα *Bacillus*) (**McKenney et al, 2013**) δημιουργούν ανθεκτικές μορφές κυττάρων οι οποίες είναι ικανές να επιβιώνουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος. Κατά τη διαδικασία ταυτοποίησης ενός βακτηρίου συνίσταται η δοκιμή του «θερμικού σοκ» για την εκτίμηση του σχηματισμού ενδοσπορίων από το βακτήριο. Κατά αυτόν τον τρόπο ο προσδιορισμός του εκάστοτε βακτηρίου συντομεύεται αρκετά. Συγκεκριμένα η διαδικασία έχει ως εξής: Τοποθετούνται 5ml υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου (π.χ. *sp24/sp50*) σε υδατόλουτρο στους 80°C για 10'. Κάτω από αυτές τις συνθήκες όλα τα βλαστητικά κύτταρα καταστρέφονται ενώ τα ενδοσπόρια επιβιώνουν. Στη συνέχεια, σε ξεχωριστό τρυβλίο NB, εμβολιάζουμε το κάθε βακτήριο, ρίχνοντας μία σταγόνα από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη. Επωάζουμε τα τρυβλία στους 60°C για 24h. Έπειτα, παρατηρούμε την πιθανή ανάπτυξη αποικιών. Αν παρατηρήσουμε αποικίες, είναι προφανές ότι προήλθαν από τα επιβιώσαντα ενδοσπόρια των βακτηριακών στελεχών που μελετάμε του γένους των γεωβακίλλων.

B13. ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Στη παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε φωτονικό μικροσκόπιο με βιντεοκάμερα, συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή (**Crewe et al, 1968; Xiao et al, 1988**). Ο χρωματισμός για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο των κυττάρων έγινε με χρώση κατά Gram.

Για την παρατήρηση των βακτηρίων στο οπτικό μικροσκόπιο απαιτείται κατάλληλο ισοτονικό διάλυμα.

Ισοτονικό δ/μα οπτικού μικροσκοπίου:

- 1) 0,1g glucose 0,1%
- 2) 0,1g sucrose 0,1%
- 3) 6,5g NaCl
- 4) 0,42g KCl
- 5) 0,25g CaCl₂
- 6) 0,5% K₂HPO₄
- 7) 0,1% KH₂PO₄
- 8) up to 1L dsH₂O
- 9) pH: from 5,5 to 6,5

Άλλα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για το φωτονικό μικροσκόπιο:

- a) RINGER: NaCl/KCl/CaCl₂
- b) PBS: NaCl/NaH₂PO₄/KCl

B14. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗΣ GH5

Η μέτρηση της συνολικής ποσότητας των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα, πραγματοποιείται με φασματοφωτομετρικές μεθόδους, που βασίζονται στη χρήση μορίων, τα οποία αλληλεπιδρούν αδιακρίτως με όλες σχεδόν τις πρωτεΐνες. Μία από αυτές τις μεθόδους είναι η και η μέθοδος Bradford (**Bradford, 1976**).

Σύσταση αντιδραστηρίου Bradford

[Bradford Reagent]

➤ Coomassie Brilliant Blue G-250 [100mg]

- a. EtOH (100%) [50ml] - b. H₃PO₄ (85%) [100ml]

- Ανάδευση για 15min.
- Προσθέτουμε 850ml H₂O αργά, ανάδευση για 40 min.
- Φιλτράρισμα με διηθητικό χαρτί (whatman paper).
- Φύλαξη σε σκούρο δοχείο [20°C].

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι μία χρωστική, η προαναφερθείσα Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία είναι γνωστή και ως αντιδραστήριο Bradford, προσδένεται σε συγκεκριμένα αμινοξέα, που συναντώνται στις περισσότερες πρωτεΐνες. Όταν η χρωστική προσδεθεί κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και pH στα αμινοξικά κατάλοιπα, τότε το χρώμα της μεταβάλλεται από κοκκινωπό-καφέ σε μπλε. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της πρωτεΐνης σε ένα δείγμα, τόσο εντονότερο εμφανίζεται το μπλε χρώμα στο διάλυμα. Αυτή η μεταβολή του χρώματος είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος σε φωτόμετρο στα 595nm.

Η μέθοδος Bradford μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δείγματα, στα οποία η πρωτεϊνική συγκέντρωση κυμαίνεται από 1μg/ml έως 1500μg/ml.

■ Διάλυμα Πρωτεϊνών + Αντιδραστήριο Bradford → Μπλε Προϊόν

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέθοδος Bradford, αρχικά παρασκευάζεται μία σειρά προτύπων διαλυμάτων, συνήθως μέσω αραιώσεων ενός δείγματος γνωστής συγκέντρωσης. Τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα αντιδρούν με το αντιδραστήριο Bradford και οι τιμές της απορρόφησης τους μετριοούνται σε ένα φασματοφωτόμετρο. Οι τιμές της απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό μίας καμπύλης αναφοράς. Στην καμπύλη αναφοράς, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης τοποθετείται στον άξονα των -x-, ενώ η απορρόφηση στον άξονα των -ψ-. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματα υπολογίζεται με βάση την καμπύλη αναφοράς.

Σχεδιασμός της καμπύλης αναφοράς με βάση τις τιμές απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων BSA (Bovine serum albumin)

Πρότυπη καμπύλη για Bradford-Proteins

- a) 1ml Bradford + 10μl (0,1% BSA – 1g/L)
- b) 1ml Bradford + 20μl BSA
- c) 1ml Bradford + 30μl BSA
- d) 1ml Bradford + 40μl BSA
- e) 1ml Bradford + 50μl BSA
- f) Τυφλό Bradford (+20μl H₂O)

BRADFORD_Μέτρηση Πρωτεϊνών GH5	
A595	[C] μg/ml
0,268	9,96
0,571	19,61
0,764	29,13
0,874	38,46
0,994	49,62

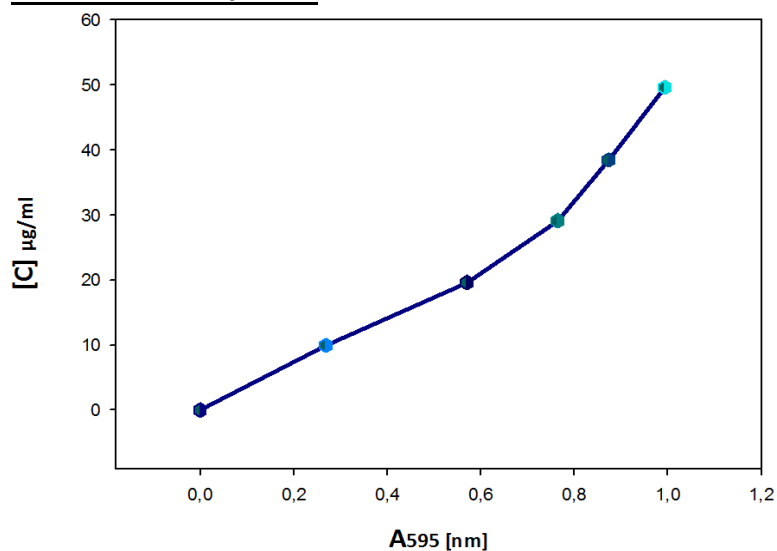
Equation: Polynomial; Quadratic

$$f(x) = y_0 + a \cdot x + b \cdot x^2$$

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0,9952	0,9905	0,9841	2,3137

	Coefficient	Std. Error	t	P
y0	1,2302	2,1889	0,5620	0,6134
a	13,5856	10,3839	1,3083	0,2820
b	33,7458	10,1018	3,3406	0,0444

ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ



ΤΥΠΟΣ ΠΟΛΥΩΝΥΜΙΚΗΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ

$$y=33,74x^2+13,58x+1,23$$

Ακολούθησε καθορισμός της συγκέντρωσης της υπό εξέτασης πρωτεΐνης GH5 στο δείγμα απομόνωσης της. Συγκεκριμένα, το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν το εξής:

Πρωτεϊνικό Δείγμα	10μl πρωτεΐνης GH5 + 1ml Bradford
Θετικό Δείγμα	10μl πρωτεΐνης BSA + 1ml Bradford
Αρνητικό Δείγμα - τυφλό	10μl dsH ₂ O + 1ml Bradford

Εύρεση συγκέντρωσης της απομονωμένης πρωτεΐνης GH5

Bradford	BSA	GH5 <i>sp50</i>
OD 595nm	0.266	0.245
	0.257	0.217

Από την πρότυπη καμπύλη και την παραπάνω συνάρτηση, φαίνεται πως στην αντίδραση είχαμε γύρω στα 10μg/ml. Από τον νόμο της αραιώσης, η συγκέντρωση της απομονωμένης πρωτεΐνης στο erpendorf αποθήκευσης είναι περίπου 1mg/ml.

B15. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΟΥ

- Για την κάθε ενζυμική αντίδραση στα διαφορετικά pH, χρησιμοποιήθηκε buffer φωσφορικών (K₂HPO₄ & KH₂PO₄, συνολικής συγκέντρωσης 50mM) με διαφορετικό pH κάθε φορά μαζί με το CMC (carbozy-methyl-cellulose), και συγκεκριμένα 1%. Το ένζυμο GH5 προστίθεται στην αντίδραση έπειτα, με V_{τελ.αντίδρασης}=200μl [180μl CMC/Buffer & 20μl ένζυμο GH5/CelA]. Ο χρόνος της αντίδρασης είναι t=20min στους 60°C.

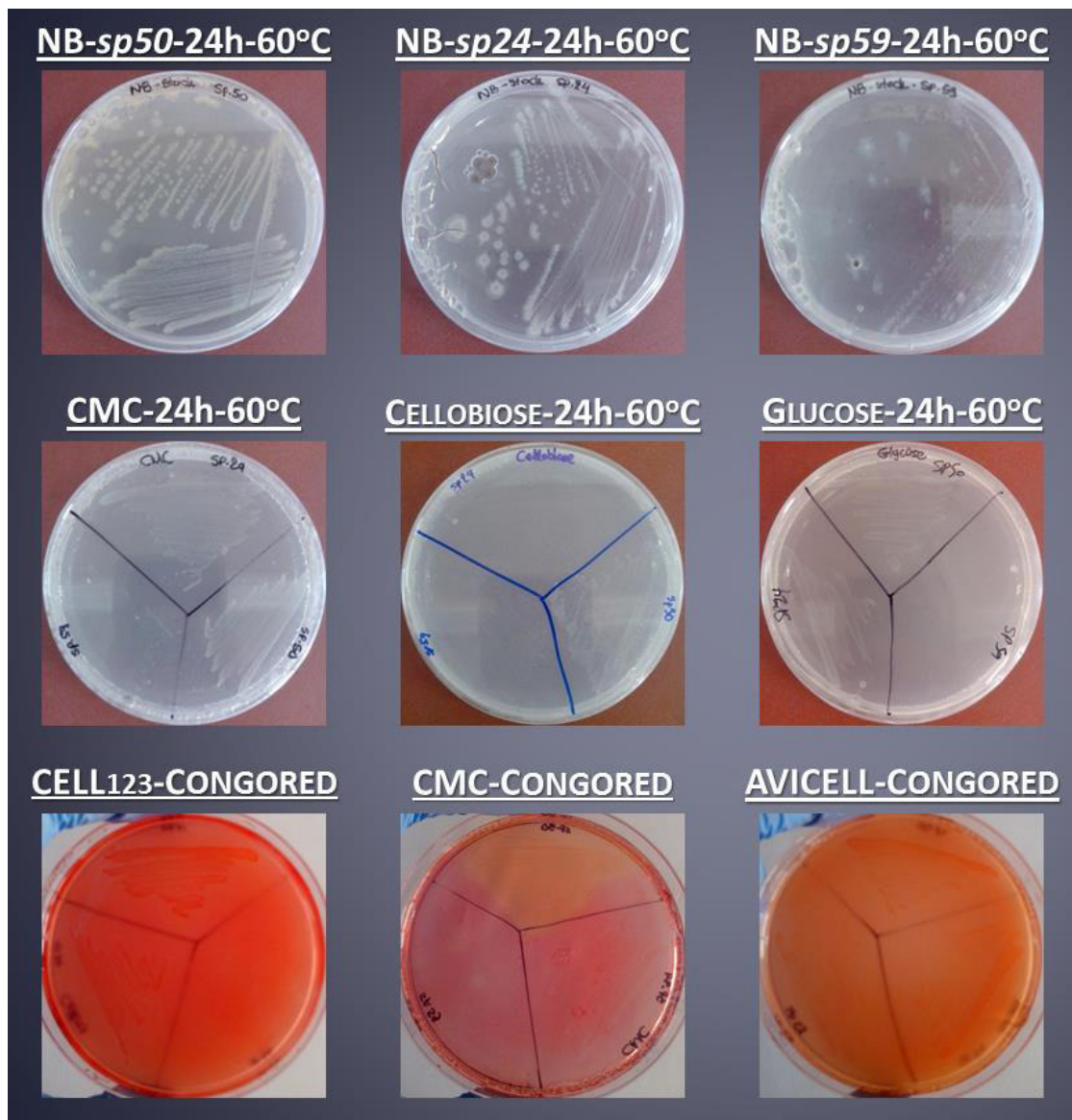
- Το διάλυμα για κάθε διαφορετική θερμοκρασία αντίδρασης είχε $V_{\text{τελ}}=200\mu\text{l}$ [$175\mu\text{l}$ CMC/Buffer & $25\mu\text{l}$ ένζυμο]. Το pH όλων των αντιδράσεων είχε ρυθμιστεί στο $\text{pH}_{\text{optimal}}=6$. Η κάθε αντίδραση είχε διάρκεια 15min. Έπειτα, τόσο για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας όσο και του βέλτιστου pH, στα οποία η υπό εξέταση κυτταρινάση εμφανίζει την μέγιστη ενεργότητα, έγιναν μετρήσεις των παραγόμενων αναγωγικών σακχάρων με την μέθοδο DNS (Dinitro-salicylic acid method). [Η κυτταρινάση GH5, ως ενδο-γλυκανάση διασπά την φυτική κυτταρίνη (CMC) σε μικρότερα ολιγοπολυμερή γλυκόζης*, σε ελεύθερες γλυκόζες* και σε διμερή γλυκόζης (σελλοβιόζη*) - (*→ αναγωγικά σάκχαρα), μετατρέποντας το χρώμα του αντιδραστηρίου DNS από κίτρινο σε σκούρο-πορτοκαλί κατά τον βρασμό στους $95-98^{\circ}\text{C}$.

Αποτελέσματα

Γ1. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΙΝΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Χρησιμοποιήθηκαν 3 βακτηριακά στελέχη γεωβακίλλων από την συλλογή της Σαντορίνης, για τον εντοπισμό τυχόν κυτταρινολυτικής δράσης. Τα στελέχη αυτά είναι τα *Geobacillus* sp. SP24, SP50 και SP59. Σε θερμοκρασία 60°C και pH~6,5, παρασκευάστηκε στερεό ελάχιστο θρεπτικό μέσο (minimal medium) με χρήση διάφορων πηγών άνθρακα (Glucose, Cellobiose, CMC, Avicell, Cell₁₂₃ powder, χωρίς άνθρακα – No C), καλλιεργήθηκαν τα συγκεκριμένα στελέχη, με χρόνο επώασης t=24h. Η αρχική εικόνα της μορφολογίας τους προέκυψε από την χρήση ως θρεπτικού μέσου NB (Nutrient Broth, 8g/L & 3% agar). Το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP59 έμφανίζεται να είναι εκείνο με την μικρότερη ανάπτυξη, ενώ τα άλλα δύο στελέχη αναπτύσσονται κανονικά, με το *Geobacillus* sp. SP24 να δημιουργεί μεγαλύτερες αποικίες σε σύγκριση με το SP50.

Σχετικά με το θρεπτικό γλυκόζη, στο τρυβλίο φάνηκε ότι αναπτύσσονται όλα τα στελέχη εκτός του SP59, ενώ στην σελλοβιοζη παρατηρήθηκε πως αναπτύσσεται το SP50 μόνο. Ακολουθως, στα Avicell, Cell₁₂₃, CMC κατά τη χρήση της χρωστικής Congo_Red, στα τρία αυτά υποστρώματα, μόνο στην Carboxyl-Methyl-Cellulose (CMC) παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του θρεπτικού για στο στέλεχος SP50. Αυτή η αλλαγή του χρώματος μας δείχνει την πιθανή – σχεδόν σίγουρη έκκριση κυτταρινολυτικών ενζύμων από το SP50, αφού η χρωστική πλέον δεν μπορεί να προσδεθεί πάνω στους β-γλυκοσιδικούς δεσμούς που καταστρέφονται από την δράση των ενζύμων αυτών.



ΕΙΚΟΝΑ 7: Τα βακτηριακά στελέχη *Geobacillus* sp. SP24, SP50 & SP59, εμφανίζουν διαφορές ως προς την δυνατότητα ανάπτυξής τους σε διάφορες πηγές άνθρακα (CMC-cellulose, Cell123-cellulose powder, Avicell-crystal cellulose, Cellobiose, Glucose). Στη γλυκόζη αναπτύσσονται τα SP24 & SP50 ενώ στη κελλοβιόζη αναπτύσσεται μόνο το SP50, όταν στο θρεπτικό δεν υπάρχουν Casamino acids. Στα θρεπτικά CMC, Avicell & Cell123, παρατηρείται μία μικρή ανάπτυξη και για τα 3 στελέχη, λόγω πιθανόν ελάχιστης υδρόλυσης των υποστρωμάτων κυτταρίνης στους 60°C από την επώαση – θέρμανση. Ωστόσο, μόνο στο υπόστρωμα CMC και το *Geobacillus* sp. SP50 έχει αποχρωματίσει το CongoRed, δείχνοντας ότι μόνο αυτό το στέλεχος έχει πραγματικά κυτταρινολυτική ικανότητα.

Γ2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

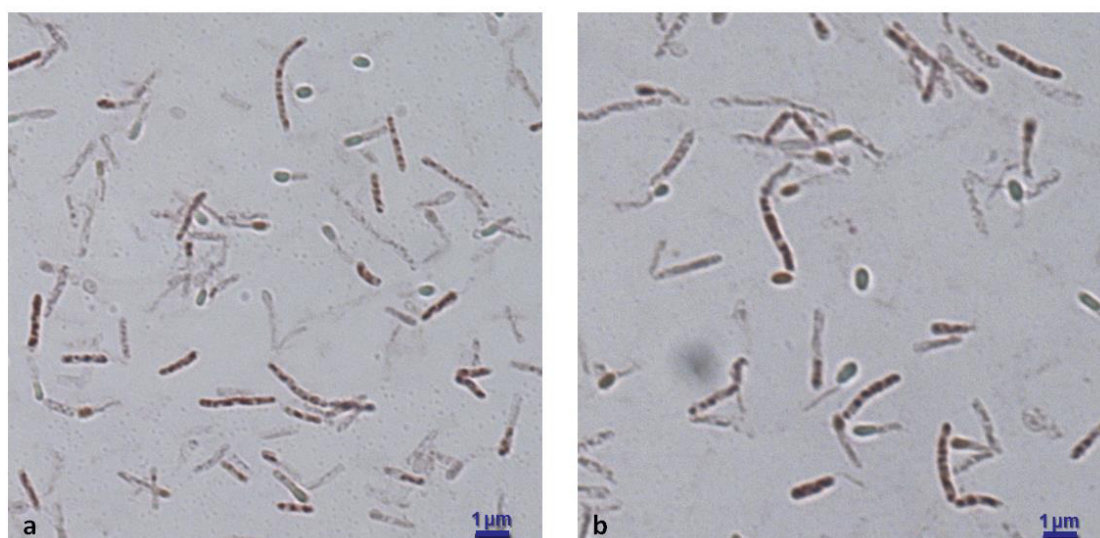
Τα βακτηριακά στελέχη *Geobacillus* sp. SP24 & SP50 παρατηρήθηκαν στο φωτονικό μικροσκόπιο, μετά από σταθεροποίηση στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Αξίζει να σημειωθεί πως το χρώμα, το μέγεθος, το σχήμα της αποικίας είναι πολύ σημαντικά, αλλά όχι και καθοριστικά για την ταυτοποίηση του εκάστοτε βακτηρίου, αφού αρκετά διαφορετικά μεταξύ τους είδη μπορούν να δώσουν πολύ όμοιες μορφές αποικίας.

Όσον αφορά στο μέγεθος του βακτηριακού στελέχους *Geobacillus* sp. SP24, το συγκεκριμένο βακτήριο έχει μήκος περίπου 1-1,5 μm και πλάτος 0,1-0,2 μm . Το σχήμα του κυττάρου είναι βάκιλλος. Η διάταξη των κυττάρων/βακίλλων στο χώρο είναι είτε ένα κύτταρο μόνο του, είτε ζεύγος βακίλλων, είτε ακόμα και πιο σπάνια αλυσίδα κυττάρων. Συγκριτικά με το *Geobacillus* sp. SP24, το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 έχει λίγο πιο μικρό μέγεθος κυττάρων, κάνοντας τις αποικίες του σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα πιο επίπεδες και πιο αχνές. Αναλυτικότερα, το κάθε *Geobacillus* sp. SP50 έχει μήκος περίπου 1 μm και πλάτος 0,1 μm . Το σχήμα και η διάταξη των βακτηριακών κυττάρων στο χώρο είναι ίδια με του *Geobacillus* sp. SP24 (ΕΙΚΟΝΑ 9, 10).



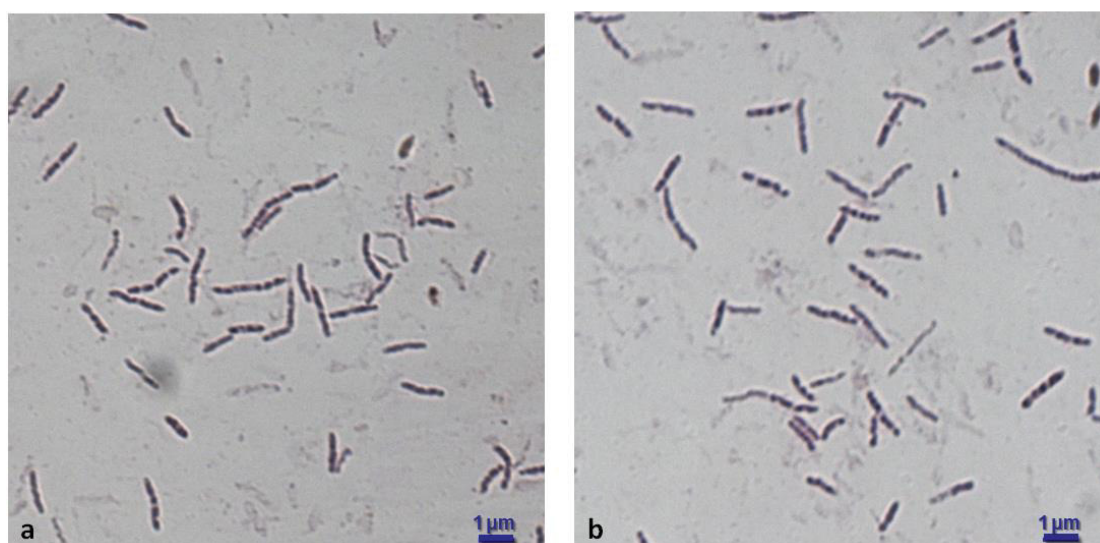
ΕΙΚΟΝΑ 8: Τα στελέχη απομονώθηκαν από την περιοχή της Νέας Καμένης [Santorini, Greece, 25°25' N, 36°25' E].

Στελέχος *Geobacillus* sp24



ΕΙΚΟΝΑ 9: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Geobacillus* sp. SP24.

Στελέχος *Geobacillus* sp50



ΕΙΚΟΝΑ 10: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Geobacillus* sp. SP50.

Γ3. ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ SP24 & SP50 ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ ΤΩΝ ΓΕΩΒΑΚΙΛΛΩΝ

Κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα για το γονίδιο 16S rDNA με τρεις διαφορετικές φυλογενετικές μεθόδους (Neighbor Joining, Maximum Parsimony, Bayesian Inference). Οι αλληλουχίες των γονιδίων 16S για την δημιουργία της αρχικής στοίχισης συλλέχθηκαν από την βάση δεδομένων NCBI. Από το συνδυασμό των τριών παραχθέντων φυλογενετικών δέντρων, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα 2 στελέχη των γεωβακίλλων που μελετάμε ανήκουν στον κλάδο "kaustophilus". Είναι λοιπόν πιο συγγενικά φυλογενετικά με τα είδη *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoparaffinivorans*, ενώ εξελικτικά πιο απομακρυσμένα από είδη των γεωβακίλλων *Geobacillus thermodenitricicans* & *Geobacillus stearothermophilus*. Όσον αφορά την μεταξύ τους φυλογενετική απόσταση, τα στελέχη *Geobacillus* sp. SP24 & SP50 είναι ιδιαίτερα κοντά, κάτι που επαληθεύεται και από τις στοιχίσεις που πραγματοποιήθηκαν με το ClustalW2. Παρακάτω παρουσιάζεται το συνδυαστικό φυλογενετικό δέντρο του 16S rDNA για τα 14 διαφορετικά είδη γεωβακίλλων (**ΕΙΚΟΝΑ 11**).

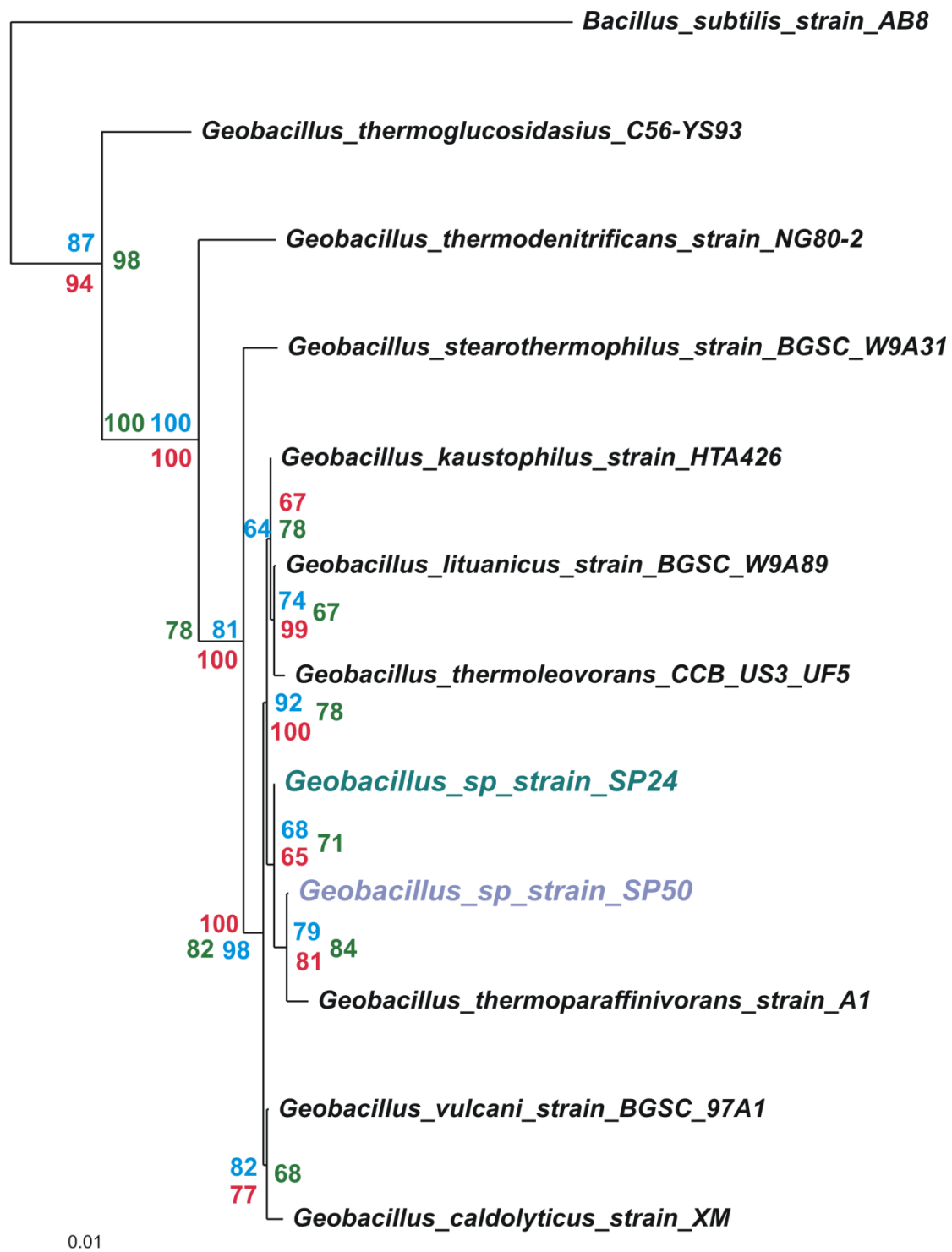
Σε κάθε φυλογενετικό δέντρο που σχεδιάστηκε χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης. Αυτές είναι η μέθοδος αποστάσεων Neighbor-Joining (μέθοδος συνδεσης γειτονων-NJ), η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας (Maximum parsimony-MP) και η Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία (Bayesian inference-BI). Επειδή καμία μέθοδος δεν είναι τέλεια, για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός των τριών αυτών φυλογενετικών σε κάθε φυλογενετικό δέντρο που δημιουργήθηκε, ώστε να είναι όσο το δυνατό πιο αξιόπιστο και πιο κοντά στην πραγματικότητα.

Για την δημιουργία των Neighbor-Joining και Maximum parsimony φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) (**Swofford, 2002**), ενώ αντίθετα για το Bayesian δέντρο το πρόγραμμα MrBayes (**Ronquist and Huelsenbeck, 2003**). Για την καλύτερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά CorelDRAW και TreeView (**Page, 2001**). Στα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν από τις τρεις αυτές μεθόδους φυλογενετικής ανάλυσης (NJ-MP-BI), τόσο στα γονίδια της DNA πολυμεράσης γ και της μιτοχονδριακής RNA πολυμεράσης, όσο και του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα Mtf1 και της ITS-περιοχής, η υποστήριξη των τοπολογιών δίνεται μετά από NJ-bootstrap (10000 αντίγραφα) και MP-bootstrap (1000 αντίγραφα) ανάλυση, ενώ στο BI φυλογενετικό δέντρο γίνεται μέσω των Posterior Probability από 50.000 γενιές.

Πρέπει να σημειωθεί πως, για το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε με την μέθοδο των αποστάσεων Neighbor-Joining (μέθοδος συνδεσης γειτονων-NJ),

χρησιμοποιήθηκε το διπαραμετρικό μοντέλο του Kimura (K2P, K80) (**Kimura, 1980**), που θεωρεί πως οι συχνότητες εμφάνισης των τεσσάρων νουκλεοτιδίων είναι μεταξύ τους ίσες, ενώ η δεύτερη παράμετρος που θέτει είναι ότι ο ρυθμός των μεταπτώσεων (μεταβάσεων) σε σχέση με τις μεταστροφές είναι διαφορετικός.

Αν και η Μπεϋζιανή Συμπερασματολογία (Bayesian Analysis) είναι η πιο ακριβής και ρεαλιστική φυλογενετική μέθοδος (posterior probabilities), ωστόσο τα αποτελέσματα από τις άλλες δύο μεθόδους (Neighbor Joining-Maximum Parsimony Bootstrap) για το ίδιο πάντα γονίδιο δε διαφέρουν σημαντικά, όπως είναι φανερό από το φυλογενετικό δέντρο που παρουσιάζεται παρακάτω. Πρέπει να σημειωθεί πως ένα τμήμα του συνόλου των αλληλουχιών εντοπίστηκε μέσω του προγράμματος Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) (**Altschul et al, 1997**). Πέρα από το Blastn που έδειχνε το E-value στην κάθε μία αλληλουχία, έγινε και ευθυγράμμιση των αλληλουχιών για το κάθε υπό εξέταση γονίδιο με το πρόγραμμα ClustalW2 (**Thompson et al.,1994**).



ΕΙΚΟΝΑ 11: Φυλογενετικό δέντρο που προκύπτει ύστερα από την Bayesian ανάλυση της περιοχής του γονιδίου 16S rDNA. Για ρίζα του δέντρου (outgroup) έχει χρησιμοποιηθεί η αντίστοιχη αλληλουχία του βακτηρίου *Bacillus subtilis* AB8. Η υποστήριξη των τοπολογιών δίνεται μετά από NJ-Bootstrap και MP-Bootstrap ανάλυση (κόκκινοι και μπλέ αριθμοί, αντίστοιχα) και Posterior Probability (πράσινοι αριθμοί) της Bayesian ανάλυσης.

Γ4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

Τα δύο βακτηριακά στελέχη (SP24 / SP50) είναι θετικά κατά Gram, αφού κατά την χρώση παραμένουν ιώδη. Η παρατήρηση φυσαλίδων μετά την προσθήκη σταγόνων H_2O_2 πάνω σε μία μικρή ποσότητα κυττάρων (αποικίες) και στα δύο υπό μελέτη βακτήρια, μας δείχνει πως τα συγκεκριμένα βακτήρια διαθέτουν το ένζυμο καταλάση, ενώ η δημιουργία μπλε χρώματος στο πείραμα της οξειδάσης και στα δύο στελέχη σημαίνει πως έχουμε θετική αντίδραση οξειδάσης, άρα ύπαρξη του ενζύμου. Τέλος και τα 2 θερμόφιλα βακτήρια σχηματίζουν ενδοσπόρια, μετά το θερμικό σοκ που υποβλήθηκαν για 10' στους 80°C.

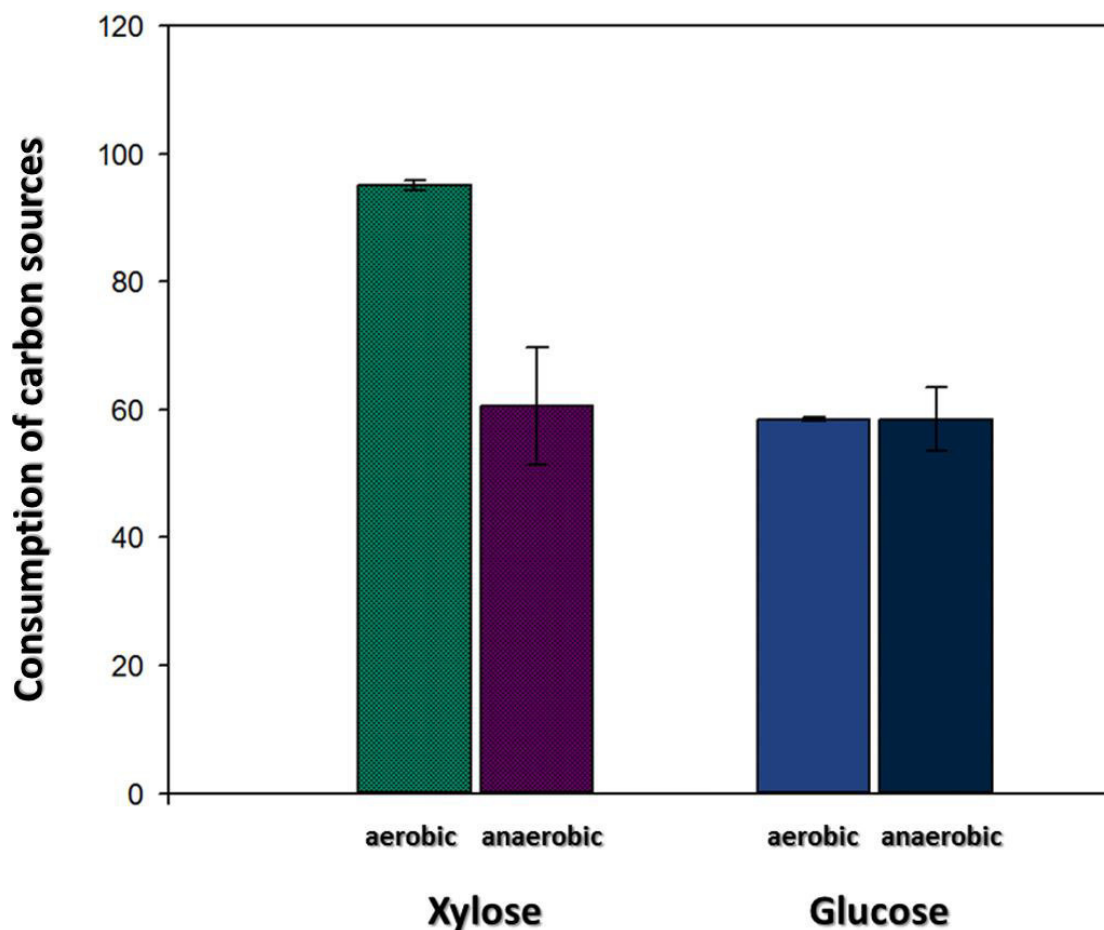
Τα αποτελέσματα των βακτηριακών βιοδοκιμών φαίνονται παρακάτω:

[ΠΙΝΑΚΑΣ 5]

<u>Μικροοργανισμός</u>	<u>Στέλεχος SP24</u>	<u>Στέλεχος SP50</u>
Χρώση Gram	+	+
Καταλάση	+	+
Οξειδάση	+	+
Σχηματισμός σπορίων	+	+

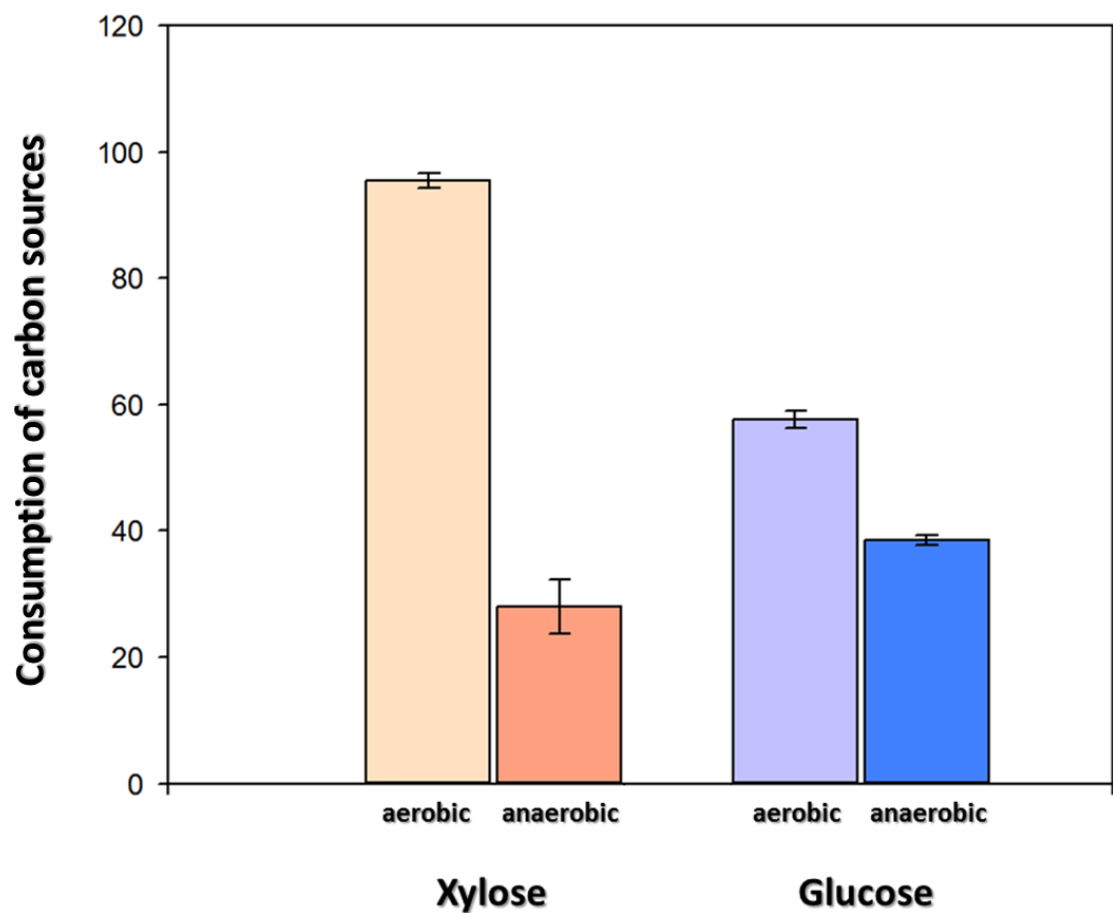
Αξίζει να επισημανθεί πως, από το πείραμα παραγωγής αιθανόλης που πραγματοποιήθηκε (gas chromatography), αν και η ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών SP24 & SP50 είναι ικανοποιητική τόσο στην γλυκόζη όσο και στην ξυλόζη σε μικρο-αναερόβιες συνθήκες, εντούτοις δεν κατανάλωσε την εκάστοτε πηγή άνθρακα (Glucose, Xylose) στα επίπεδα που πειράματος με θρεπτικό Shoham DCS (Shoham et al, 1993), άλλα παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλότερα ποσοστά κατανάλωσης σε σύγκριση με τις αερόβιες συνθήκες. Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα, σε συνδυασμό με την ύπαρξη καταλάσης/οξειδάσης στα υπό εξέταση θερμόφιλα βακτήρια, δείχνει πως πρόκειται για καθαρά αερόβιους μικροοργανισμούς.

Xyl1	Xyl2	Glu1	Glu2	<i>Geobacillus</i> sp. SP24
1,351	1,359	1,365	1,371	<u>OD – DNS</u> - t ₁ =0h
0,625	0,445	0,511	0,614	<u>OD – DNS</u> - t ₂ =72h
54		62		Consumption 1
67		55		Consumption 2
60,5		58,5		Average Consumption
9,192		4,949		Error of Average Consumption



ΓΡΑΦΗΜΑ 1: Παρουσιάζεται η κατανάλωση της ξυλόζης και της γλυκόζης από το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24 σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Φαίνεται πως η κατανάλωση ξυλόζης είναι μεγαλύτερη σε αερόβιες συνθήκες, ενώ η κατανάλωση της γλυκόζης δεν φαίνεται να διαφοροποιείται αισθητά και στις 2 περιπτώσεις.

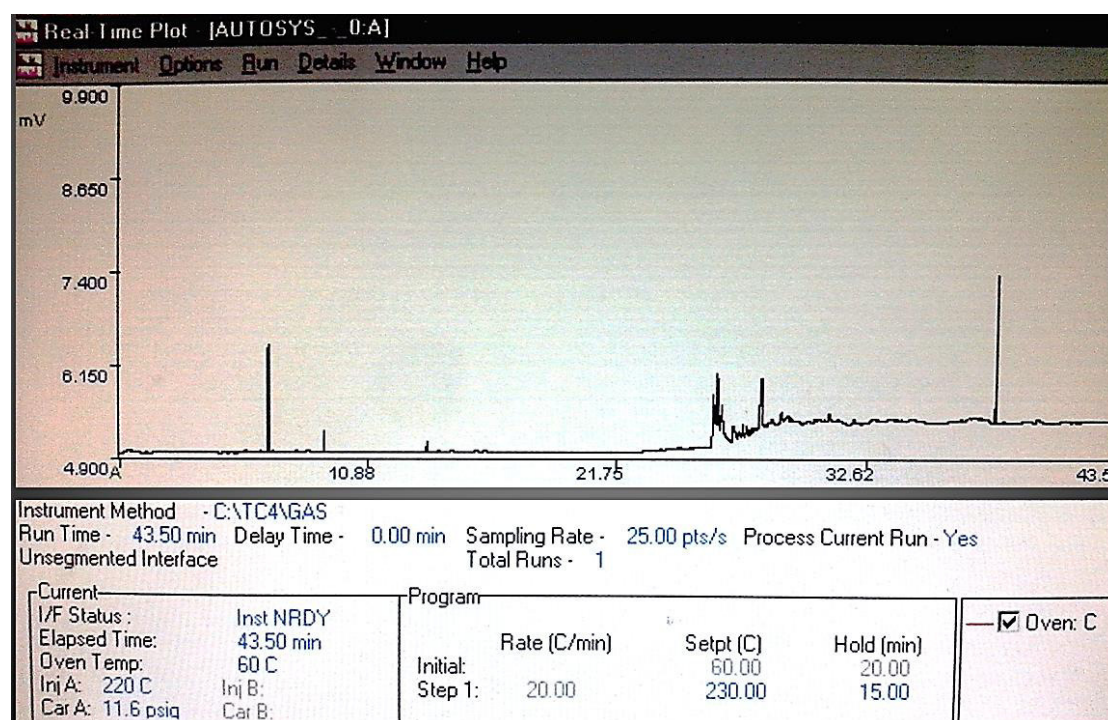
Xyl1	Xyl2	Glu1	Glu2	<i>Geobacillus</i> sp. SP50
1,351	1,359	1,373	1,364	t ₁ =0h
0,927	1,012	0,822	0,829	t ₂ =72h
31		39		Consumption 1
25		38		Consumption 2
28		38,5		Average Consumption
4,242		0,707		Error of Average Consumption



ΓΡΑΦΗΜΑ 2: Παρουσιάζεται η κατανάλωση της ξυλόζης και της γλυκόζης από το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Φαίνεται πως η κατανάλωση ξυλόζης είναι ιδιαίτερα μεγάλη σε αερόβιες συνθήκες, σε σύγκριση με αναερόβια, ενώ το ίδιο, αλλά σε μικρότερο βαθμό ισχύει και για τη γλυκόζη.

Γ5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟ-ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Για τον έλεγχο πιθανής παραγωγής αιθανόλης από τα στελέχη *Geobacillus* sp. SP24 & *Geobacillus* sp. SP50 χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Οι συνθήκες που δημιουργήθηκαν για τον έλεγχο τυχόν παραγωγής αιθανόλης ήταν μικρο-αναερόβιες, με χρόνο επώασης των βακτηριακών καλλιέργειών γύρω στις 3 μέρες (~72h). Χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές πηγές άνθρακα (Ξυλόζη – Γλυκόζη) στο θρεπτικό μέσο Shoham (DCS) με pH~6,5 & T=60°C. Ο όγκος της κάθε καλλιέργειας είναι 12ml. Το πείραμα έδειξε ότι και τα δύο υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη δεν παράγουν τελικά αιθανόλη (Ethanol), και ότι η έρευνα περιορίζεται κυρίως στην ικανότητά τους να παράγουν ένζυμα αποικοδόμησης τόσο της κυτταρίνης όσο και της ημικυτταρίνης (κυτταρινολυτική δράση). Παρακάτω παρουσιάζεται και το διάγραμμα από το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε κατά την αέρια χρωματογραφία. Είναι χαρακτηριστικό πως απουσιάζει η κορυφή που αντιστοιχεί την ανίχνευση αιθανόλης, στην χρονική περίοδο γύρω στα 8 με 10 λεπτά από την είσοδο του δείγματος (υπερκείμενο καλλιέργειας) στον αέριο χρωματογράφο.

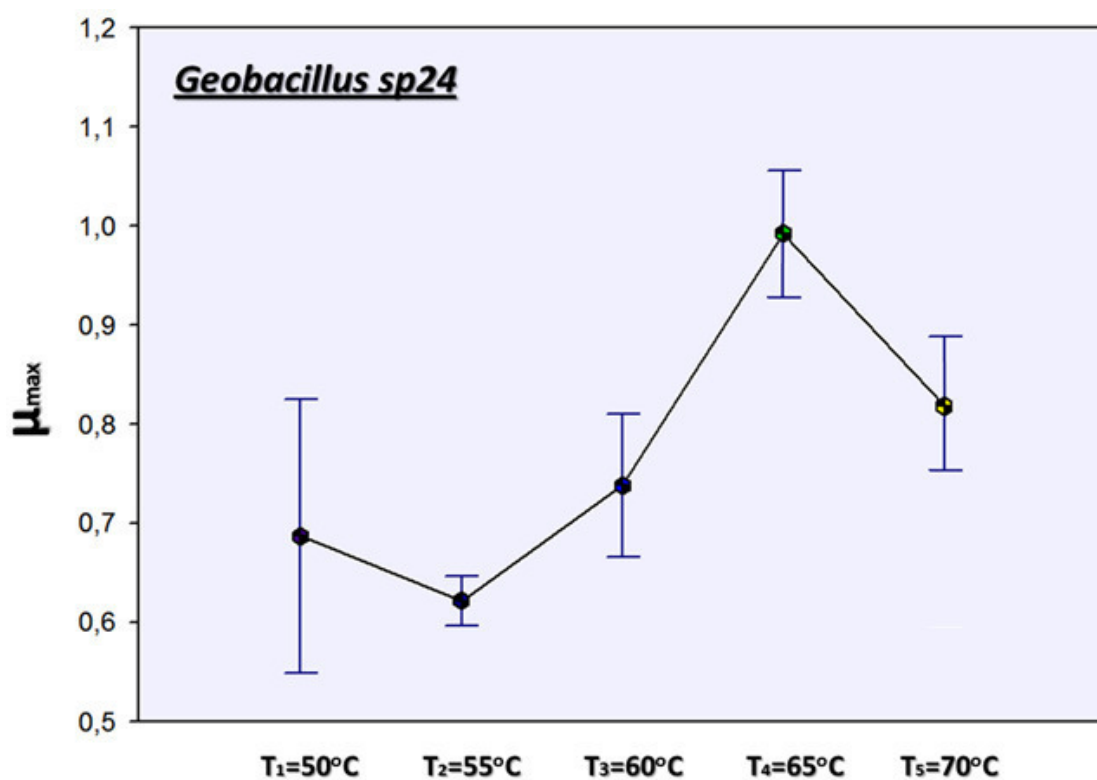


ΕΙΚΟΝΑ 12: Από την αέρια χρωματογραφία, παρατηρούμε πως γύρω στα 7-8 λεπτά δεν καταγράφησαν κορυφές που να αντιστοιχούν στην παρουσία αιθανόλης, παραγόμενη από το *Geobacillus* sp. SP50.

Γ6. ΕΥΡΕΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

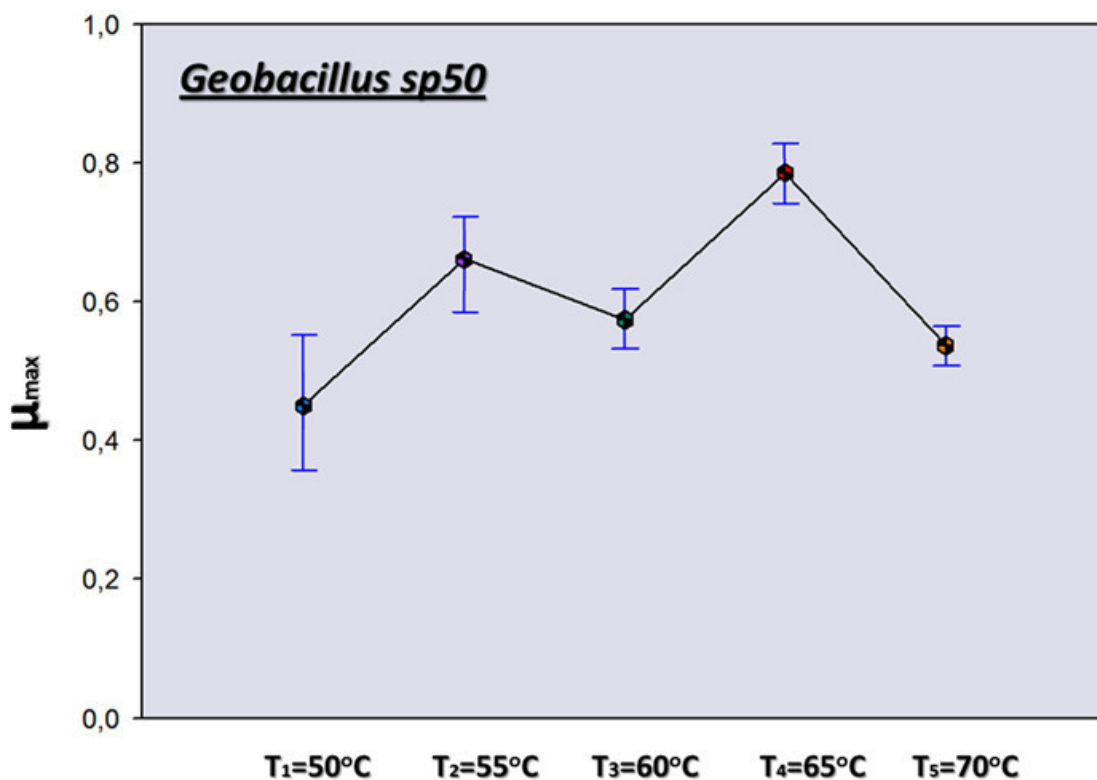
Για την εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών *Geobacillus* sp. SP24 & *Geobacillus* sp. SP50, χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό μέσο NB. Η επώαση των μικροοργανισμών έγινε σε thermoshaker, στην εκάστοτε θερμοκρασία επιλογής – εξέτασης, στις 900rpm, με παροχή ατμοσφαιρικού αέρα. Για κάθε στέλεχος το πείραμα επαναλαμβάνεται δύο φορές, ενώ για κάθε μέτρηση λαμβάνονται 3 τιμές. Το συγκεκριμένο πείραμα και για τα δύο στελέχη γεωβακίλλων SP24 / SP50 (θερμόφιλοι) έδειξε να έχουν κοίνο εύρος ανάπτυξης, από τους 50°C έως και τους 70°C (temperature range). Από την επεξεργασία των δεδομένων του κάθε στελέχους με το πρόγραμμα SigmaPlot, με την έρευνα του μ_{max} για κάθε θερμοκρασία, φάνηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 είναι στους 65°C, ενώ για το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24 πάλι στους 65°C.

Temperature	$\mu_{\max}$ - 600nm	Average	Error	Geobacillus sp24
T1=50°C	0,784	0,686	0,138	
T2=50°C	0,588			
T1=55°C	0,639	0,621	0,025	
T1=55°C	0,603			
T1=60°C	0,788	0,737	0,072	
T2=60°C	0,686			
T1=65°C	1,074	0,992	0,115	
T2=65°C	0,910			
T1=70°C	0,973	0,818	0,219	
T2=70°C	0,662			



ΓΡΑΦΗΜΑ 3: Στο γράφημα φαίνονται οι διάφορες θερμοκρασίες ανάπτυξης του στελέχους *Geobacillus* sp. SP24. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι, με βάση τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε, γύρω στους 65°C, αν και διαπιστώθηκε πως αναπτύσσεται ικανοποιητικά και στους 60°C.

Temperature	$\mu_{\max}$ - 600nm	Average	Error	Geobacillus sp50
T ₁ =50°C	0,622	0,450	0,243	
T ₂ =50°C	0,277			
T ₁ =55°C	0,570	0,661	0,129	
T ₁ =55°C	0,752			
T ₁ =60°C	0,605	0,574	0,043	
T ₂ =60°C	0,544			
T ₁ =65°C	0,886	0,786	0,142	
T ₂ =65°C	0,685			
T ₁ =70°C	0,516	0,536	0,028	
T ₂ =70°C	0,557			



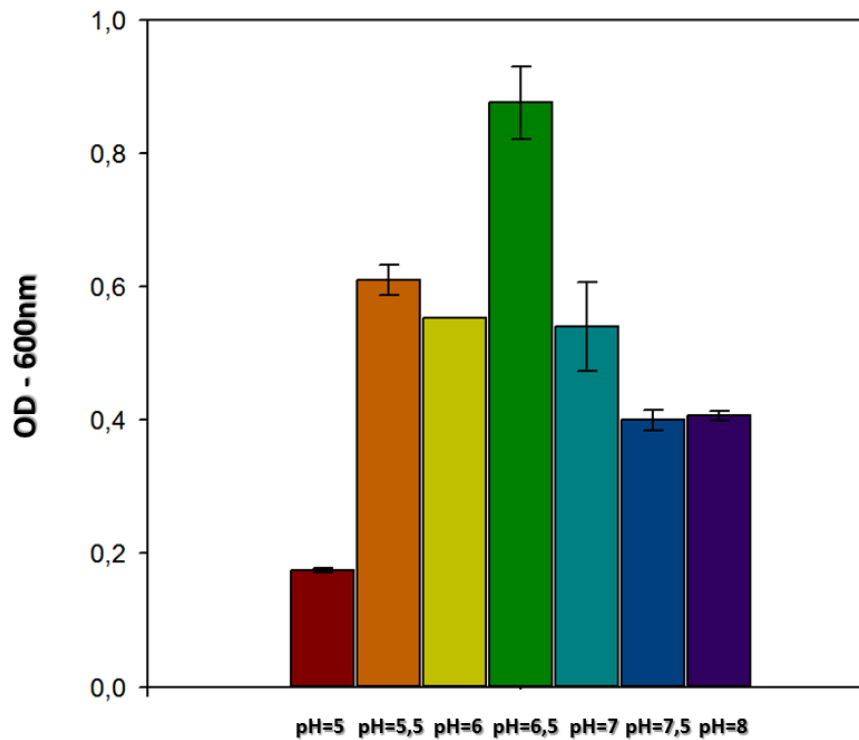
ΓΡΑΦΗΜΑ 4: Στο γράφημα φαίνονται οι διάφορες θερμοκρασίες ανάπτυξης του στελέχους *Geobacillus* sp. SP50. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι, με βάση τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε, γύρω στους 65°C, αν και διαπιστώθηκε πως αναπτύσσεται ικανοποιητικά και στους 60°C.

Γ7. ΕΥΡΕΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΟΥ pH ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

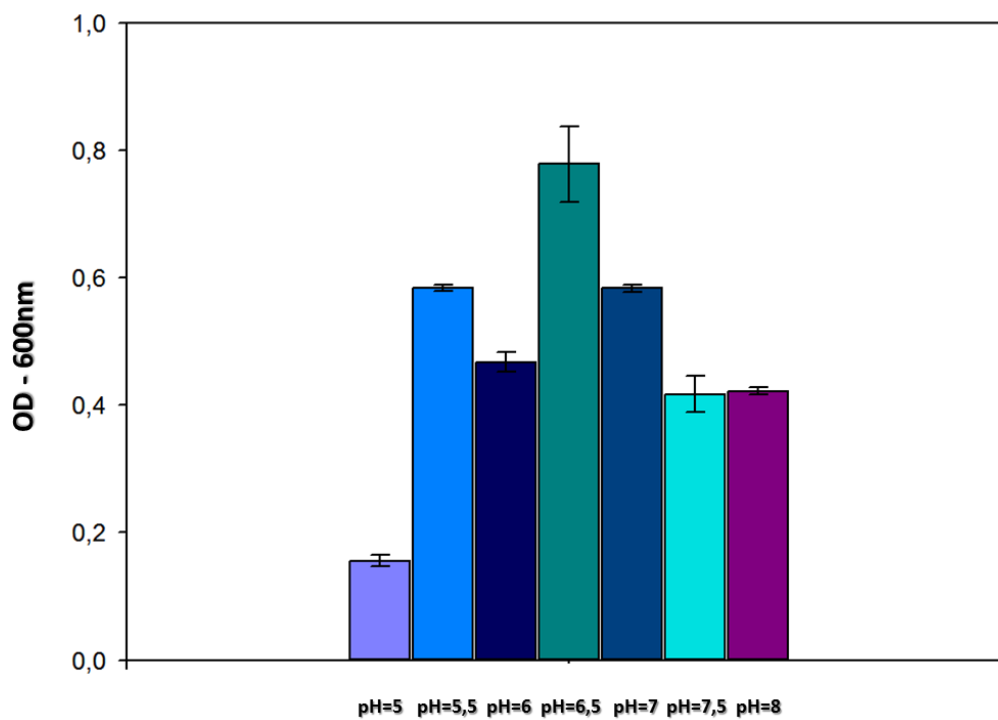
Για την εύρεση του βέλτιστου pH ανάπτυξης των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών του γένους των γεωβακίλλων, χρησιμοποιήθηκε το υγρό θρεπτικό μέσο DCS από την ερευνητική εργασία των Shoham et al, 1993, με πηγή άνθρακα την γλυκόζη. Η επώαση των μικροοργανισμών διάρρησε 2 μέρες, με $V_{\text{καλλιέργειας}}=30\text{ml}$ και $5\text{gC/L}_{\text{καλλιέργειας}}$ ($0,15\text{gC}/30\text{ml}_{\text{καλλιέργειας}}$), ενώ η θερμοκρασία επώασης ήταν 60°C , με παροχή ατμοσφαιρικού αέρα. Αξίζει να σημειωθεί πως το pH της καλλιέργειας πέφτει όταν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν υδατάνθρακες, με αποτέλεσμα να διακόπτεται η φυσιολογική τους ανάπτυξη και να υπάρχει μία στασιμότητα όσον αφορά την περαιτέρω κατανάλωση υδατανθράκων.

Είναι αναγκαίο λοιπόν να διατηρείται το pH σταθερό, για να μπορέσουμε να έχουμε μία σαφή εικόνα για το ποια τιμή pH είναι η καταλληλότερη (βέλτιστη) για την ανάπτυξη των υπό μελέτη βακτηρίων. Για αυτόν τον λόγο προσθέτουμε στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας διάφορα φωσφορικά (PO_4^{3-}) (συγκέντρωση φωσφορικών: 100mM), δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Το συγκεκριμένο πείραμα και για τα δύο στελέχη γεωβακίλλων SP24 / SP50 (ουδετερόφιλοι) έδειξε να έχουν κοίνο εύρος ανάπτυξης, από pH 5.00 έως και 8.00 (pH range). Από την επεξεργασία των δεδομένων του κάθε στελέχους με το πρόγραμμα SigmaPlot, με την έρευνα του μ_{max} για κάθε pH, φάνηκε ότι το βέλτιστο pH ανάπτυξης για το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 είναι 6.50, όπως και για το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24.

OD - pH	t=0h/sp24	t=48h/sp24	Average t=48h	Error	t=0h/sp50	t=48h/sp50	Average t=48h	Error
pH=5	0,041	0,172	0,1745	0,003	0,036	0,149	0,1555	0,009
pH=5	0,043	0,177			0,038	0,162		
pH=5,5	0,058	0,627	0,6105	0,023	0,048	0,587	0,584	0,004
pH=5,5	0,066	0,594			0,049	0,581		
pH=6	0,075	0,554	0,5535	0,000	0,079	0,479	0,468	0,015
pH=6	0,079	0,553			0,073	0,457		
pH=6,5	0,092	0,838	0,8765	0,054	0,084	0,821	0,779	0,059
pH=6,5	0,09	0,915			0,083	0,737		
pH=7	0,092	0,588	0,541	0,066	0,091	0,579	0,5835	0,006
pH=7	0,091	0,494			0,092	0,588		
pH=7,5	0,101	0,411	0,4	0,015	0,093	0,397	0,417	0,028
pH=7,5	0,095	0,389			0,098	0,437		
pH=8	0,104	0,401	0,4065	0,007	0,104	0,426	0,422	0,005
pH=8	0,103	0,412			0,103	0,418		

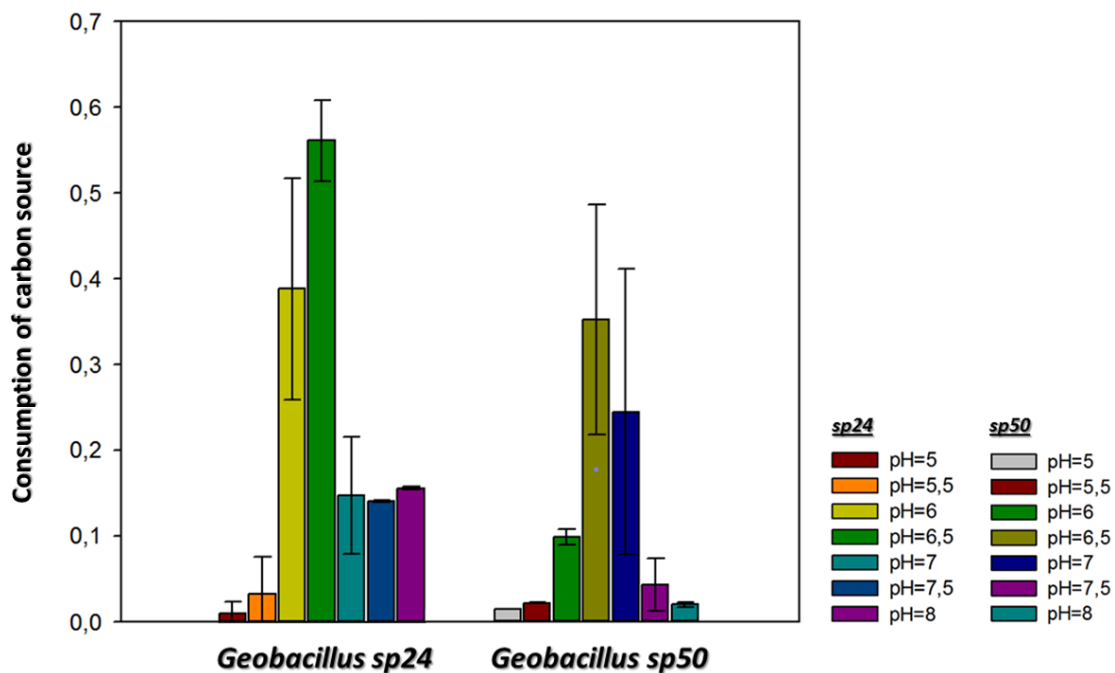


ΓΡΑΦΗΜΑ 5: Παρουσιάζεται η οπτική πυκνότητα για το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24, σε διαφορετικά pH στους 60°C για 48h (2days).



ΓΡΑΦΗΜΑ 6: Παρουσιάζεται η οπτική πυκνότητα για το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50, σε διαφορετικά pH στους 60°C για 48h (2days).

OD - DNS	t=0h/sp24	t=48h/sp24	Consumption t=48h	Average t=48h	Error	t=0h/sp50	t=48h/sp50	Consumption t=48h	Average t=48h	Error
pH=5	1,411	1,381	2%	1%	0,013	1,638	1,615	1,41%	1,40%	4,949
pH=5	1,441	1,438	0,21%			1,712	1,688	1,40%		
pH=5,5	1,339	1,321	0,13%	3,19%	0,043	1,511	1,477	2,19%	2,17%	0,000
pH=5,5	1,473	1,381	6,24%			1,647	1,611	2,15%		
pH=6	1,623	0,845	47,93%	38,81%	0,129	1,365	1,222	10,47%	9,85%	0,008
pH=6	1,486	1,045	29,67%			1,518	1,378	9,22%		
pH=6,5	1,526	0,619	59,43%	56,11%	0,047	1,466	1,089	25,71%	35,20%	0,134
pH=6,5	1,491	0,704	52,78%			1,547	0,854	44,68%		
pH=7	1,541	1,389	9,86%	14,71%	0,068	1,653	1,054	36,23%	24,44%	0,166
pH=7	1,385	1,114	19,56%			1,501	1,311	12,65%		
pH=7,5	1,315	1,129	14,14%	14,04%	0,001	1,406	1,316	6,42%	4,27%	0,030
pH=7,5	1,435	1,235	13,93%			1,368	1,339	2,11%		
pH=8	1,364	1,153	15,46%	15,58%	0,001	1,343	1,314	2,15%	1,95%	0,002
pH=8	1,306	1,101	15,69%			1,378	1,354	1,74%		



ΓΡΑΦΗΜΑ 7: Στο παραπάνω συνδυαστικό γράφημα παρατηρούμε πως τόσο το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24 όσο και το *Geobacillus* sp. SP50 παρουσιάζουν βέλτιστο pH ανάπτυξης γύρω στο pH=6,5. Και τα δύο στελέχη φαίνεται να αναπτύσσονται ικανοποιητικά, και σε σύγκριση από τα προηγούμενα γραφήματα της οπτικής πυκνότητας, σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH, από το 5,5 μέχρι το 7. Η μέγιστη OD των βακτηριακών στελεχών στο pH=6,5 ταυτίζεται με την μέγιστη κατανάλωση της πηγής άνθρακα [γλυκόζη-5g/L] στο pH=6,5.

Γ8. ΕΥΡΕΣΗ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ NaCl ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

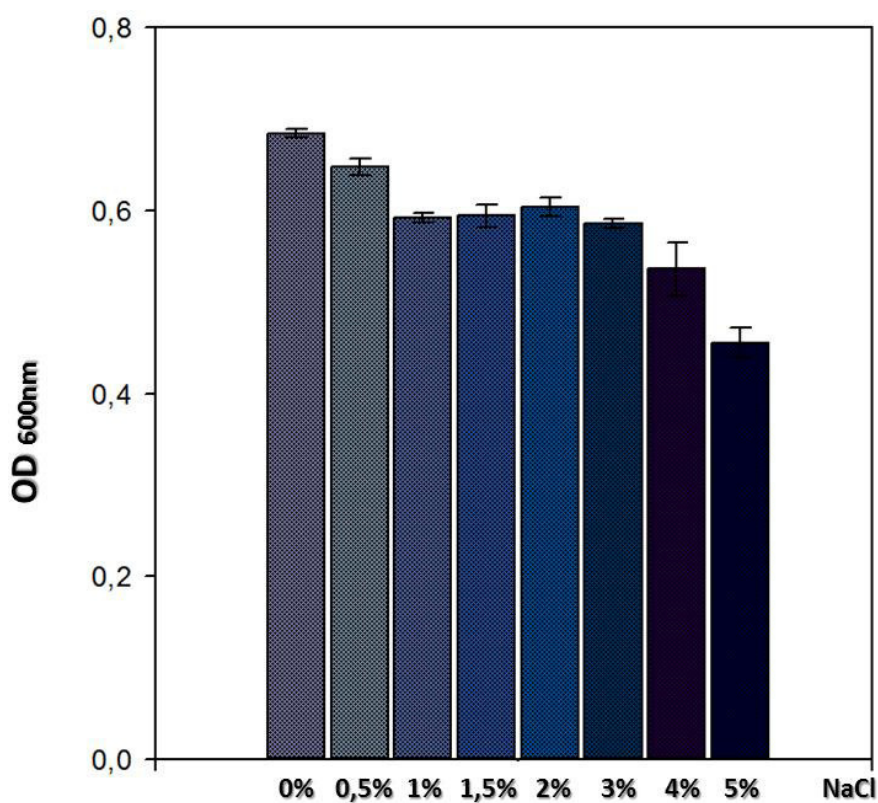
Τα συγκεκριμένα στελέχη *Geobacillus* sp. SP24 & SP50 προέρχονται όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας από την περιοχή της Νέας Καμένης στην Σαντορίνης, και μάλιστα από υδατινό περιβάλλον (NaCl~3,2/3,5%). Το υγρό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των στελεχών είναι το Medium Shoham (DCS), με πηγή άνθρακα την ξυλόζη (Xylose), αφού φαίνεται ότι με την χρήση Casamino acids (αμινοξέων) αντί Τρυπτόνης (μείγμα ολιγοπεπτιδίων και αμινοξέων) τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται καλύτερα παρουσία ξυλόζης. Το pH της καλλιέργειας είναι 6,5, ενώ η θερμοκρασία επώασης είναι 60°C, με παροχή ατμοσφαιρικού αέρα. Ο χρόνος επώασης είναι 3 μέρες (72h).

Η εύρεση της κατάλληλης αλατότητας είναι σημαντικό να εξεταστεί κυρίως για βιοτεχνολογικούς – βιομηχανικούς λόγους. Ελέγχθηκαν 8 διαφορετικές αλατότητες NaCl. Πιο αναλυτικά: 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 3%, 4% και 5%. Από την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας φάνηκε πως αν και θαλάσσια υδρόβια βακτήρια με μέσο όρο αλατότητας του φυσικού τους ενδιαιτήματος γύρω στο 3,35%, αναπτύσσονται καλύτερα σε μηδενική αλατότητα (0% NaCl). Ωστόσο, μέχρι 4% αλατότητα η επιβράνδυση – μείωση του ρυθμού ανάπτυξης είναι πολύ μικρός, με αισθητή απώλεια βιομάζας να παρατηρείται μετά την αύξηση της αλατότητας από 5% και άνω.

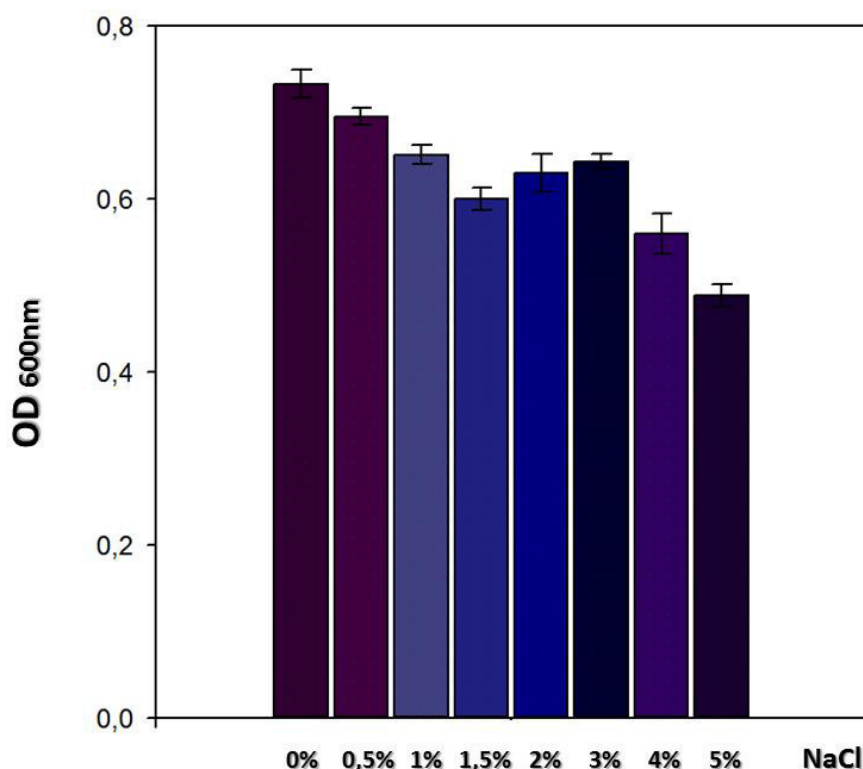
Επομένως και τα δυο στελέχη χαρακτηρίζονται ως αλοανθεκτικά.

Στα γραφήματα 8-9, παρουσιάζεται η οπτική πυκνότητα της βιομάζας των στελεχών *Geobacillus* sp. SP24 & SP50 αντίστοιχα, σε διάφορες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου [NaCl] μετά το πέρας των 72h [3days].

0%	0,50%	1%	1,50%	2%	3%	4%	5%	OD - t=72h
0,681	0,654	0,596	0,586	0,611	0,582	0,557	0,467	sp24 ₁
0,688	0,641	0,589	0,603	0,596	0,589	0,516	0,444	sp24 ₂
0,6845	0,6475	0,5925	0,5945	0,6035	0,5855	0,5365	0,4555	Average
0,004	0,009	0,004	0,012	0,010	0,004	0,028	0,016	Error
0,744	0,702	0,643	0,609	0,614	0,636	0,576	0,498	sp50 ₁
0,721	0,688	0,659	0,591	0,645	0,649	0,543	0,479	sp50 ₂
0,7325	0,695	0,651	0,6	0,6295	0,6425	0,5595	0,4885	Average
0,016	0,009	0,011	0,012	0,02	0,009	0,023	0,013	Error



ΓΡΑΦΗΜΑ 8: Οπτική πυκνότητα του βακτηριακού στελέχους *Geobacillus* sp. SP24 σε διάφορες συγκεντρώσεις NaCl.



ΓΡΑΦΗΜΑ 9: Οπτική πυκνότητα του βακτηριακού στελέχους *Geobacillus* sp. SP50 σε διάφορες συγκεντρώσεις NaCl.

Γ9. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SP50 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

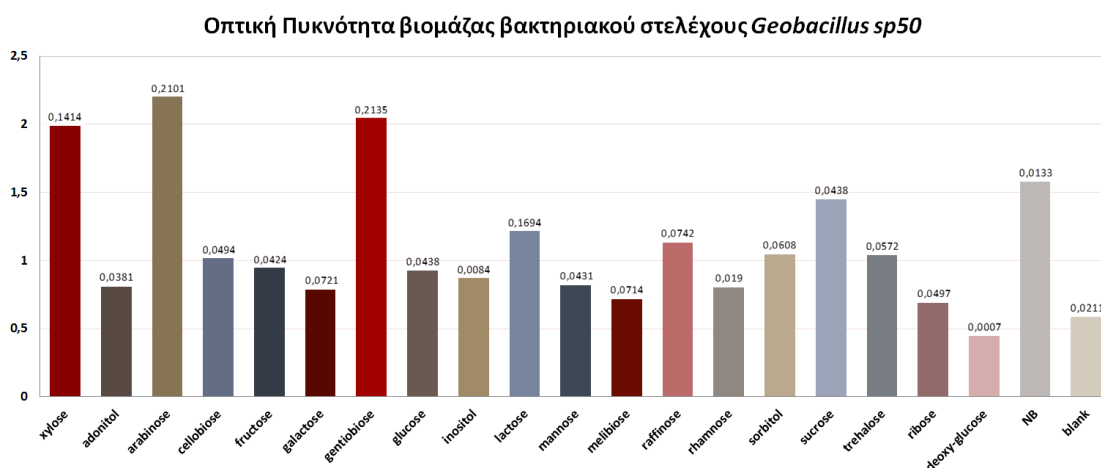
Το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 καλλιεργήθηκε σε διάφορες πηγές άνθρακα, με απώτερο στόχο να εξετάσουμε την δυνατότητα του να αναπτύσσεται σε διαφορετικά περιβάλλοντα.

Γενικά οι γεωβάκιλλοι μπορούν να καταβολίζουν διάφορες μορφές υδατανθράκων, εισάγοντας τους σε διάφορα στάδια του μονοπατιού της γλυκόλυσης. Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: D-Xylose, Adonitol, L-Arabinose, Cellobiose, D-Fructose, D-Galactose, Gentiobiose, α-D-Glucose, m-Inositol, α-Lactose, D-Mannose, D-Melibiose, D-Raffinose, L-Rhamnose, D-Sorbitol, Sucrose (Saccharose), D-Trehalose, D-Ribose και 2-Deoxy-D-Glucose. Η επώαση σε αυτές της πηγές άνθρακα έγινε για 2 μέρες, με παροχή ατμοσφαιρικού αέρα στο errendorf της εκάστοτε βακτηριακής καλλιέργειας του συγκεκριμένου στελέχους. Το pH της καλλιέργειας ήταν γύρω στο 6,5 και η θερμοκρασία επώασης ήταν 60°C. Το υγρό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήσαμε ήταν το medium DCS, με συγκέντρωση πηγής άνθρακα 8,4g/L (0,0100g_C/1,2ml_{καλλιέργειας}).

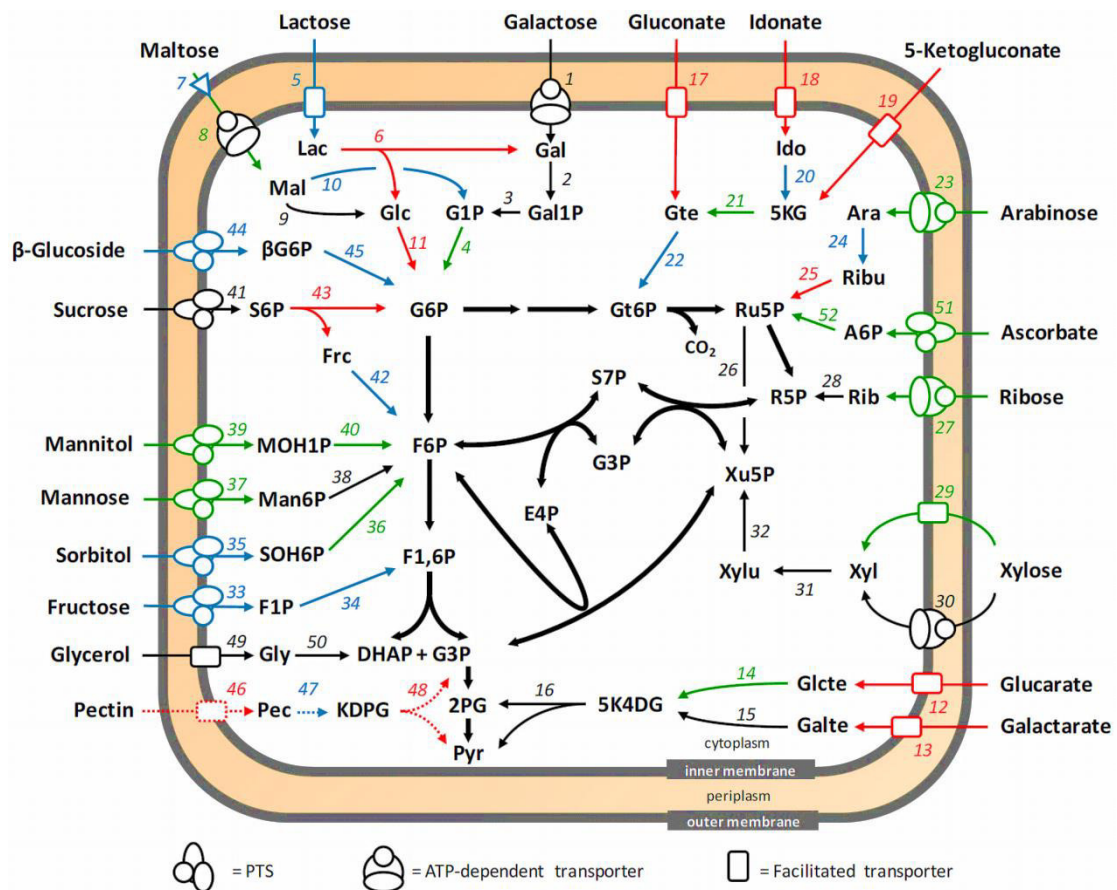
Από την επώαση που πραγματοποιήθηκε στις διάδορες πηγές άνθρακα έδειξε ότι το στέλεχος SP50 μπορεί και αναπτύσσεται ιδανικά σε 4 πηγές άνθρακα: a) Xylose, b) Arabinose, c) Gentiobiose, d) NB. Μικρότεροι ρυθμοί παραγωγής βιομάζας, αλλά ικανοποιητικοί, παρατηρήθηκαν με πηγή άνθρακα, όπως: a) Cellobiose, b) Fructose, c) Glucose, d) Lactose, e) Raffinose, f) Sorbitol, g) Sucrose, h) Trehalose, j) Inositol. Ακόμα μικρότερη παραγωγή βιομάζας, με το πέρας των 2 ημερών, παρατηρούμε σε πηγές άνθρακα, όπως a) Adonitol, b) Galactose, c) Mannose, d) Melibiose, e) Rhamnose, f) Ribose. Τέλος, σχεδόν μηδενική ανάπτυξη του στελέχους παρατηρούμε στην Deoxy-Glucose, και αυτό λόγω της αδυναμίας του βακτηρίου μάλλον να την καταβολίσει μέσω της γλυκόλυσης.

xylose	adonitol	arabinose	cellobiose	fructose	galactose	gentiobiose	glucose	inositol	lactose	OD - 600nm
2,085	0,835	2,352	0,985	0,915	0,836	1,893	0,955	0,875	1,333	t=37h
1,885	0,781	2,055	1,055	0,975	0,734	2,195	0,893	0,863	1,094	Dilution x5
1,985	0,808	2,2035	1,02	0,945	0,785	2,044	0,924	0,869	1,2135	Average
0,141	0,038	0,210	0,049	0,042	0,072	0,213	0,04	0,008	0,169	Error

mannose	melibiose	raffinose	rhamnose	sorbitol	sucrose	trehalose	ribose	deoxy-glucose	NB	blank	OD - 600nm
0,845	0,665	1,182	0,788	1,085	1,415	1,076	0,725	0,445	1,566	0,572	t=37h
0,784	0,766	1,077	0,815	0,999	1,477	0,995	0,655	0,444	1,585	0,601	Dilution x5
0,8145	0,7155	1,1295	0,8015	1,042	1,446	1,0355	0,69	0,4445	1,576	0,587	Average
0,043	0,071	0,074	0,019	0,060	0,043	0,057	0,049	0,0007	0,013	0,021	Error



ΓΡΑΦΗΜΑ 10: Απεικονίζεται η βιομάζα του βακτηριακού στελέχους *Geobacillus* sp. SP50 σε διάφορες πηγές άνθρακα, με επώαση για t=37h στους 60°C. Παρατηρούμε πως η καλύτερη ανάπτυξη του βακτηρίου πραγματοποιείται στη ξυλόζη, στην αραβινόζη, στην γκεντιοβιόζη και στην σουκρόζη [σακχαρόζη].



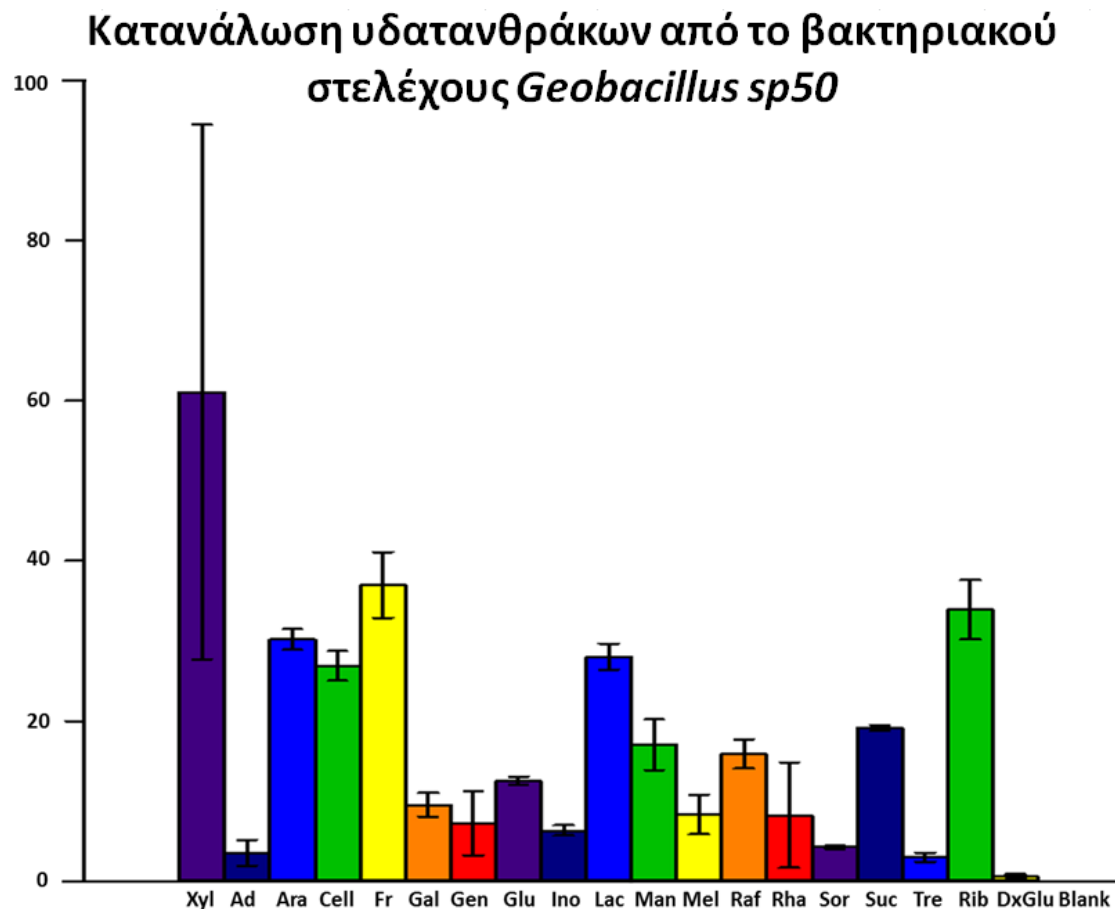
ΕΙΚΟΝΑ 13: Απεικόνιση της δυνατότητας του βακτηρίου *Geobacillus* sp. SP50 να εισάγει στο εσωτερικό του διάφορες πηγές άνθρακα, πέρα της γλυκόζης (**Αναπροσαρμογή από McKinlay et al, 2010**). Επιπλέον, παρουσιάζονται πιθανά μεταβολικά μονοπάτια των παραπάνω σακχάρων [sorbitol, mannose, sucrose, fructose, galactose, arabinose, ribose, xylose, glucose, mannitol, lactose, maltose] (**Garland and Mills, 1991**).

Xylose	+++
Adonitol	+
Arabinose	+++
Cellobiose	++
Fructose	++
Galactose	+
Gentiobiose	+++
Glucose	++
Inositol	+
Lactose	++
Mannose	+
Melibiose	+
Raffinose	++
Rhamnose	+
Sorbitol	++
Sucrose	++
Trehalose	++
Ribose	+
Deoxy-glucose	-
Nutrient Broth	+++
Blank	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Ποσοτική παρουσίαση της οπτικής πυκνότητας της βιομάζας του βακτηριακού στελέχους *Geobacillus* sp. SP50 σε διαφορετικές πηγές άνθρακα [σάκχαρα], μετά το πέρας περίπου 2 ημερών στους 60°C.

xylose	adonitol	arabinose	cellobiose	fructose	galactose	gentiobiose	glucose	inositol	lactose	DNS - 540nm
2,507	0,018	2,556	2,107	2,441	2,502	2,054	2,504	0,028	2,277	t ₁ =0h
2,444	0,015	2,538	2,151	2,396	2,552	2,077	2,374	0,025	2,222	t ₂ =0h
0,386	0,013	1,761	1,567	1,611	2,236	1,961	2,179	0,036	1,663	t ₁ =37h
1,527	0,007	1,793	1,544	1,438	2,334	1,867	2,089	0,041	1,571	t ₂ =37h
84,7	2,4	31,1	25,6	34,1	10,6	4,4	12,9	6,8	26,9	% consumption_1
37,5	4,7	29,3	28,2	39,9	8,5	10,1	12,2	5,9	29,2	% consumption_2
61,1	3,55	30,2	26,9	37	9,55	7,25	12,55	6,35	28,05	Average of consumption
33,375	1,626	1,272	1,838	4,101	1,484	4,030	0,494	0,6364	1,6263	Error

mannose	melibiose	raffinose	rhamnose	sorbitol	sucrose	trehalose	ribose	deoxy-glucose	blank	DNS - 540nm
2,529	2,094	0,198	2,556	0,024	0,002	0,009	1,678	1,606	0	t ₁ =0h
2,427	1,945	0,038	2,299	0,021	0,006	0,011	1,478	1,601	0	t ₂ =0h
2,032	1,882	0,836	2,226	0,039	0,283	0,068	1,065	1,594	0	t ₁ =37h
2,067	1,815	0,766	2,279	0,042	0,276	0,077	1,014	1,598	0	t ₂ =37h
19,3	10,1	14,6	12,9	4,1	18,9	2,6	36,5	0,8	0	% consumption_1
14,8	6,6	17,2	3,6	4,4	19,4	3,4	31,3	0,4	0	% consumption_2
17,05	8,35	15,9	8,25	4,25	19,15	3	33,9	0,6	0	Average of consumption
3,181	2,474	1,838	6,576	0,212	0,353	0,565	3,677	0,282	0	Error



ΓΡΑΦΗΜΑ 11: Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζεται η κατανάλωση των διαφόρων υδατανθράκων που χρησιμοποιήθηκαν από το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50. Παρατηρούμε πως η κατανάλωση των διαφόρων πηγών άνθρακα διαφέρει, με την μέγιστη κατανάλωση να παρατηρείται στην ξυλόζη, και να ακολουθούν η φρουκτόζη, η ριβόζη, η αραβινόζη, η σελλοβιόζη, η λακτόζη, και η σουκρόζη. Στις υπόλοιπες πηγές άνθρακα, η κατανάλωση είναι μικρότερη, με την γλυκόζη, την μαννόζη και την ραφινόζη να ξεχωρίζουν. Διακρίνουμε επίσης, πως υπάρχει μία αντιστοιχία ανάμεσα στην κατανάλωση των διαφόρων πηγών άνθρακα και στην αύξηση της βιομάζας του βακτηριακού στελέχους *Geobacillus* sp. SP50.

Γ10. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ SP24 & SP50 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

Τα δύο στελέχη του γένους *Geobacillus* μελετήθηκαν ως προς 4 διαφορετικές πηγές άνθρακα, με στόχο να παρατηρήσουμε πιθανές αλλαγές στην ανάπτυξή τους. Οι πηγές άνθρακα είναι οι εξής: CMC (Carboxy-methyl-cellulose), Xylose, Glucose, και Cellobiose. Με θρεπτικό μέσο DCS, με χρήση Casamino acids, pH=6,5, [C_{ανθρακα}]=5g/L & T_{επώασης}=60°C, και τα δύο στελέχη καταναλώνουν περίπου το 95% της ξυλόζης, το 58% της γλυκόζης και το 63% της σελλοβιόζης με χρόνο επώασης περίπου 72h (3days). Αντίθετα όταν με θρεπτικό μέσο DCS, χρησιμοποιούμε τρυπτόνη αντί αμινοξέων (Casamino acids), με pH=6,5, [C_{ανθρακα}]=5g/L & T_{επώασης}=60°C, τότε βλέπουμε διαφοροποίηση στην κατανάλωση των διαφόρων πηγών άνθρακα από τα δύο στελέχη. Πιο αναλυτικά, το *Geobacillus* sp. SP50 καταναλώνει στις 3 μέρες περίπου το 80% της γλυκόζης, το 50% της ξυλόζης και το 30% της σελλοβιόζης, ενώ το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24 καταναλώνει το 35% της ξυλόζης, το 27% της γλυκόζης και το 24% περίπου της σελλοβιόζης.

Από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα εξάγεται το συμπέρασμα – υπόθεση πως με την παροχή αμινοξέων (casamino acids) και τα δύο στελέχη εμφανίζουν παρόμοιες οπτικές απορροφήσης – βιομάζα, ενώ επιβεβαιώνεται πως η ξυλόζη προτιμάται από τους γεωβάκιλλους, έχοντας περισσότερους μεταφορείς ξυλόζης, αφού παράγουν κυρίως ξυλανάσες (*το στέλεχος SP50 φαίνεται να παράγει μία μόνο κυτταρινάση [ενδο-γλυκανάση]). Έτσι η μεταφορά και κατανάλωση της γλυκόζης και της σελλοβιόζης είναι χαμηλότερη. Όταν όμως στο θρεπτικό μέσο τα αμινοξέα λιγοστεύουν, γιατί η τρυπτόνη όπως και η πεπτόνη αποτελούνται από μείγμα αμινοξέων με ολιγοπεπτιδίων σε τυχαία αναλογία, παρατηρούμε πως το *Geobacillus* sp. SP50 σε σύγκριση με το στέλεχος 24 μπορεί να καταναλώνει πεερισσότερη ενέργεια (π.χ. γλυκόζη), παράγοντας εξωκυτταρικά πιθανόν επιπλέον διάφορες πρωτεάσες για την περαιτέρω διάσπαση των ολιγοπεπτιδίων της τρυπτόνης, σε αντίθεση με το SP24 που λόγω έλλειψης αμινοξέων, πέφτει και η κατανάλωση των διαφόρων υδατανθράκων, με συνέπεια να μειώνεται και η παραγώμενη βιομάζα.

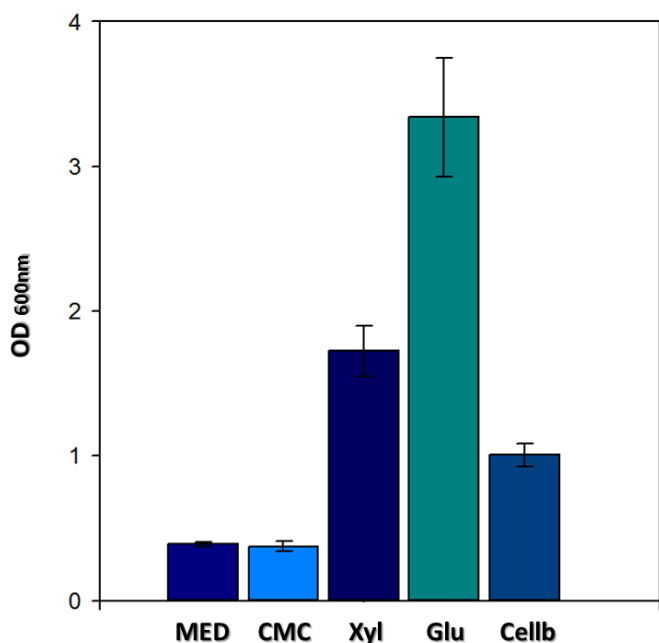
Αυτό δείχνει μία μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα του SP50 έναντι του SP24, κάτω από stress έλλειψης αμινοξέων. Βλέπουμε λοιπόν πως και τα 2 στελέχη απουσία αμινοξέων (Tryptone ή Casamino acids), μόνο με άλατα στο θρεπτικό μέσο, όπως NH₄NO₃ & (NH₄)₂SO₄, δεν παράγουν αμινοξέα. Αντίθετα σε πλήρη θρεπτικά μέσα (π.χ. NB), το στέλεχος 24 αναπτύσσεται καλύτερα από το στέλεχος 50, κάνοντας μεγαλύτερες αποικίες και κατά προέκταση περισσότερη βιομάζα. Πρέπει να τονιστεί πως η γλυκόζη είναι πιο εύκολο να μπει στο μονοπάτι της γλυκόλυσης σε σχέση με την ξυλόζη που απαιτεί επιπλέον ενζυμικά βήματα για την είσοδό της στο

μονοπάτι. Δηλαδή, με έλλειψη αμινοξέων δεν παράγονται οι πρωτεΐνες που απαιτούνται, άρα η κατανάλωση της ξυλόζης μειώνεται, ενώ και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις διάφορες ενεργειακές διαδικασίες ελαττώνονται, μειώνοντας περαιτέρω την παραγωγή ATP (ενέργειας του βακτηριακού κυττάρου).

Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί πως η κατανάλωση σελλοβιόζης και στα 2 στελέχη είναι σχεδόν ίδια κατά την χρήση τρυπτόνης ως πηγής αμινοξέων (πηγή αζώτου), όπως και η βιομάζα τους (OD). Όσον αφορά την κατανάλωση του CMC στα 2 στελέχη, φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στο *Geobacillus* sp. SP50, παρόλο που δεν μπορεί να μετρηθεί με την μέθοδο DNS, τα ελεύθερα αναγωγικά σάγγαχα αυξάνονται σχεδόν 7 με 8 φορές στο στέλεχος 50 σε σύγκριση με το στέλεχος 24, αν και μεγάλη αύξηση της απορρόφησης δεν παρατηρείται (από κίτρινο χρώμα το διάλυμα μέτρησης μετατρέπεται σε ελαφρώς πορτοκαλί), αφού τα προκύψαντα αναγωγικά σακχάρων (π.χ. γλυκόζης, σελλοβιόζης) από την διάσπαση της CMC-κυτταρίνης εισάγονται μέσα στο βακτήριο. Βέβαια, είναι αξιωματικό πως η παραγόμενη βιομάζα του στελέχους 50 είναι ελάχιστα μεγαλύτερη σε σχέση με το στέλεχος 24, και αυτό μπορεί να εξηγηθεί γιατί το SP24 αν και δεν είναι σε θέση να αποικοδομήσει την κυτταρίνη, μπορεί να έχει υψηλότερους ρυθμούς μεταβολισμού των αμινοξέων (Klenk et al, 1998) από την τρυπτόνη για παράδειγμα, παράγοντας ενέργεια από την «καύση» τους (Bertin et al, 2011), ισοβαθμίζοντας έτσι την βιομάζα του με την βιομάζα του SP50. Πρέπει να σημειωθεί πως δεν πρόκειται για ικανοποιητικές ποσότητες παραγόμενων βιομαζών και για τα 2 στελέχη με πηγή άνθρακα το CMC, αφού είναι μικρότερες κατά 3 με 5 φορές μικρότερες από τις αντίστοιχες βιομάζες των στελεχών με πηγή άνθρακα γλυκόζη ή ξυλόζη.

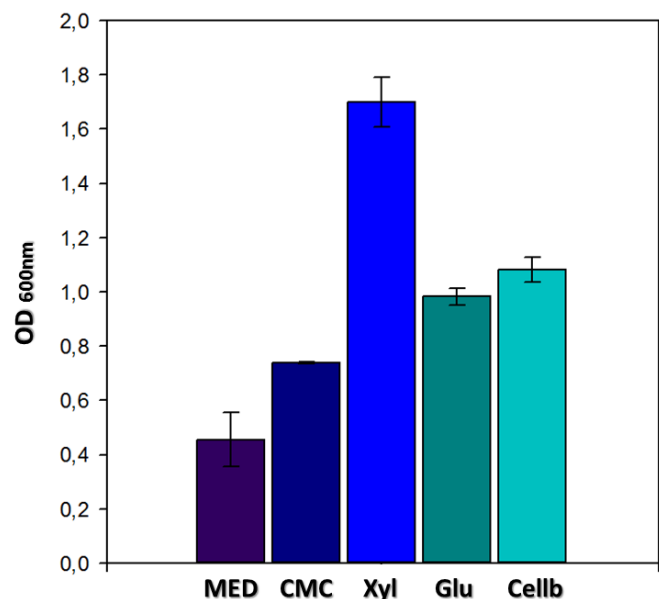
Τέλος, κάτω από stress το *Geobacillus* sp. SP50 έχει 3,5 φορές μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας, δείχνοντας πως η παραγωγή της συγκεκριμένης CMCάσης GH5, και η κατ'επέκταση αποδόμηση της κυτταρίνης εκτός των άλλων και σε γλυκόζη, έχει οδηγήσει εξελικτικά το βακτήριο στην μεγαλύτερη παραγωγή των υποδοχέων γλυκόζης. Αντίθετα, το *Geobacillus* sp. SP24, που δεν διαθέτει κυτταρινάση δεν μπορεί να εισάγει γλυκόζη σε τέτοια ποσοστά όπως το στέλεχος SP50, με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρότερη ανάπτυξη του στελέχους.

Medium1	Medium2	CMC1	CMC2	Xyl1	Xyl2	Glu1	Glu2	Cellb1	Cellb2	G. sp50
0,061	0,063	0,062	0,063	0,061	0,062	0,062	0,061	0,063	0,064	t ₁ =0h [ΑΝΑΡΑΙΩΤΑ]
0,4	0,38	0,4	0,35	1,6	1,85	3,63	3,05	1,06	0,95	t ₂ =72h [ΑΡΑΙΩΣΗ Χ10]
0,062		0,0625		0,0615		0,0615		0,0635		t ₁ =0h Average
0,39		0,375		1,725		3,34		1,005		t ₂ =72h Average
0,0014		0,0007		0,0007		0,0007		0,0007		Error t ₁
0,014		0,035		0,176		0,410		0,0777		Error t ₂



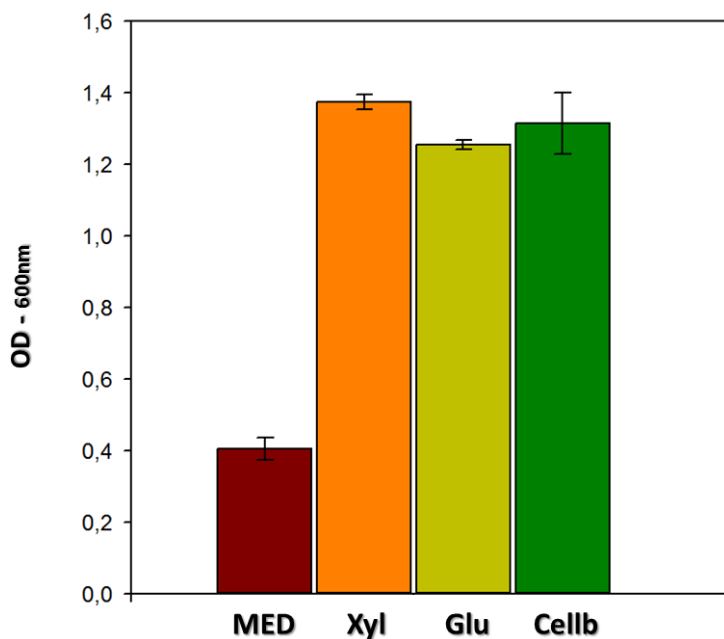
ΓΡΑΦΗΜΑ 12: Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζεται η OD για το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 σε διάφορες πηγές άνθρακα (Xylose, Glucose, Cellobiose), και με κύρια πηγή αζώτου τρυπτόνη-πεπτόνη (tryptone-peptone).

Medium1	Medium2	CMC1	CMC2	Xyl1	Xyl2	Glu1	Glu2	Cellb1	Cellb2	G.sp24
0,097	0,096	0,097	0,099	0,091	0,101	0,099	0,1	0,103	0,104	t ₁ =0h [ΑΝΑΡΑΙΩΤΑ]
0,385	0,525	0,74	0,735	1,635	1,765	0,96	1,005	1,05	1,115	t ₂ =72h [ΑΡΑΙΩΣΗ Χ5]
0,0965		0,098		0,0995		0,0995		0,1035		t ₁ =0h Average
0,455		0,7375		1,7		0,9825		1,0825		t ₂ =72h Average
0,0671		0,0014		0,078		0,0007		0,0007		Error t ₁
0,098		0,003		0,0919		0,031		0,045		Error t ₂



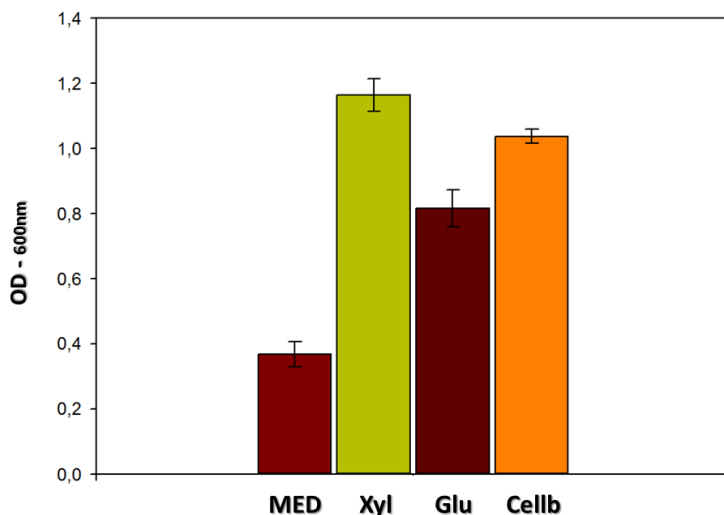
ΓΡΑΦΗΜΑ 13: Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζεται η OD για το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24 σε διάφορες πηγές άνθρακα (Xylose, Glucose, Cellobiose), και με κύρια πηγή αζώτου τρυπτόνη-πεπτόνη (tryptone-peptone).

Medium1	Medium2	Xyl1	Xyl2	Glu1	Glu2	Cellb1	Cellb2	G.sp24
0,091	0,097	0,126	0,117	0,108	0,115	0,119	0,114	t ₁ =0h [ΑΝΑΠΑΙΩΤΑ]
0,381	0,425	1,355	1,385	1,245	1,263	1,254	1,374	t ₂ =72h [ΑΠΑΙΩΣΗ Χ5]
0,094		0,1215		0,1115		0,1165		t ₁ =0h Average
0,403		1,374		1,254		1,314		t ₂ =72h Average
0,004		0,006		0,004		0,003		Error t ₁
0,031		0,021		0,012		0,084		Error t ₂



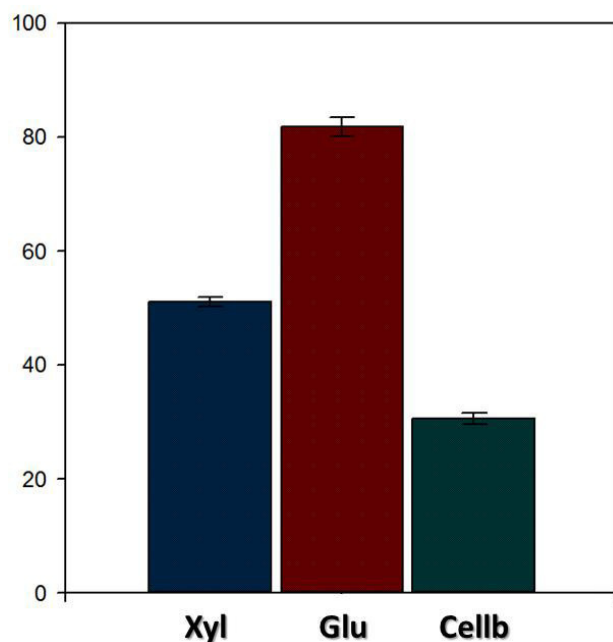
ΓΡΑΦΗΜΑ 14: Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζεται η OD για το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24 σε διάφορες πηγές άνθρακα (Xylose, Glucose, Cellobiose), και με κύρια πηγή αζώτου Casamino acids (αμινοξέα).

Medium1	Medium2	Xyl1	Xyl2	Glu1	Glu2	Cellb1	Cellb2	G.sp50
0,094	0,095	0,111	0,117	0,107	0,109	0,107	0,108	t ₁ =0h [ΑΝΑΠΑΙΩΤΑ]
0,341	0,395	1,125	1,195	0,855	0,775	1,045	1,015	t ₂ =72h [ΑΠΑΙΩΣΗ Χ5]
0,0945		0,114		0,108		0,1075		t ₁ =0h Average
0,368		1,164		0,815		1,037		t ₂ =72h Average
0,0007		0,004		0,001		0,0007		Error t ₁
0,038		0,049		0,056		0,021		Error t ₂



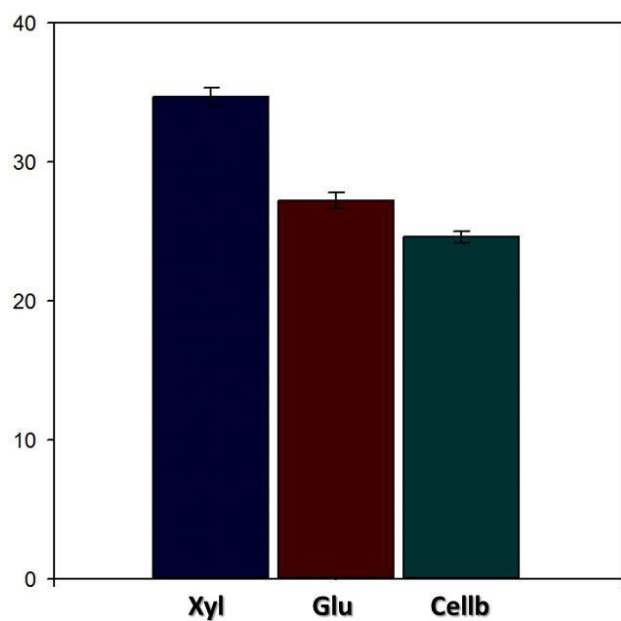
ΓΡΑΦΗΜΑ 15: Στο παραπάνω γράφημα απεικονίζεται η OD για το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 σε διάφορες πηγές άνθρακα (Xylose, Glucose, Cellobiose), και με κύρια πηγή αζώτου Casamino acids (αμινοξέα).

Medium ₁	Medium ₂	CMC ₁	CMC ₂	Xyl ₁	Xyl ₂	Glu ₁	Glu ₂	Cellb ₁	Cellb ₂	<i>Geobacillus sp50</i>
0,008	0,009	0,007	0,009	1,365	1,635	1,357	1,299	1,324	1,274	t ₁ =0h
0,019	0,012	0,077	0,073	0,777	0,832	0,306	0,247	0,945	0,889	t ₂ =72h
				50,5		80,6		29,8		Consumption 1
				51,7		82,9		31,2		Consumption 2
				51,1		81,75		30,5		Average Consumption
				0,848		1,626		0,985		Error of Average Consumption



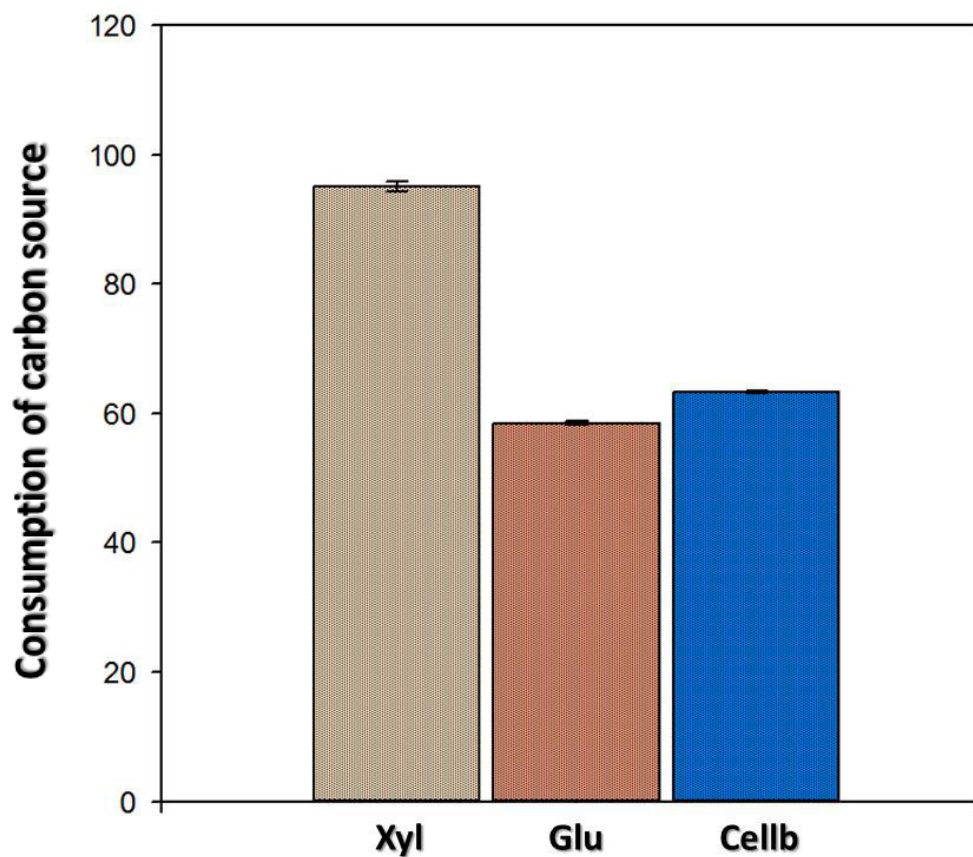
ΓΡΑΦΗΜΑ 16: Το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 καταναλώνει το 51% της Ξυλόζης, το 82% της Γλυκόζης και το 31% περίπου της Σελλοβιόζης στις 3 μέρες [5g/L πηγής C] σε υγρό θρεπτικό μέσο DCS με Tryptone.

Medium ₁	Medium ₂	CMC ₁	CMC ₂	Xyl ₁	Xyl ₂	Glu ₁	Glu ₂	Cellb ₁	Cellb ₂	<i>Geobacillus sp24</i>
0,002	0,003	0,005	0,006	1,767	1,892	1,777	1,786	1,423	1,401	t ₁ =0h
0,005	0,007	0,012	0,009	1,191	1,177	1,306	1,309	1,111	1,045	t ₂ =72h
				34,25		27,6		24,3		Consumption 1
				35,14		26,8		24,87		Consumption 2
				34,695		27,2		24,585		Average Consumption
				0,629		0,565		0,405		Error of Average Consumption



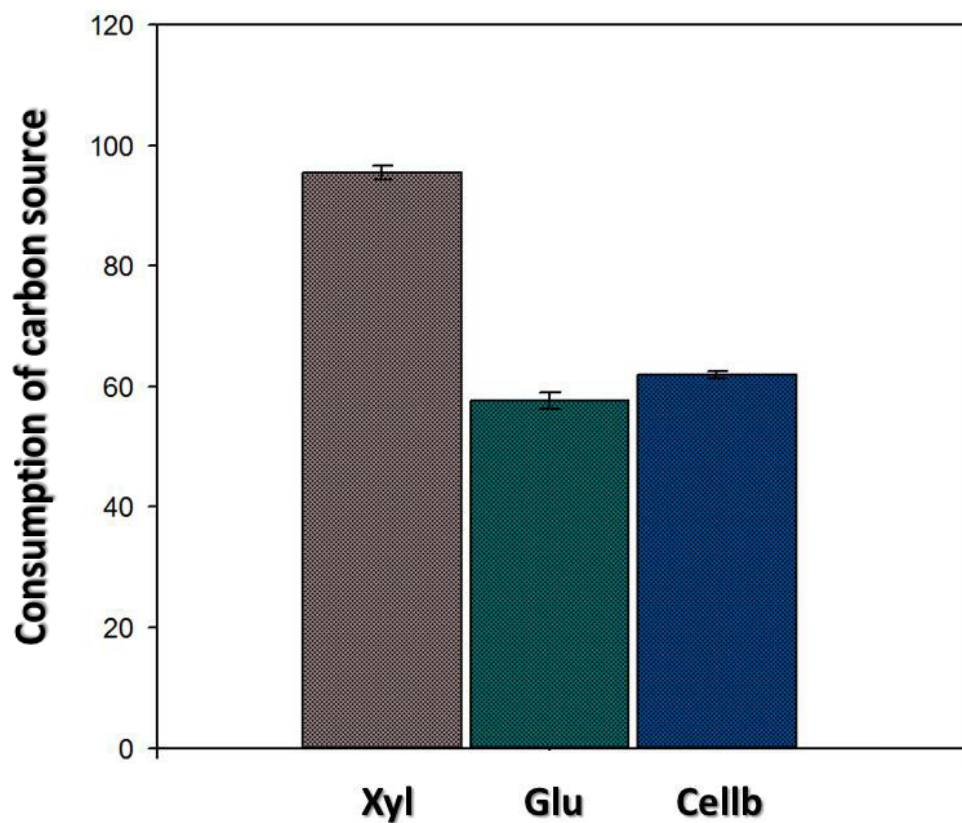
ΓΡΑΦΗΜΑ 17: Το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24 καταναλώνει το 35% της Ξυλόζης, το 27% της Γλυκόζης και το 25% περίπου της Σελλοβιόζης στις 3 μέρες [5g/L πηγής C] σε υγρό θρεπτικό μέσο DCS με Tryptone.

Medium ₁	Medium ₂	Xyl ₁	Xyl ₂	Glu ₁	Glu ₂	Cellb ₁	Cellb ₂	<i>Geobacillus sp24</i>
0,017	0,011	1,226	1,677	1,566	1,499	1,233	1,19	t ₁ =0h
0,009	0,004	0,052	0,056	0,57	0,642	0,427	0,447	t ₂ =72h
		94,56		58,25		63,24		Consumption 1
		95,61		58,65		63,44		Consumption 2
		95,085		58,45		63,34		Average Consumption
		0,742		0,282		0,141		Error of Average Consumption



ΓΡΑΦΗΜΑ 18: Το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP24 καταναλώνει το 95% της Ξυλόζης, το 58% της Γλυκόζης και το 63% περίπου της Σελλοβιόζης στις 3 μέρες [5g/L πηγής C] σε υγρό θρεπτικό μέσο DCS με Casamino acids.

Medium ₁	Medium ₂	Xyl ₁	Xyl ₂	Glu ₁	Glu ₂	Cellb ₁	Cellb ₂	<i>Geobacillus sp50</i>
0,013	0,009	1,237	1,314	1,401	1,482	1,149	1,107	t ₁ =0h
0,003	0,009	0,0057	0,063	0,625	0,617	0,449	0,406	t ₂ =69h
		94,56		58,54		62,34		Consumption 1
		96,27		56,69		61,54		Consumption 2
		95,415		57,615		61,94		Average Consumption
		1,209		1,308		0,565		Error of Average Consumption



ΓΡΑΦΗΜΑ 19: Το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 καταναλώνει το 95% της Ξυλόζης, το 58% της Γλυκόζης και το 62% περίπου της Σελλοβιόζης στις 3 μέρες [5g/L πηγής C] σε υγρό θρεπτικό μέσο DCS με Casamino acids. Παρουσία λοιπόν αμινοξέων, και τα δύο θερμοφιλά βακτηριακά στελέχη εμφανίζουν την ίδια κατανάλωση των τριών αυτών πηγών άνθρακα.

Γ11. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SP50 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

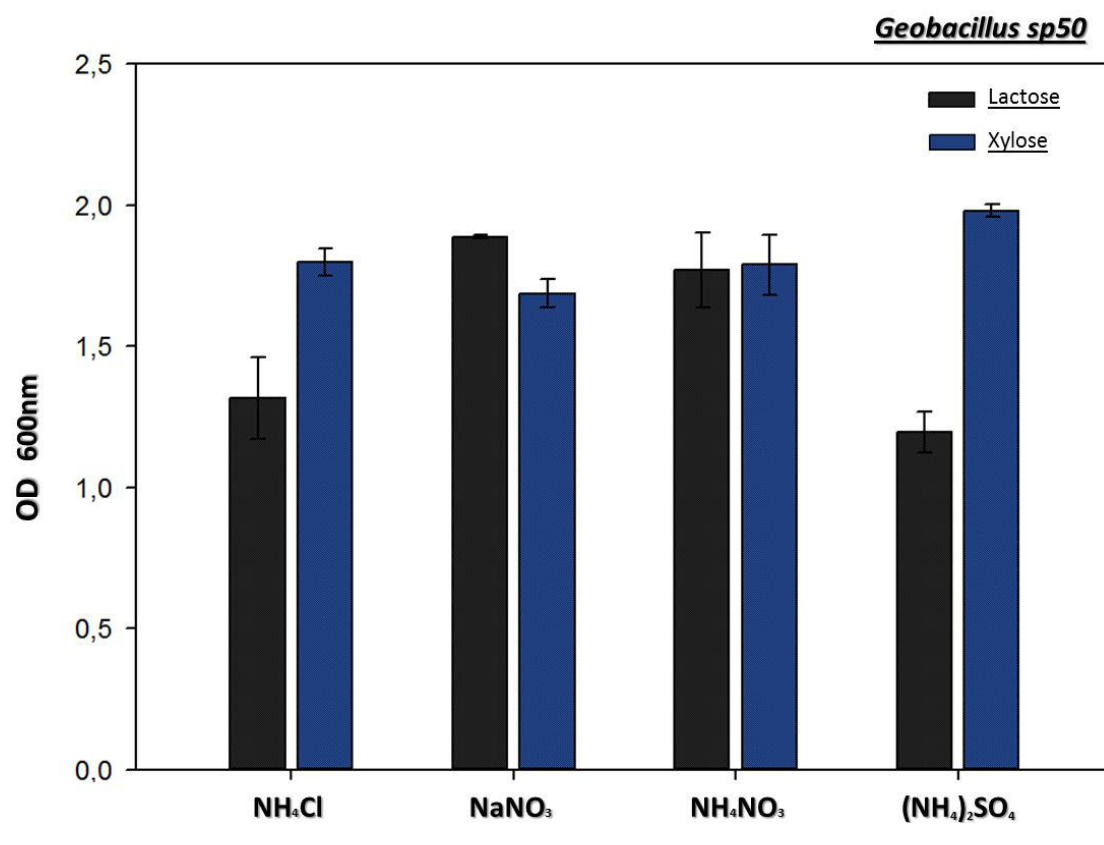
Μετά τον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε για διάφορες πηγές άνθρακα στο στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50, έγινε και έλεγχος διαφορετικών πηγών αζώτου. Για να μελετήσουμε την ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους σε διαφορετικές πηγές αζώτου, δεν χρησιμοποιήσαμε Casamino acids [αμινοξέα], αλλά αντικαταστήσαμε την συγκεκριμένη πηγή N₂ και το (NH₄)₂SO₄ του θρεπτικού DCS [Shoham] με ίδια ποσότητα [g] N [αζώτου], περιμένοντας να παράγει το βακτηριακό στέλεχος από μόνο του τα αμινοξέα που χρειαζόταν για την επιβίωσή του. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήσαμε ξυλόζη (μονοσακχαρίτη) ή λακτόζη (δισακχαρίτη), ενώ ως μοναδική πηγή αζώτου κάθε φορά είτε NH₄Cl, είτε NaNO₃, είτε NH₄NO₃, είτε τέλος (NH₄)₂SO₄ [Συνολική ποσότητα N₂: 0.9g – C_{άνθρακα}=0.5g/L].

Οι οπτικές πυκνότητες που παρατηρήθηκαν από το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 με πηγή άνθρακα την λακτόζη στις t=21h, ήταν ιδιαίτερα υψηλές παρουσία στο θρεπτικό NH₄NO₃, σε σχέση με τις άλλες πηγές αζώτου. Στις t=44h, οι OD που παρατηρήθηκαν τόσο με πηγή αζώτου το NaNO₃ όσο και το NH₄NO₃ ήταν πολύ μεγάλες σε σχέση με τις άλλες 2 πηγές αζώτου [NH₄Cl - (NH₄)₂SO₄], στις οποίες η οπτική πυκνότητα είναι χαμηλή και μετά τα πέρασ των 44h. Με πηγή άνθρακα την ξυλόζη, για χρόνο επώασης t=21h, η οπτική πυκνότητα του βακτηριακού στελέχους είναι η ίδια για όλες τις πηγές N₂. Ωστόσο, φαίνεται και στις 21h, αλλά και έπειτα στις 44h, παρουσία (NH₄)₂SO₄ παρατηρείται καλύτερη ανάπτυξη του στελέχους, αλλά σε γενικές γραμμές, η οπτική πυκνότητα [OD] του βακτηρίου στις 44h είναι περίπου η ίδια σε όλες τις πηγές αζώτου.

Όσον αφορά την κατανάλωση των πηγών άνθρακα στις δύο περιπτώσεις που μελετήσαμε, στην πρώτη περίπτωση, παρουσία λακτόζης [lactose] στο θρεπτικό μέσο και πηγής αζώτου NH₄NO₃, παρατηρήθηκε κατανάλωση της πηγής άνθρακα της τάξης του 65-70%, με το αποτέλεσμα αυτό να συμβαδίζει με την OD του βακτηριακού στελέχους. Η κατανάλωση της λακτόζης ήταν πολύ χαμηλή στις υπόλοιπες πηγές αζώτου [30-50% της κατανάλωσης της λακτόζης παρουσία NH₄NO₃]. Από την άλλη, παρουσία ξυλόζης, όλες οι καταναλώσεις της πηγής άνθρακα ήταν ίδιες στο χρόνο t=21h για όλες τις πηγές αζώτου. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως στις 44h παρουσία NaNO₃, έχουμε την μεγαλύτερη κατανάλωση της πηγής άνθρακα [ξυλόζη - xylose], ωστόσο ικανοποιητικά λειτούργησε και το NH₄NO₃ σαν πηγή N₂.

Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευτούν ως εξής: Από την προηγούμενη ενότητα που μελετήσαμε τις διάφορες πηγές αζώτου που μπορεί το *Geobacillus* sp. SP50 να αναπτύσσεται, διαπιστώσαμε ότι η μεγαλύτερη ανάπτυξη

του βακτηρίου (OD) και η μεγαλύτερη κατανάλωση στο σάκχαρο ως πηγή άνθρακα, ήταν στην περίπτωση της ξυλόζης. Η λακτόζη υπολειπόταν της ξυλόζης ως πηγής άνθρακα και στους δύο αυτούς τομείς. Πιθανότατα, οι μεταφορείς της λακτόζης είναι πιο λίγοι από της ξυλόζης, με αποτέλεσμα το βακτήριο να είναι πιο δύσκολο να εισάγει την λακτόζη σε σύγκριση με την ξυλόζη. Μάλιστα η ξυλόζη εισάγεται και μεταβολίζεται πιο εύκολα και από τη γλυκόζη, πιθανόν πάλι για τον ίδιο λόγο με την λακτόζη. Επομένως, όντας πιο δύσκολο να παράγει ενέργεια το βακτηριακό κύτταρο από την λακτόζη ως πηγή άνθρακα, φαίνεται πως προτιμά ως πηγή αζώτου το NH_4NO_3 , αφού με αυτόν τον τρόπο δεν εισάγει ένα μόνο N κάθε φορά όπως συμβαίνει με τις υπόλοιπες πηγές αζώτου, αλλά δύο N, κάνοντας εξοικονόμηση «ενέργειας», ώστε το ενεργειακό του ισοζύγιο να είναι αρκετό για την κάλυψη όλων των αναγκών του κυττάρου. Το άζωτο λοιπόν από το NH_4NO_3 , το βακτήριο το χρησιμοποιεί στην σύνθεση των αμινοξέων του και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών του, έχοντας για αυτόν τον λόγο μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα – ανάπτυξη. Το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ πιθανόν δεν προτιμάται λόγω του μεγέθους του (στερεοδιάταξη χημικής ένωσης) και εξαιτίας έλλειψης μεταφορέων. Παρουσία ξυλόζης, δεν υφίσταται ενεργειακό πρόβλημα, αφού η ξυλόζη εισάγεται στο κύτταρο με γρήγορο ρυθμό σε αντίθεση με την λακτόζη, πάντα σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, και για αυτόν τον λόγο τόσο η οπτική πυκνότητα όσο και η κατανάλωση της πηγής άνθρακα είναι ίδια περίπου παρουσία των διαφόρων πηγών αζώτου.

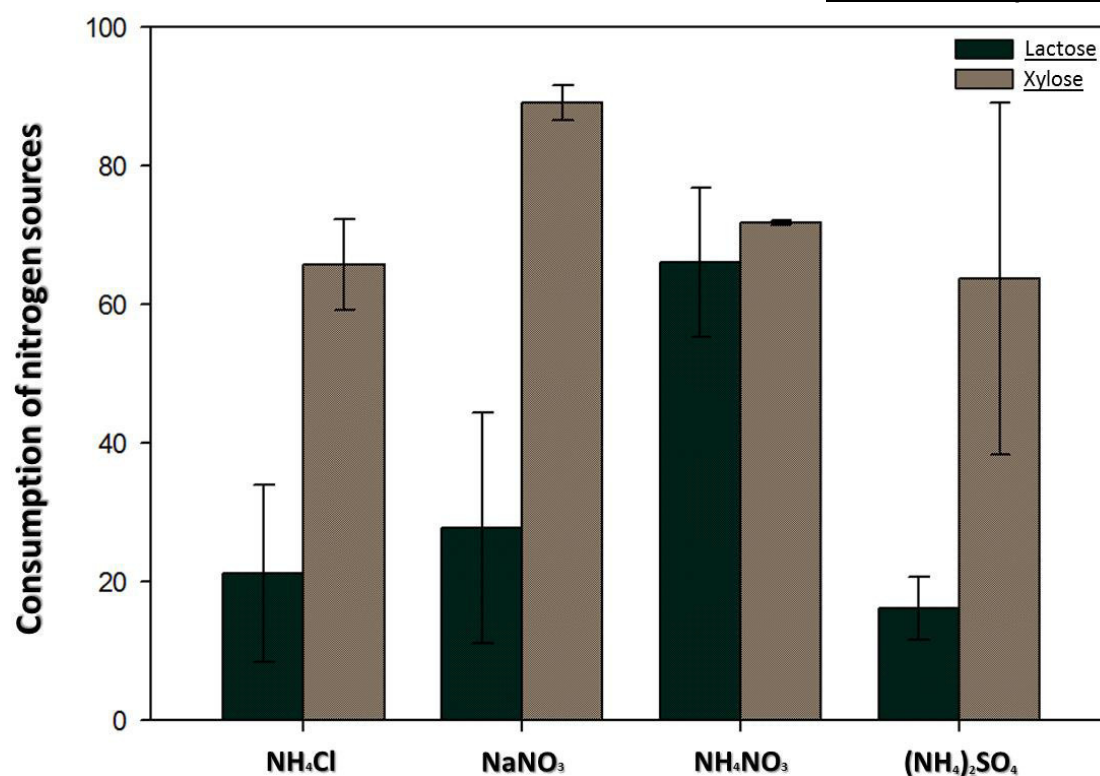


ΓΡΑΦΗΜΑ 20: Απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας του βακτηριακού στελέχους *Geobacillus* sp. SP50 σε διάφορες πηγές αζώτου, μετά το πέρας 2 ημερών [t=44h].

Lactose								Xylose								Time	OD Geobacillus sp50
NH4Cl		NaNO3		NH4NO3		(NH4)2SO4		NH4Cl		NaNO3		NH4NO3		(NH4)2SO4			
0,101	0,107	0,106	0,106	0,111	0,105	0,108	0,109	0,113	0,112	0,111	0,097	0,103	0,104	0,089	0,108	t=0h	
1,072	1,145	1,285	1,275	1,521	1,619	1,153	1,174	1,288	1,352	1,359	1,416	1,283	1,356	1,714	1,229	t=21h	
1,213	1,418	1,884	1,892	1,865	1,678	1,146	1,247	1,833	1,763	1,652	1,723	1,865	1,714	1,965	1,996	t=44h	
1,3155		1,888		1,7715		1,1965		1,798		1,6875		1,7895		1,9805		Average	
0,144		0,005		0,132		0,071		0,049		0,050		0,106		0,021		Error	

Lactose								Xylose								Time	OD Geobacillus sp50
NH4Cl		NaNO3		NH4NO3		(NH4)2SO4		NH4Cl		NaNO3		NH4NO3		(NH4)2SO4			
1,426	1,267	1,583	1,343	1,246	1,298	1,511	1,422	1,73	1,914	1,816	1,948	1,761	1,852	1,644	1,891	t=0h	
1,107	1,147	1,271	1,192	0,897	0,983	1,417	1,182	1311	1,294	0,996	1,238	1,053	1,255	1,266	1,682	t=21h	
0,995	1,113	0,957	1,127	0,327	0,538	1,314	1,146	0,671	0,567	0,164	0,247	0,492	0,526	0,891	0,345	t=44h	
30,2259		39,5451		73,7566		13,0374		61,2167		90,9624		72,0655		45,8059		Consumption t1=44h	
12,1545		16,0865		58,5516		19,4762		70,3755		87,3489		71,5935		81,7528		Consumption t2=44h	
21,1902		27,8158		66,1541		16,2568		65,7961		89,15565		71,8295		63,77935		Average	
12,778		16,587		10,751		4,552		6,476		2,555		0,333		25,418		Error	

***Geobacillus* sp. SP50**



ΓΡΑΦΗΜΑ 20: Απεικόνιση της κατανάλωσης διαφορετικών πηγών αζώτου από το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50, μετά το πέρας 2 ημερών [t=44h]. Παρατηρούμε πως και με τις δύο πηγές άνθρακα προτιμάται από το βακτήριο ως πηγή αζώτου κυρίως το NH₄NO₃, ενώ παρουσία ξυλόζης υφίσταται μέγιστη κατανάλωση της πηγής αζώτου NaNO₃.

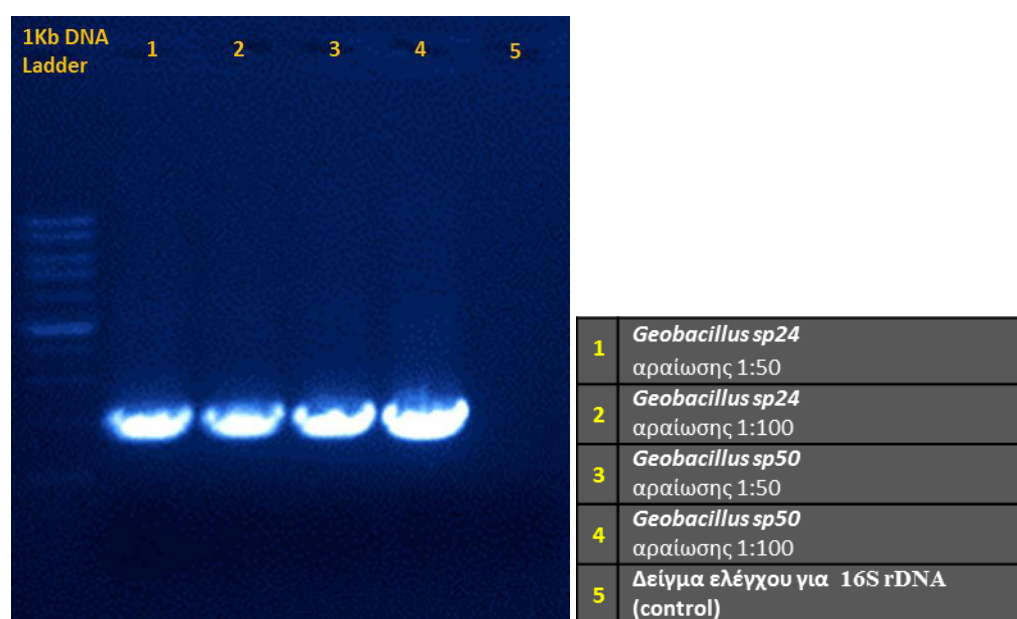
Γ12. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΩΒΑΚΙΛΛΩΝ

Οργανισμός	<u><i>Geobacillus</i> sp. SP24</u>	<u><i>Geobacillus</i> sp. SP50</u>
Ταξινόμηση	Επικράτεια <i>Βακτήρια</i>	Επικράτεια <i>Βακτήρια</i>
	Φύλο <i>Firmicutes</i>	Φύλο <i>Firmicutes</i>
	Κλάση <i>βακίλους</i>	Κλάση <i>βακίλους</i>
	Τάξη <i>Bacillales</i>	Τάξη <i>Bacillales</i>
	Οικογένεια <i>Bacillaceae</i>	Οικογένεια <i>Bacillaceae</i>
	Γένος <i>Geobacillus</i>	Γένος <i>Geobacillus</i>
	Είδος <i>Geobacillus thermoparaaffinovorans</i>	Είδος <i>Geobacillus thermoparaaffinovorans</i>
	Στέλεχος SP24	Στέλεχος SP50
Gram χρώση	Θετική	Θετική
Σχήμα των κυττάρων	Βάκιλλοι και αλυσίδες βακίλλων	Βάκιλλοι και αλυσίδες βακίλλων
Σποριογένεση	Σχηματισμός σπορίων	Σχηματισμός σπορίων
Εύρος θερμοκρασίας	50 έως 75 ° C	50 έως 75 ° C
Βέλτιστη θερμοκρασία	65 ° C	65 ° C
Εύρος pH	5,5 έως 8,0	5,5 έως 8,0
Βέλτιστο pH	6.5	6.5
Πηγή άνθρακα	Υδατάνθρακα ή πρωτεΐνη	Υδατάνθρακα ή πρωτεΐνη
Βιότοπος	Ιαματική πηγή	Ιαματική πηγή
Αλμυρότητα	0-5%	0-5%
Απαιτήση σε οξυγόνο	Αερόβιο - δυνητικά αναερόβιο	Αερόβιο - δυνητικά αναερόβιο
Βιοτικές σχέσεις	Ελεύθερη διαβίωση	Ελεύθερη διαβίωση
Παθογένεια	Μη-παθογόνο	Μη-παθογόνο
Γεωγραφική θέση	Νέα Καμένη Σαντορίνη, Ελλάδα	Νέα Καμένη Σαντορίνη, Ελλάδα
Συλλογή των δειγμάτων	Σεπτέμβριος 2004	Σεπτέμβριος 2004
Γεωγραφικό πλάτος	36.400.304	36.400.304
Γεωγραφικό μήκος	25.405.029	25.405.029

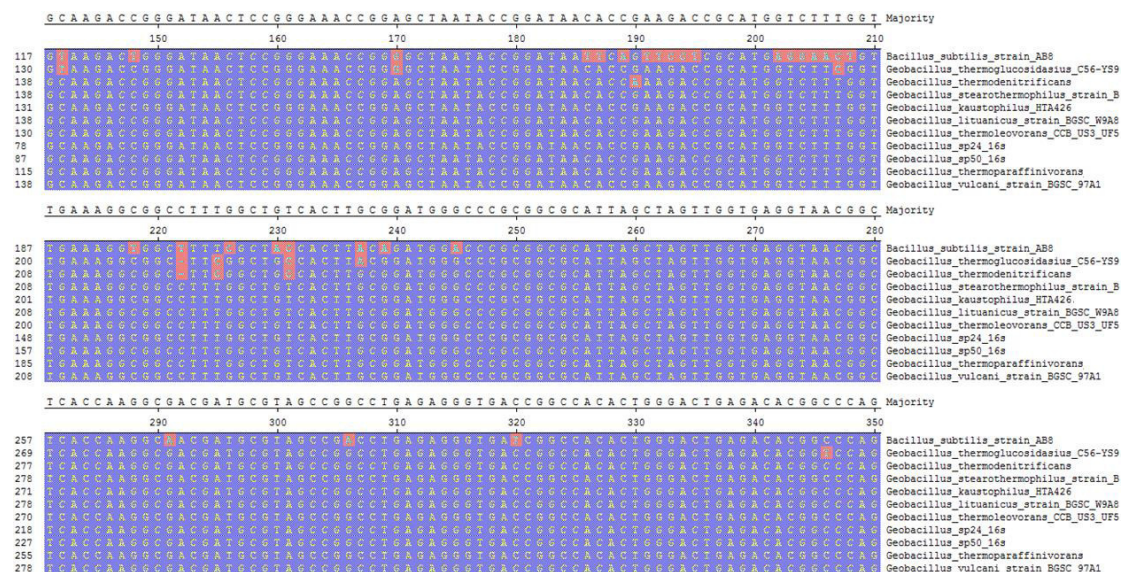
ΠΙΝΑΚΑΣ 11

Γ13. ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ 16S rDNA ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

Για την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών του γένους *Geobacillus* που μελετήσαμε στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της 16S rDNA γονιδιακής περιοχής, σε θερμοκρασία annealing $T=60^{\circ}\text{C}$, όπως προαναφέρθηκε προηγουμένως. Το μέγεθος των γονιδίων και για τα 2 στελέχη (SP24 / SP50) είναι γύρω στις 1400 βάσεις (1400bp – 1450bp). Έπειτα για την πλήρη ταυτοποίηση του έγινε και μορφολογική ταυτοποίηση των αποικιών του κάθε στελέχους. Ακολούθησαν στοιχίσεις των αλληλουχιών των γονιδίων 16S μεταξύ των δύο στελεχών, και βρέθηκε ότι ομοιάζουν σε ποσοστό 99,6%. Οι στοιχίσεις πραγματοποιήθηκαν με το ClustalOmega και το λογισμικό MegAlign (LaserGene). Αυτό δείχνει ότι οι δύο αυτοί γεωβάκιλλοι είναι εξελικτικά πολύ συγγενικοί, ανήκοντας μάλλον στο ίδιο είδος, καθώς φαίνεται να διαφέρουν όσον αφορά το 16S rDNA με άλλα είδη γεωβακίλλων, όπως τα είδη *Geobacillus thermoglucosidaci*, *Geobacillus thermodenitrificans* & *Geobacillus thermophiles*, ενώ φαίνεται να είναι πιο συγγενικά με τα *Geobacillus kaustophilus* και *Geobacillus thermoparaffinivorans*.



ΕΙΚΟΝΑ 14: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης μετά από τον εμπλουτισμό της 16S rDNA γονιδιακής περιοχής με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η θερμοκρασία συγκόλλησης είναι 60°C . Ο δείκτης αναφοράς (ladder) για τα μεγέθη στην ηλεκτροφόρηση είναι ο 1Kb DNA Ladder RTU. Για την ενίσχυση της 16S rDNA γονιδιακής περιοχής, χρησιμοποιήθηκαν ως εμπρόσθιος εκκινητής ο primer 27fw και ως ανάστροφος εκκινητής ο primer 1492rev.

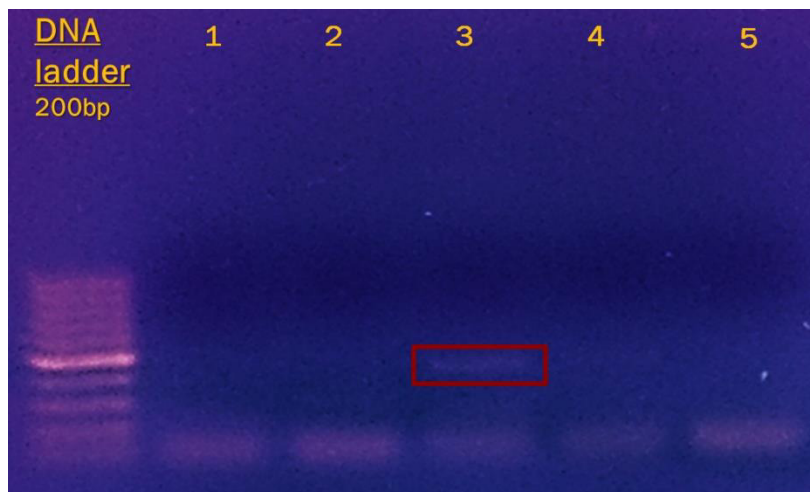


ΕΙΚΟΝΑ 15: Στην εικόνα απεικονίζεται το αποτέλεσμα της στοίχισης των αλληλουχιών της 16S rDNA γονιδιακής περιοχής των γεωβακίλλων που μελετήθηκαν φυλογενετικά. Με μπλε χρώμα στην στοίχιση υπογραμμίζονται τα κοινά νουκλεοτίδια, ενώ με κόκκινο αντίστοιχα σημειώνονται οι βάσεις, οι οποίες διαφέρουν στις 16S rDNA αλληλουχίες. Διαπιστώνουμε πως οι 16S rDNA αλληλουχίες των δύο βακτηριακών στελεχών *Geobacillus* sp. SP24 & SP50 είναι σε μεγαλύτερο βαθμό όμοιες με τους γεωβάκιλλους του κλάδο "*kaustophilus*".

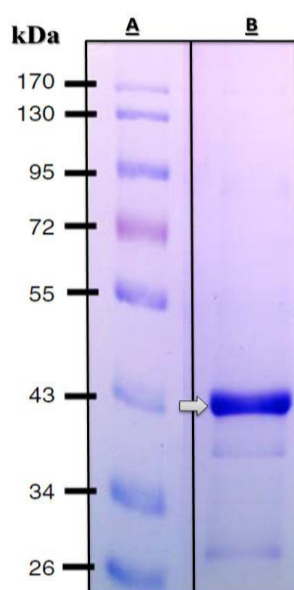
Γ14. ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΕΝΔΟ-ΓΛΟΥΚΑΝΑΣΗΣ CelA/GH5 ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ SP50

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφικός έλεγχος, και βρέθηκαν εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια από ένα γεωβάκιλλο στην Ιαπωνία, που όσον αναφορά την βιοχημεία και την φυσιολογία του έμοιαζε με το *Geobacillus* sp. SP50, για ένα γονίδιο μίας GH5 κυτταρινάσης (CelA – endo-glucanase), καθώς είναι ευρέως γνωστό στην επιστημονική κοινότητα πως οι γεωβάκιλλοι διακρίνονται κυρίως για τις ξυλανάσες που διαθέτουν και όχι για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης. Ελάχιστοι γεωβάκιλλοι έχουν την δυνατότητα να αποδομούν την κυτταρίνη και για αυτό εμφανίζουν μεγάλο επιστημονικό και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Ελέγχθηκαν λοιπόν οι συγκεκριμένοι εκκινητές που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα (Geo_GH5_Bru1102F & Geo_GH5_NdeIR) σε θερμοκρασία annealing T=69°C, και παρατηρήθηκε πως μόνο το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 και όχι το στέλεχος 24 έχει ένα παρόμοιο ένζυμο με το *Geobacillus* 70PC53 (Ng et al, 2009). Το γονίδιο αυτό της συγκεκριμένης κυτταρινάσης – ενδο-γλυκανάσης έχει μήκος γύρω στα 1000bp. Για τους λόγους που περιγράφηκαν παραπάνω για το συγκεκριμένο στέλεχος θα πραγματοποιηθεί αλληλούχιση του γονιδιώματός του (Whole Genome Sequencing).

1	<i>Geobacillus sp24</i> αραίωσης 1:10
2	<i>Geobacillus sp24</i> αραίωσης 1:100
3	<i>Geobacillus sp50</i> αραίωσης 1:10
4	<i>Geobacillus sp50</i> αραίωσης 1:100
5	Δείγμα ελέγχου για GH5 κυτταρινάση (CelA – endo-glucanase) (control)



ΕΙΚΟΝΑ 16: Φωτογραφία ηλεκτροφόρησης μετά από τον εμπλουτισμό του γονιδίου της ενδο-γλουκανάσης CelA/GH5 του βακτηριακού στελεχους *Geobacillus* sp. SP50 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Απεικονίζονται οι ζώνες της ενισχυμένης αυτής γονιδιακής περιοχής από το υπό μελέτη βακτηριακού στελεχους. Η θερμοκρασία συγκόλλησης είναι 69°C. Ο δείκτης αναφοράς (ladder) για τα μεγέθη στην ηλεκτροφόρηση είναι ο 200bp DNA ladder. Για την ενίσχυση του γονιδίου της GH5 κυτταρινάσης (CelA – endo-glucanase), χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GEO-GH5-BPU1102 (εμπρόσθιος) και GEO-GH5-NDEL-F (ανάστροφος).

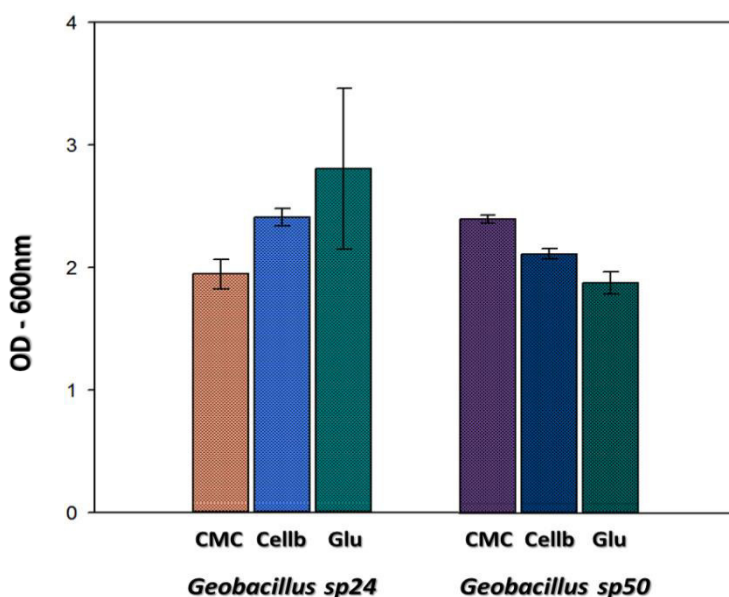


ΕΙΚΟΝΑ 17: Ανάλυση της απομονωμένης πρωτεΐνης ενδο-γλουκανάσης CelA/GH5 κυτταρινάσης του βακτηριακού στελεχους *Geobacillus* sp. SP50 σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE.

Γ15. ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗΣ GH5

Και στα δύο βακτηριακά στελέχη (*Geobacillus* sp. SP24 & SP50) πραγματοποιήθηκε η CMC-Cellulase ανάλυση, με το στέλεχος SP24 να χρησιμοποιείται ως «τυφλό» για την συγκεκριμένη χημική δοκιμασία. Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό Shoham (Casamino-acids) με διάφορες πηγές άνθρακα (γλυκόζη, σελλοβιόζη, CMC). Παρατηρήθηκε μέγιστη οπτική πυκνότητα βιομάζας στις 20h και για τα δύο βακτηριακά στελέχη, ενώ γύρω στις 39h η βιομάζα άρχισε να μειώνεται. Ταυτόχρονα, έγινε και χρονικός προσδιορισμός της παραγωγής του ενζύμου κυτταρινάση GH5 για το στέλεχος SP50. Όπως ήταν αναμενόμενο το στέλεχος SP24 δεν παράγει την συγκεκριμένη κυτταρινάση. Το *Geobacillus* sp. SP50 φάνηκε να παράγει την CMCάση σε σημαντικές ποσότητες μετά τις 10h, εμφανίζοντας μέγιστη παραγωγή ενζύμου γύρω στις 20h. Ύστερα, σε αντιστοιχία με την βιομάζα και η παραγωγή του ενζύμου, το οποίο βρίσκεται ελεύθερο στο υπερκείμενο και όχι στο ίζημα, αρχίζει να μειώνεται σημαντικά. Με την χρήση της μεθόδου DNS, προσδιορίσαμε την χρονική εκείνη στιγμή, όπου το υπόστρωμα CMC διασπάται με τον μέγιστο ρυθμό, δίνοντας μικρότερα αναγωγικά σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη, σελλοβιόζη), μετατρέποντας το αντιδραστήριο από κίτρινο σε σκούρο πορτοκαλί.

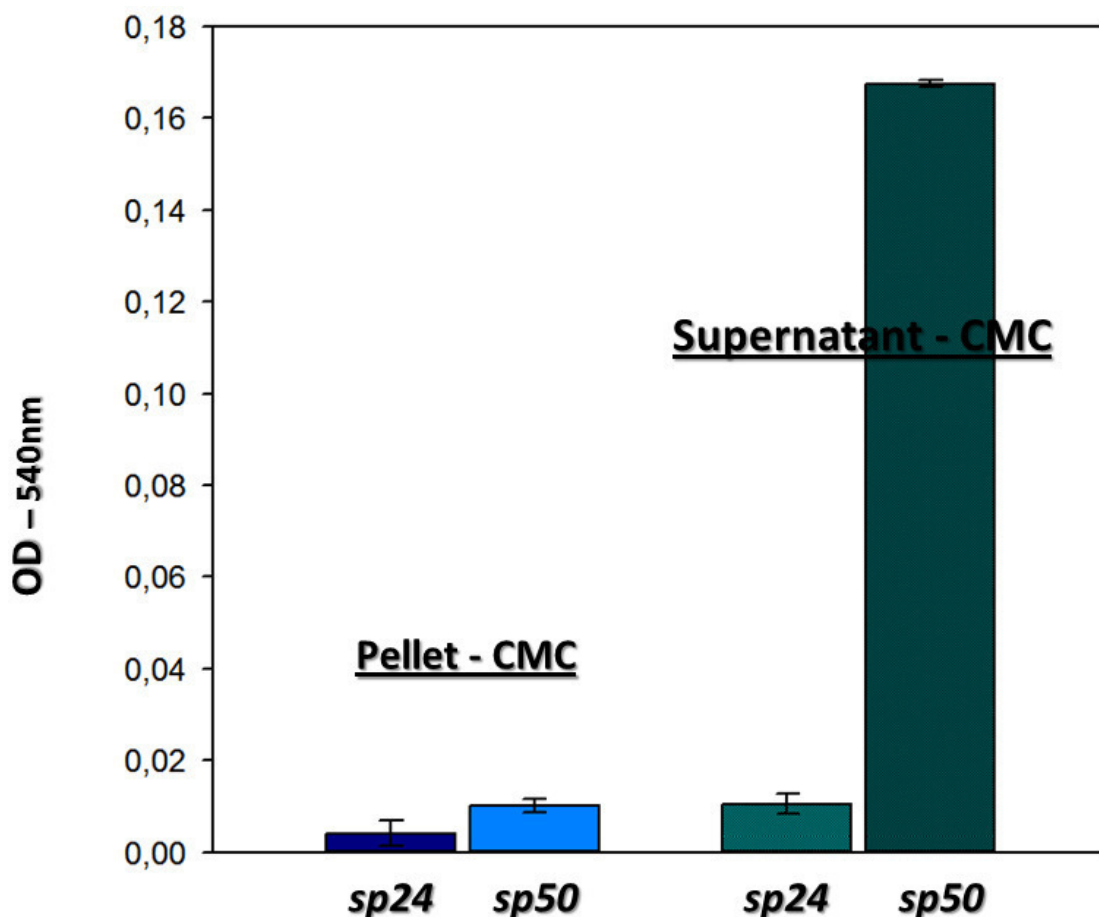
Time	sp24 - CMC ₁	sp24 - CMC ₂	sp24 - Cellb ₁	sp24 - Cellb ₂	sp24 - Glu ₁	sp24 - Glu ₂	sp50 - CMC ₁	sp50 - CMC ₂	sp50 - Cellb ₁	sp50 - Cellb ₂	sp50 - Glu ₁	sp50 - Glu ₂	OD - bacterial biomass
t=0h	0,1163	0,111	0,117	0,112	0,113	0,112	0,106	0,107	0,109	0,108	0,102	0,104	
t=16h	2,56	2,49	2,33	2,51	3,33	2,46	2,29	2,41	2,01	2,11	1,85	1,84	
t=20h	2,03	1,86	2,36	2,46	3,27	2,34	2,37	2,42	2,08	2,14	1,81	1,94	
t=39h	1,71	1,73	2,13	2,25	2,06	1,94	1,92	1,96	1,89	2,16	1,77	1,72	
t=44h	1,69	1,61	2,06	2,13	2,01	1,96	1,82	1,84	1,86	1,89	1,78	1,81	
Time	sp24 - CMC_average		sp24 - Cellb_average		sp24 - Glu_average		sp50 - CMC_average		sp50 - Cellb_average		sp50 - Glu_average		
t=20h	1,945		2,41		2,805		2,395		2,11		1,875		
	sp24 - CMC_error		sp24 - Cellb_error		sp24 - Glu_error		sp50 - CMC_error		sp50 - Cellb_error		sp50 - Glu_error		
	0,120		0,070		0,657		0,035		0,042		0,091		



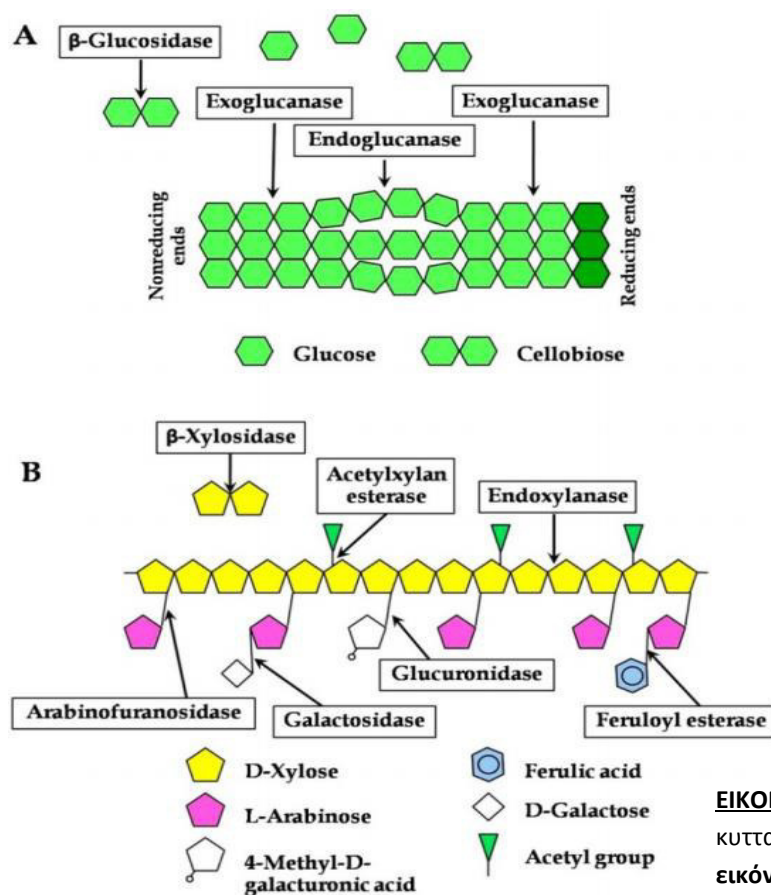
ΓΡΑΦΗΜΑ 21: Στο διπλανό γράφημα απεικονίζεται η οπτική πυκνότητα [OD] για τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη *Geobacillus* sp. SP24 & SP50 σε διάφορες πηγές άνθρακα (CMC, Glucose, Cellobiose), ενώ ως κύρια πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκαν διάφορα αμινοξέα (Casamino-acids).

Time	sp24 - CMC ₁	sp24 - CMC ₂	sp24 - Cellb ₁	sp24 - Cellb ₂	sp50 - CMC ₁	sp50 - CMC ₂	sp50 - Cellb ₁	sp50 - Cellb ₂	origin of CMC _{Case}
t=0h	0,007	0,002	0,06	0,007	0,001	0,007	0,006	0,005	Pellet
	0,002	0,005	0,143	0,197	0,003	0,004	0,193	0,186	Supernatant
t=16h	0,003	0,001	0,009	0,008	0,004	0,009	0,0027	0,006	Pellet
	0,011	0,009	0,071	0,083	0,106	0,097	0,129	0,121	Supernatant
t=20h	0,006	0,002	0,011	0,009	0,0111	0,009	0,011	0,013	Pellet
	0,009	0,012	0,072	0,075	0,168	0,167	0,099	0,102	Supernatant
t=39h	0,008	0,002	0,004	0,005	0,005	0,009	0,016	0,013	Pellet
	0,011	0,013	0,074	0,073	0,053	0,061	0,114	0,124	Supernatant
t=44h	0,003	0,004	0,007	0,006	0,002	0,004	0,015	0,017	Pellet
	0,005	0,007	0,065	0,077	0,051	0,057	0,146	0,137	Supernatant
Time	sp24 - CMC _{average}	sp24 - Cellb _{average}	sp50 - CMC _{average}	sp50 - Cellb _{average}					
t=20h	0,004	0,01	0,01005	0,012	Pellet				
	sp24 - CMC _{error}	sp24 - Cellb _{error}	sp50 - CMC _{error}	sp50 - Cellb _{error}					
	0,002	0,001	0,001	0,001	Supernatant				
	sp24 - CMC _{average}	sp24 - Cellb _{average}	sp50 - CMC _{average}	sp50 - Cellb _{average}					
t=20h	0,0105	0,0735	0,1675	0,1005	Supernatant				
	sp24 - CMC _{error}	sp24 - Cellb _{error}	sp50 - CMC _{error}	sp50 - Cellb _{error}					
	0,002	0,003	0,0007	0,004					

OD/DNS
microbial biomass



ΓΡΑΦΗΜΑ 22: Στο γράφημα απεικονίζεται η παραγωγή του ενζύμου κυτταρινάση GH5 στα υπό εξέταση βακτηριακά στέλεχη *Geobacillus* sp. SP24 & SP50. Με την χρήση της μεθόδου DNS, προσδιορίσαμε την OD από την διάσπαση της υδατοδιαλυτής κυτταρίνης CMC. Τα μικρότερα αναγωγικά σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη, σελλοβιόζη, ολιγοπολυμερή γλυκόζης), αυξάνουν την τιμή της οπτικής πυκνότητας. Έτσι φαίνεται πως από τα δύο στελέχη δεν παράγεται το ένζυμο CMCάση καθόλου από το *Geobacillus* sp. SP24, ενώ από το *Geobacillus* sp. SP50 παράγεται μόνο εξωκυτταρικά, ελεύθερο στο υπερκείμενο [supernatant].



ΕΙΚΟΝΑ 18: Ενζυμική υδρόλυση [A] κυτταρίνης και [B] ξυλάνης (Η εικόνα προέρχεται από Burton et al, 2010).

Γ16. ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ GH5 ΤΟΥ *GEOBACILLUS* SP50

Μετά την εξακρίβωση ότι όντως το γονίδιο που μελετάμε είναι η κυτταρινάση (ενδο-γλυκανάση) GH5/CelA στο βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50, με την χρήση PCR, πραγματοποιήθηκε ο ενζυμικός χαρακτηρισμός της κυτταρινάσης, η οποία είχε προηγουμένως κλωνοποιηθεί και απομονωθεί σε υψηλή καθαρότητα από βακτήριο *E.coli*, με χρήση χρωματογραφία συγγένειας (Ni^{2+} -method). Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί την πιο εκλεπτυσμένη και αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού ενζύμων. Αρχικά, έγινε έλεγχος εύρεση του βέλτιστου pH, στο οποίο το ένζυμο GH5 έχει την μέγιστη ενεργότητα (relative activity). Το ένζυμο ελέγχθηκε σε εύρος τιμών pH από το pH=4 μέχρι το pH=8,5.

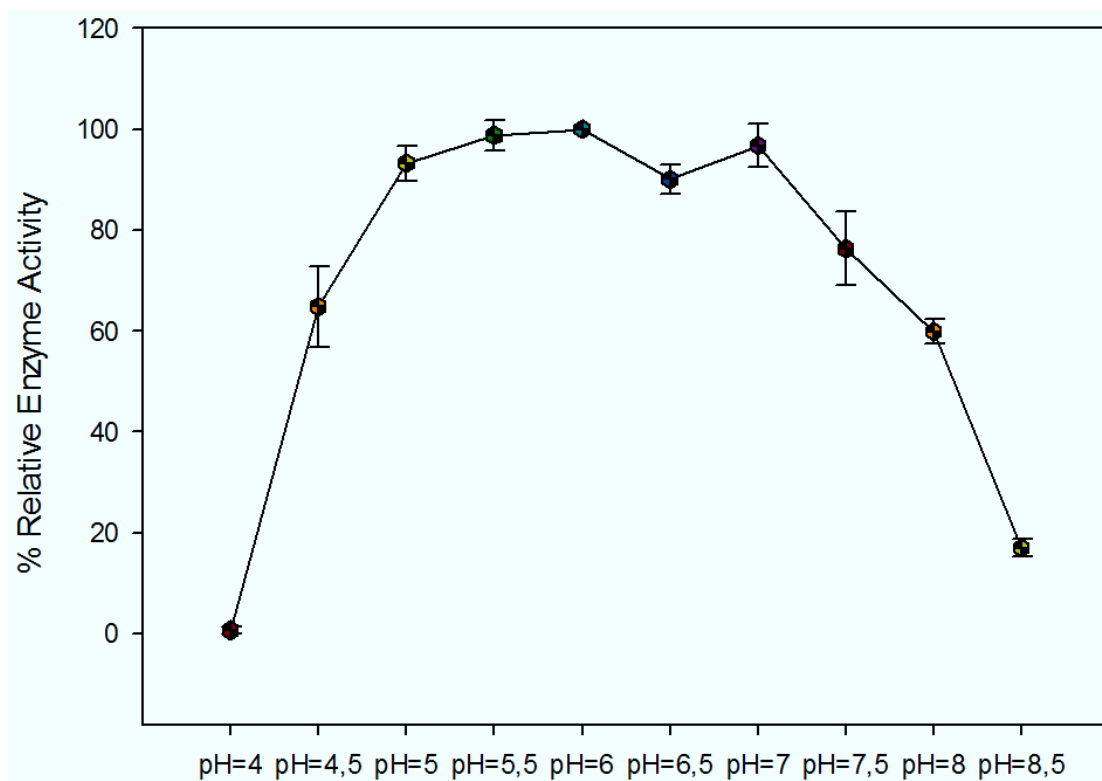
Φαίνεται πως το ένζυμο εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα στο pH=6 [optimal pH], με εύρος ικανοποιητικής λειτουργίας από το pH=5 μέχρι το pH=7. Ύστερα, εξετάστηκε το ένζυμο – κυτταρινάση, ως προς την βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία εμφανίζει την μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα. Το ένζυμο ελέγχθηκε σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από τους 55°C μέχρι τους 80°C. Μετά την επεξεργασία των

αποτελεσμάτων με το λογισμικό πρόγραμμα SigmaPlot για τις διαφορετικές θερμοκρασίες αντίδρασης, βρέθηκε πως η $T_{optimal}$ [βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας του ενζύμου CMCάση] είναι στους 65°C για την GH5/CelA, αλλά με εύρος ικανοποιητικής λειτουργίας από τους 60°C μέχρι τους 70°C.

DNS - pH	Sample1	Sample2	Sample3
pH=4	0,005	0,001	0,001
pH=4,5	0,203	0,232	0,242
pH=5	0,324	0,328	0,323
pH=5,5	0,347	0,341	0,345
pH=6	0,363	0,345	0,339
pH=6,5	0,333	0,3169	0,294
pH=7	0,342	0,325	0,345
pH=7,5	0,251	0,262	0,284
pH=8	0,213	0,216	0,198
pH=8,5	0,054	0,062	0,061

GH5-pH	% Relative Activity 1	% Relative Activity 2	% Relative Activity 3	%Average Relative Enzyme Activity	Error
pH=4	1,377	0,289	0,294	0,654	0,626
pH=4,5	55,92	67,24	71,38	64,85	8,005
pH=5	89,25	95,07	95,28	93,20	3,419
pH=5,5	95,5	98,84	101,7	98,73	3,090
pH=6	100	100	100	100	0
pH=6,5	91,73	91,85	86,72	90,10	2,927
pH=7	94,21	94,20	101,7	96,7	4,365
pH=7,5	69,14	75,94	83,77	76,28	7,321
pH=8	58,67	62,60	58,40	59,89	2,351
pH=8,5	14,87	17,97	17,99	16,94	1,793

pH effect – GH5

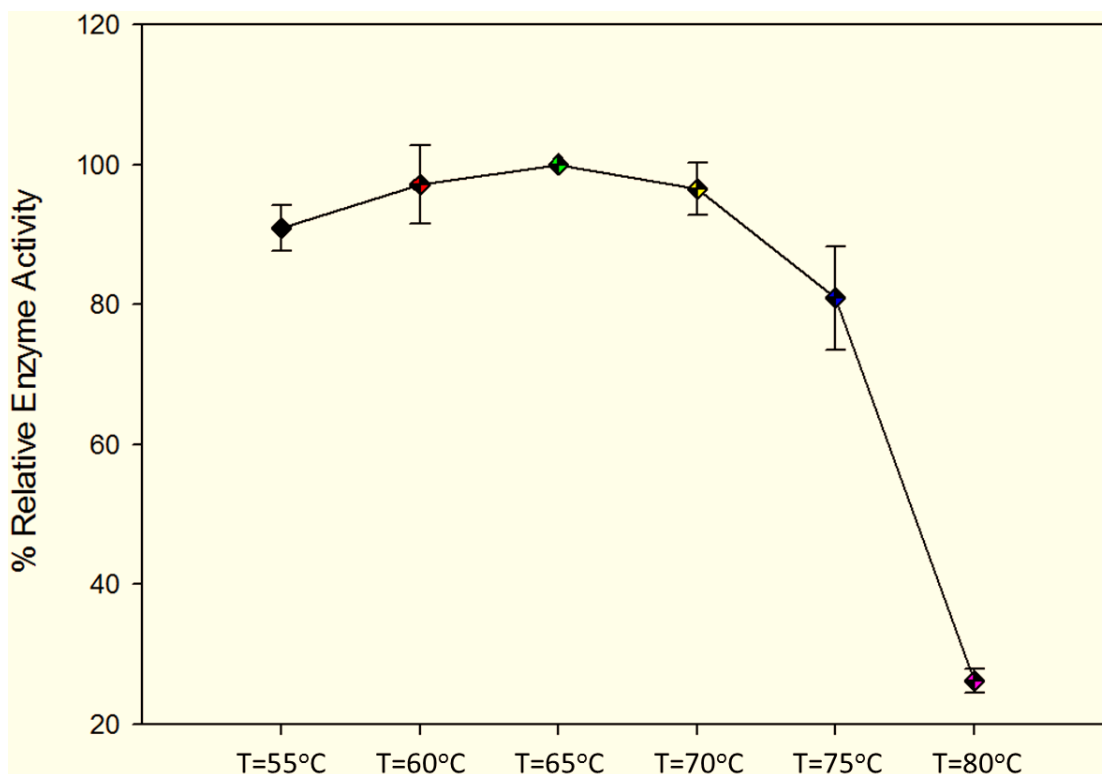


ΓΡΑΦΗΜΑ 23: Στο γράφημα απεικονίζεται η επίδραση του pH στην ενζυμική ενεργότητα.

DNS - T	Sample1	Sample2	Sample3
T=55°C	0,278	0,276	0,273
T=60°C	0,302	0,297	0,284
T=65°C	0,296	0,302	0,312
T=70°C	0,294	0,296	0,288
T=75°C	0,261	0,245	0,229
T=80°C	0,074	0,085	0,079

GH5-Temperature	% Relative Activity 1	% Relative Activity 2	% Relative Activity 3	%Average Relative Enzyme Activity	Error
T=55°C	93,918	91,39	87,5	90,936	3,2334
T=60°C	102,02	98,344	91,02	97,13	5,5999
T=65°C	100	100	100	100	0
T=70°C	99,324	98,013	92,30	96,548	3,7306
T=75°C	88,175	81,125	73,39	80,899	7,3917
T=80°C	25	28,145	25,32	26,155	1,7310

Temperature effect – GH5



ΓΡΑΦΗΜΑ 24: Στο γράφημα απεικονίζεται η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα της κυτταρινάσης GH5.

Temperature Stability - T=60oC				Temperature Stability - T=65oC			
t=0h	t=3h	t=23h	t=47h	t=0h	t=2,5h	t=4h	t=22h
0,267	0,274	0,271	0,245	0,267	0,262	0,271	0,262
0,284	0,281	0,269	0,241	0,279	0,268	0,262	0,256
Enzyme Characterization [%]				Enzyme Characterization [%]			
100	96,5	95,4	86,2	100	93,9	97,3	93,9
94,1	98,9	94,7	84,9	95,6	96,1	93,9	91,7
Average				Average			
97,05	97,7	95,05	85,55	97,8	95	95,6	92,8
Error				Error			
4,171	1,697	0,494	0,919	3,111	1,555	2,404	1,555

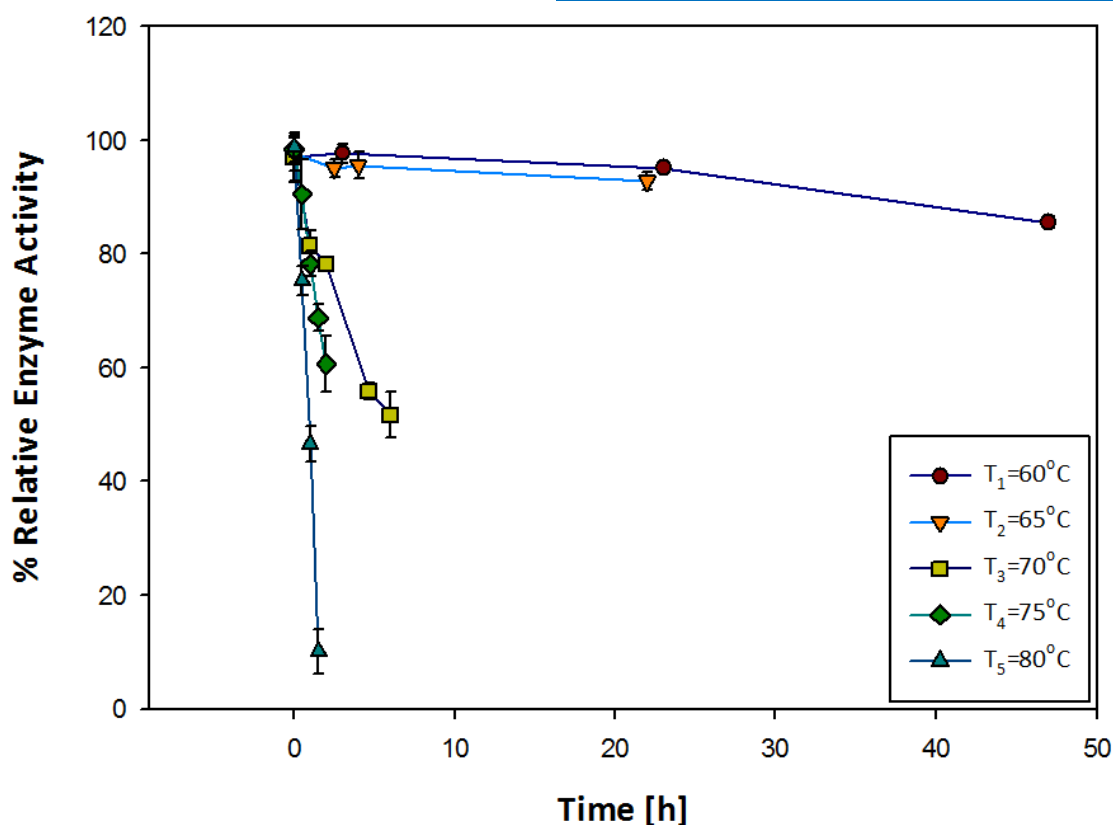
Temperature Stability - T=70oC				
t=0h	t=1h	t=2h	t=4,66h	t=6h
0,295	0,235	0,233	0,168	0,144
0,277	0,246	0,229	0,162	0,161
Enzyme Characterization [%]				
100	79,6	78,9	56,9	48,8
93,8	83,3	77,6	54,9	54,5
Average				
96,9	81,45	78,25	55,9	51,65
Error				
4,384	2,616	0,919	1,414	4,030

Temperature Stability - T=75oC				
t=0h	t=0,5h	t=1h	t=1,5h	t=2h
0,159	0,137	0,127	0,112	0,102
0,154	0,151	0,122	0,107	0,091
Enzyme Characterization [%]				
100	86,1	79,8	70,4	64,1
96,8	94,9	76,7	67,2	57,2
Average				
98,4	90,5	78,25	68,8	60,65
Error				
2,262	6,222	2,192	2,262	4,879

Temperature Stability - T=80oC			
t=0h	t=0,5h	t=1h	t=1,5h
0,158	0,125	0,079	0,021
0,162	0,119	0,072	0,012
Enzyme Characterization [%]			
100	77,1	48,7	12,9
97,5	73,4	44,4	7,4
Average			
98,75	75,25	46,55	10,15
Error			
1,767	2,616	3,040	3,889

**Σταθερότητα της GH5 κυτταρινάσης
σε διάφορες θερμοκρασίες**

Temperature Stability – GH5



ΓΡΑΦΗΜΑ 25: Στο γράφημα απεικονίζεται η σταθερότητα της GH5 κυτταρινάσης σε διάφορες θερμοκρασίες.

Η δραστηριότητα (ή ενεργότητα) ενός ενζύμου εκφράζεται συνήθως με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο. Ως ταχύτητα, ορίζεται η ποσότητα του υποστρώματος που μετατρέπεται στη μονάδα του χρόνου. Όσον αφορά την σταθερότητα της GH5 κυτταρινάσης σε διάφορες θερμοκρασίες, παρατηρούμε πως η σχετική ενεργότητα του ενζύμου παραμένει σε πολύ υψηλά επίπεδα πάνω από 90-95% για θερμοκρασίες 60-65°C, με χρόνο επώασης του ενζύμου πάνω από 48h. Έπειτα, από τους 70°C μέχρι τους 80°C, το ένζυμο αρχίζει και χάνει την ενεργότητά του πολύ πιο γρήγορα, και συγκεκριμένα στους 70°C μετά από 6h, η σχετική ενεργότητα πέφτει στο 60% της αρχικής, ενώ στους 80°C η σχετική ενεργότητα φτάνει στο 10% σε περίπου 2h. Για τιμές κάτω των 60°C, δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη επίδραση στο ένζυμο GH5/CelA. Το ότι είναι ιδιαίτερα σταθερό το ένζυμο στους 60-65°C, αυτό δίνει την δυνατότητα για περαιτέρω βιοτεχνολογικές εφαρμογές της συγκεκριμένης κυτταρινάσης, αφού σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες μειώνεται ο κίνδυνος για μολύνσεις. Ακόμα, το ένζυμο είναι ιδιαίτερα σταθερό σε εύρος pH από 4 μέχρι 9, με την μέγιστη σταθερότητα να εμφανίζεται από το pH=5,5 μέχρι το pH=7,5.

Γ17. ΕΡΕΥΝΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΑΣ K_m ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ GH5

Εξίσωση των Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

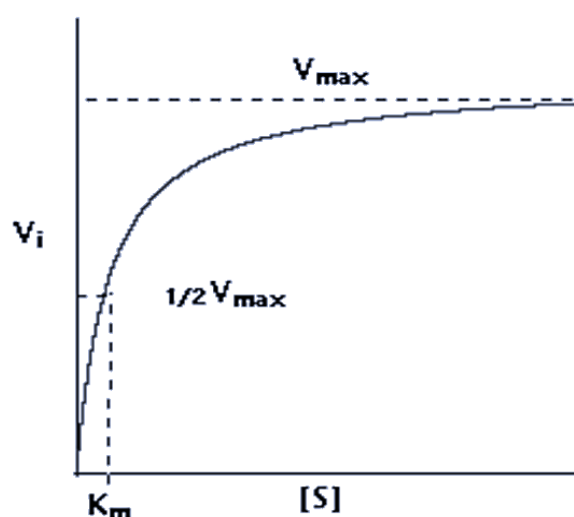
όπου:

v = ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

$V_{\max}$ = η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μεγάλη

$[S]$ = η συγκέντρωση του υποστρώματος

K_m = σταθερά Michaelis-Menten



ΓΡΑΦΗΜΑ 26: Εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση υποστρώματος (σε περίπτωση σταθερής συγκέντρωσης ενζύμου).

Οι τιμές **$V_{\max}$** και **K_m** είναι σταθερές για μια συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση και συμβολίζουν αντίστοιχα τη μέγιστη ταχύτητα και τη συγκέντρωση του υποστρώματος για ταχύτητα ίση με το μισό της μέγιστης (όταν $V=V_{\max}/2$ τότε $[S]=K_m$). Όσο πιο μικρή είναι η τιμή της K_m τόσο πιο μεγάλη είναι η συγγένεια του ενζύμου προς το υπόστρωμα του (**Berg et al, 2002**).

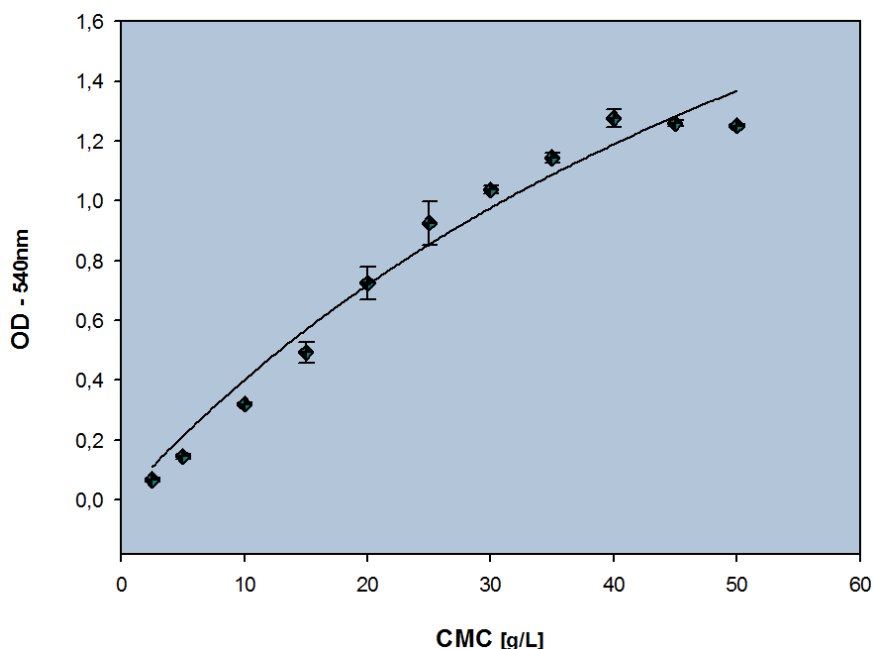
Με την χρήση του λογισμικού SigmaPlot, παράχθηκε το γράφημα της συνάρτησης Michaelis–Menten, στο οποίο η γραφική παράσταση απεικονίζει μία υπερβολή, της μορφής: $y=ax/b+x$.

$$y = ax/b + x$$

↓

$$v = V_{\max} [S] / K_m + [S]$$

[CMC]g/L	OD1	OD2	Average	Error
2,5	0,062	0,072	0,067	0,007
5	0,151	0,139	0,145	0,008
10	0,323	0,317	0,32	0,004
15	0,469	0,518	0,4935	0,034
20	0,687	0,763	0,725	0,053
25	0,875	0,978	0,9265	0,072
30	1,027	1,047	1,037	0,014
35	1,132	1,155	1,1435	0,016
40	1,254	1,298	1,276	0,031
45	1,252	1,266	1,259	0,009
50	1,247	1,255	1,251	0,005



Equation: Hyperbola; Single Rectangular, 2 Parameter

$$f(x) = a \cdot x / (b + x)$$

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0,9875	0,9753	0,9725	0,0764	
	Coefficient		Std. Error	t
a	3,4204	0,8184	4,1796	0,0024
b	75,0025	26,4073	2,8402	0,0194

Επομένως, το **Km=75,0025g/L**,
και το **Vmax=3,42 +/- 0,81g/L**.

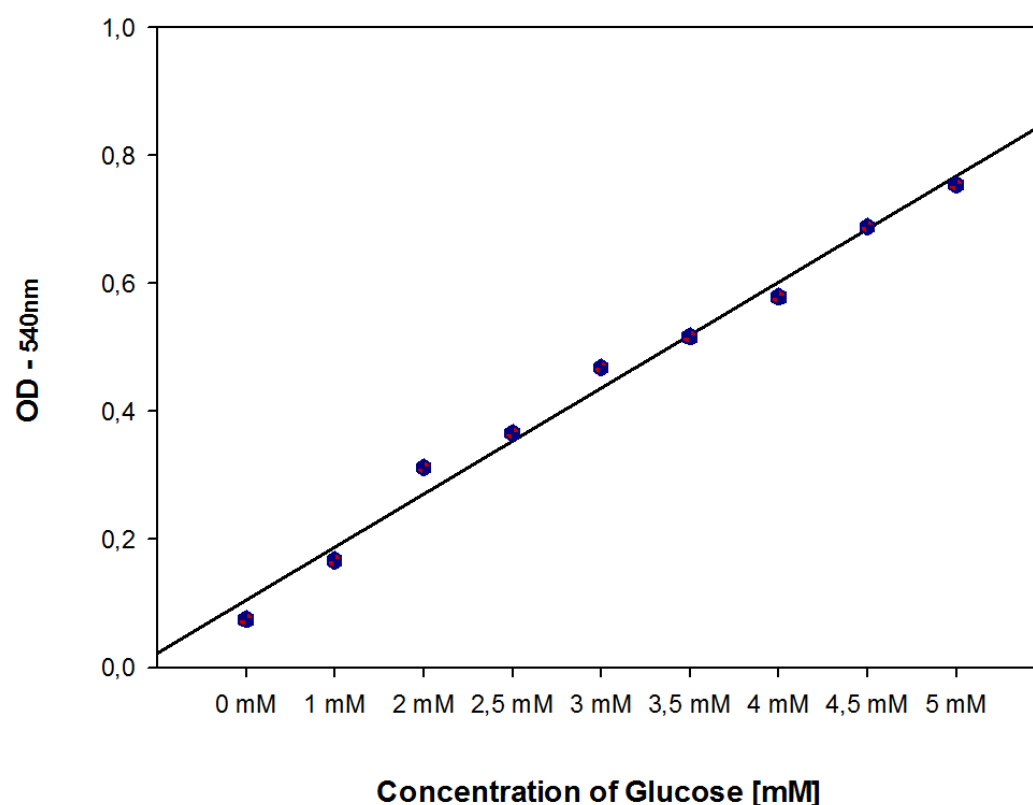
Η τιμή λοιπόν της Km σχετικά μεγάλη, δείχνοντας πως η συγγένεια του ενζύμου προς το υπόστρωμα του δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη.

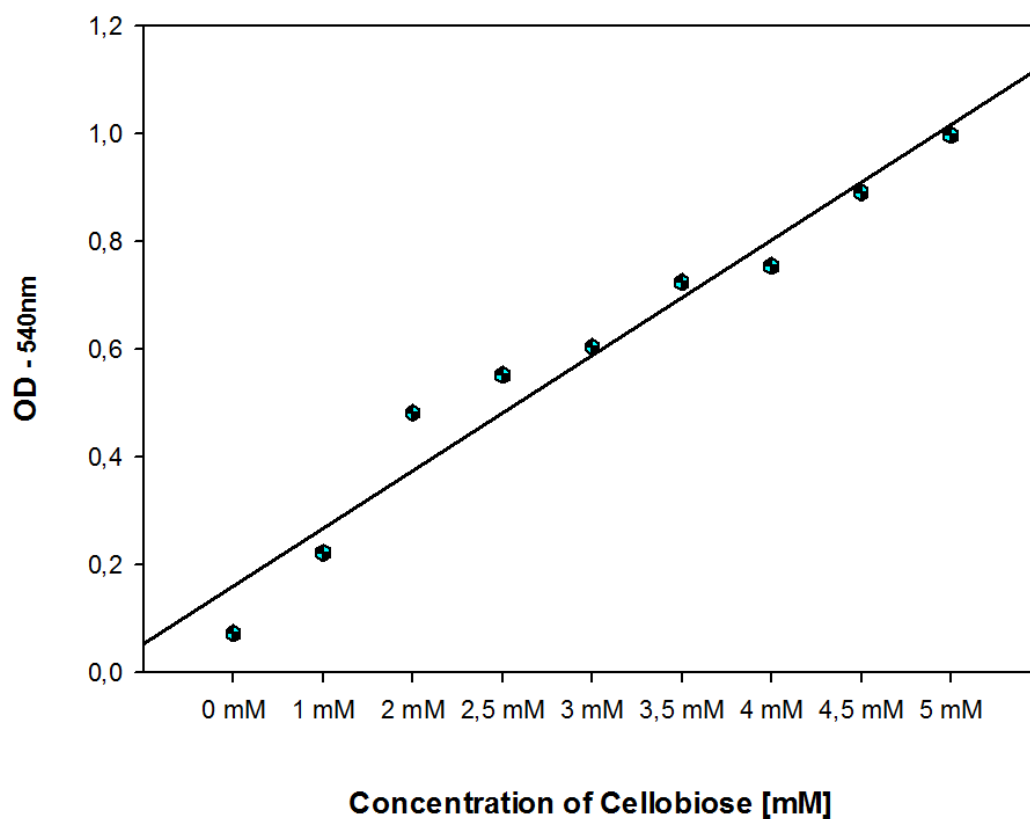
Γ18. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ GH5

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος για πιθανή παρεμποδιστική δράση της σελλοβιόζης και της γλυκόζης στο ένζυμο κυτταρινάση GH5, ενώ αποδομεί το CMC [Carboxy-methyl-Cellulose]. Η σελλοβιόζη παρουσιάζει παρεμπόδιση της τάξης του 11-12%, με την σχετική ενζυμική ενεργότητα να πέφτει περίπου στο 88-89%, ενώ αντίθετα η γλυκόζη δεν φαίνεται να προκαλεί κάποια παρεμπόδιση στο ένζυμο.

Παρακάτω παρατίθεται οι πρότυπες καμπύλες για την γλυκόζη και την σελλοβιόζη (μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων) για την εύρεση του «θορύβου» στον έλεγχο της παρεμπόδισης με την μέθοδο DNS.

Πρότυπες Καμπύλες Σακχάρων - 540nm				
Συγκέντρωση	Σάκχαρο	dsH ₂ O	OD Γλυκόζης	OD Σελλοβιόζης
0 mM	0 μl	200 μl	0,075	0,072
1 mM	20 μl	180 μl	0,167	0,221
2 mM	40 μl	160 μl	0,312	0,481
2,5 mM	50 μl	150 μl	0,366	0,552
3 mM	60 μl	140 μl	0,469	0,604
3,5 mM	70 μl	130 μl	0,517	0,724
4 mM	80 μl	120 μl	0,579	0,754
4,5 mM	90 μl	110 μl	0,689	0,891
5 mM	100 μl	100 μl	0,754	0,997

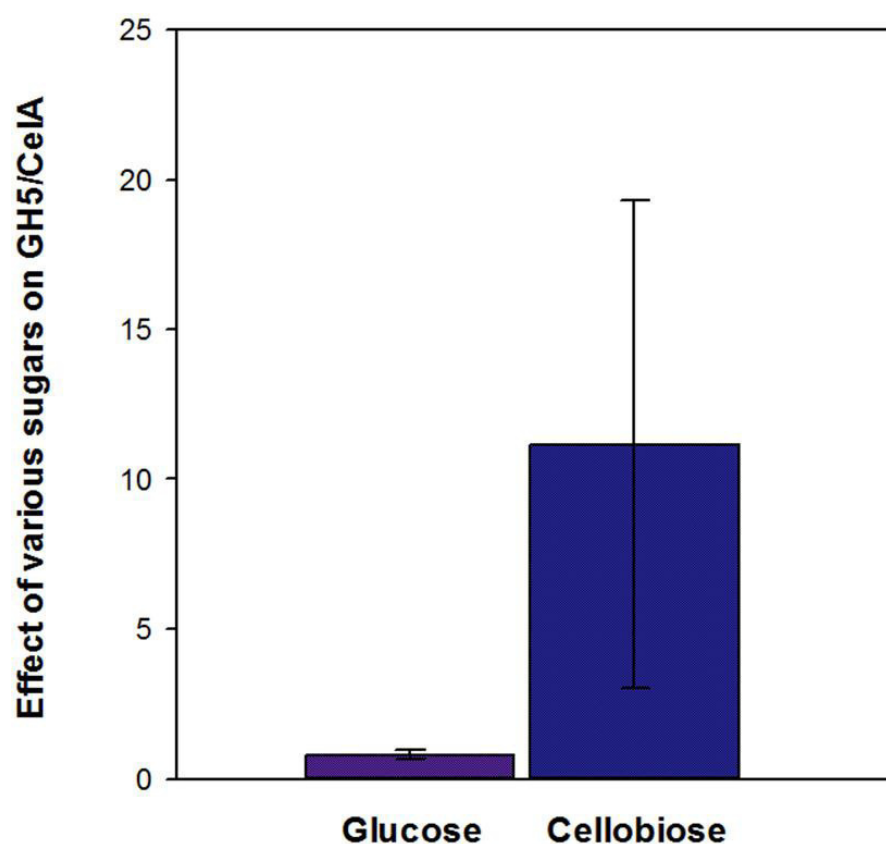




Έλεγχος Παρεμπόδισης του ενζύμου GH5			
	CMC-only	CMC+Cellobiose	CMC+Glucose
CMC	80 μ l	80 μ l	80 μ l
Buffer	100 μ l	40 μ l	40 μ l
Enzyme	20 μ l	20 μ l	20 μ l
Glucose	–	–	60 μ l
Cellobiose	–	60 μ l	–

DNS - Οπτική Πυκνότητα - 540nm			
	CMC-only	CMC+Cellobiose	CMC+Glucose
Sample 1	0,509	0,993	0,922
Sample 2	0,514	1,073	0,925
Blank	0,075	0,645	0,491
S1-Blank	0,434	0,348	0,431
S2-Blank	0,439	0,428	0,435
%Effect1	0	19,8156	0,6912
%Effect2	0	2,5056	0,9111
Average Effect	0	11,160	0,801
Error Effect	0	12,24	0,155

Παρουσιάζεται το συγκεντρωτικό γράφημα που δείχνει την πιθανή παρεμπόδιση τόσο για την σελλοβιόζη όσο και την γλυκόζη.



ΓΡΑΦΗΜΑ 27: Στο γράφημα απεικονίζεται παρεμποδιστική επιδραση των δύο σακχαρων στην κυτταριναση GH5, με την σελλοβιόζη να εμφανίζει παρεμπόδιση από 7 μέχρι 15%, ενώ αντίθετα η γλυκόζη να έχει ελάχιστη επίδραση στην λειτουργία του ενζύμου.

Γ19. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ GH5

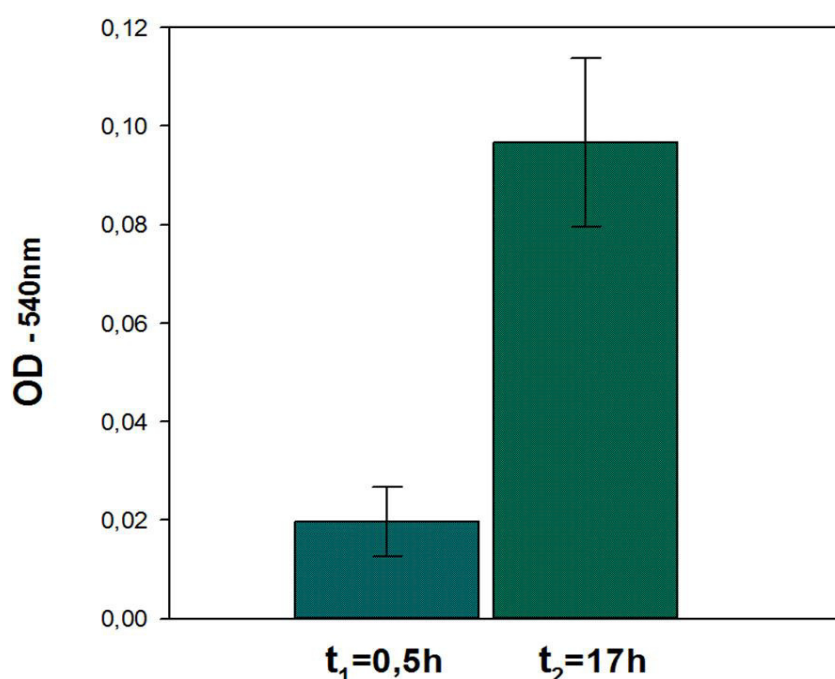
Το ένζυμο κυτταρινάση GH5 του *Geobacillus* sp. SP50 ελέγχθηκε, με στόχο να δούμε αν μπορεί να δρα και ως «ξυλανάση» και για αυτό τον λόγο αντί για ξυλάνη χρησιμοποιήθηκε ουλβάνη (ulvan). Η ουλβάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που υπάρχει στο κυτταρικό τοίχωμα των πράσινων φυκών (Ulva & Enteromorpha). Ο συγκεκριμένος πολυσακχαρίτης περιέχει μεγάλες ποσότητες θείου (S_2), και αποτελείται κατά κύριο λόγο από ραμνόζη, ξυλόζη, γλυκουρονικό οξύ και ιδουρονικό οξύ. Επομένως, φαίνεται πως η ουλβάνη, ως πολυσακχαρίτης εμφανίζει πολύ μεγάλη ομοιότητα με την ετεροξυλάνη.

Στην αντίδραση για εξέταση ύπαρξης αποικοδομητικής δραστηρότητας της ουλβάνης

[UX29] από την GH5, η ημικυτταρίνη είχε αρχική συγκέντρωση 2% w/v [20g/L], ενώ το buffer διαλύματος $[K_2HPO_4-KH_2PO_4]$ είχε pH=6. Σε κάθε erpendorf αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν 180μl δ/τος buffer με τον πολυσακχαρίτη UX29 και 20μl ενζύμου GH5.

Παρατηρούμε ότι η CMCάση GH5 έχει μάλλον δραστικότητα ημικυτταρινάσης, έστω και αν η ενζυμική ενεργότητα ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα είναι σχετικά μικρή έως αμελητέα. Από τις 0,5h έως τις 17h υπήρξε αύξηση των ελεύθερων αναγωγικών σακχάρων, τα οποία μετρήθηκαν με την μέθοδο DNS. Βέβαια, όταν πραγματοποιήθηκε ανάλυση HPLC στο δείγμα των 24h, η τεχνική έδειξε σχεδόν μηδενικά ποσοστά αποδόμησης.

DNS - Οπτική Πυκνότητα - 540nm		
	t ₁ =0,5h	t ₂ =17h
Sample 1	0,013	0,077
Sample 2	0,019	0,104
Sample 3	0,027	0,109
Average	0,019	0,096
Error	0,007	0,017



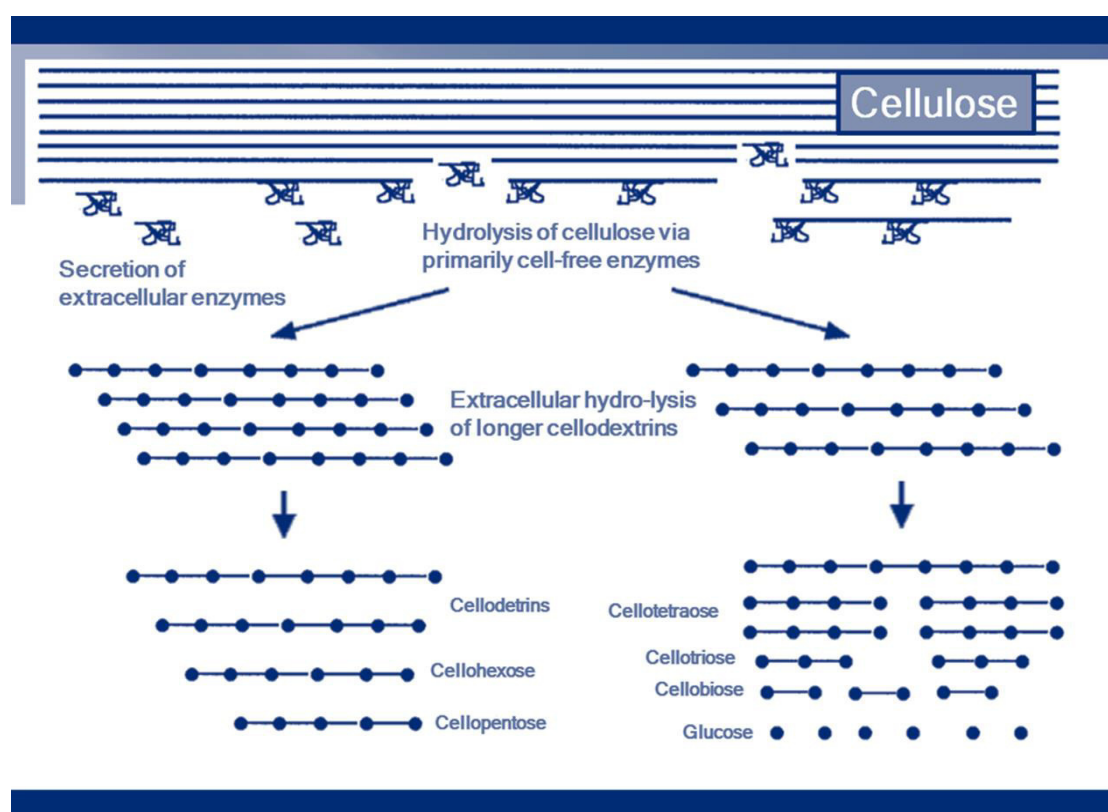
ΓΡΑΦΗΜΑ 28: Στο γράφημα απεικονίζεται η πιθανή ενεργότητα της CMCάσης GH5 ως ημικυτταρινάσης. Συγκεκριμένα, η ενζυμική ενεργότητα ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα [ουλβάνη] είναι σχετικά μικρή έως αμελητέα, αφού με την μέθοδο DNS, ενώ θα περιμέναμε μία μικρή απόδοση – αποδόμηση της ουλβάνης γύρω στα OD=300-400 και παραπάνω στις 17h, εντούτοις η οπτική απορρόφηση ήταν μόλις 0,95.

Γ20. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ

Με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) μελετήσαμε την αποδόμηση των CMC (carboxy-methyl-cellulose), PASC (phosphate-acid swollen cellulose), AVICELL και CELL₁₂₃-powder, από την κυτταρινάση GH5 του *Geobacillus* sp. SP50. Οι δύο πρώτες κυτταρίνες είναι κατά κύριο λόγο άμορφες, ενώ οι υπόλοιπες είναι κυρίως κρυσταλλικές. Ακόμα, μελετήσαμε και την αποδόμηση της ουλβάνης UX29 (παρόμοιας δομής με την ξυλάνη) με χρήση πάλι του ενζύμου GH5. Συγκεκριμένα, για την πρώτη περίπτωση των 4 κυτταρινών, φτιάχτηκαν διαλύματα (buffers) pH=6 συγκέντρωσης C=20g/L από την εκάστοτε κυτταρίνη (cellulose 2% w/v). Έγινε επώαση στους 60°C για 1h, 3h & 24h. Στο όγκο αντίδρασης $V_{αντίδρασης}=1\text{ml}$, το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν 3μl [$C_{enzGH5}=2,4\mu\text{g}$ – Bradford μετρήσεις]. Όσον αφορά την ημικυτταρίνη UX29, το δ/μα αντίδρασης ήταν και σε αυτή την περίπτωση 2% w/v [pH=6 – 20g/L ulvane), μόνο που χρησιμοποιήσαμε 10μl GH5 ενζύμου κυτταρινάσης σε κάθε erpendorf αντίδρασης $V_{τελ}=1\text{ml}$ στους 60°C. Και αυτό γιατί η ουλβάνη δεν είναι το φυσικό υπόστρωμα της κυτταρινάσης GH5 που μελετάμε. Δείγμα από την αντίδραση πάρθηκε στις 3h και στις 24h. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα (Sample 1 & Sample 2) και ένα τυφλό (Blank).

Σχετικά με την αποικοδόμηση/αποδόμηση της κυτταρίνης (CMC/PASC/AVICELL/CELL₁₂₃) (Cellulose deconstruction) μετά από επώαση 24h με την υπό εξέταση κυτταρίνη, παρατηρούμε ότι οι διαφορετικές κυτταρίνες διασπώνται σε διάφορα μονομερή/πολυμερή, όπως γλυκόζη, σελλοβιόζη, σελλοτριόζη, σελλοτετραόζη, σελλοπεντόζη. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των γλυκοζών στο εκάστοτε πολυμερές διάσπασης πάνω από 5 γλυκόζες (>G₅), αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην ξεχωρίζουν μεταξύ τους, λόγω της στήλης της HPLC χρωματογραφίας που χρησιμοποιούμε. Συγκεκριμένα, αρχικά τα διάφορα προκύψαντα πολυμερή χωρίζονται στην στήλη με βάση το μοριακό τους βάρος και έπειτα με βάση την διάθλαση του πολωμένου φωτός, ταυτοποιούνται σε G₁/G₂/G₃/G₄/G₅/>G₅. Πάνω από 5 γλυκόζες στο παραγόμενο πολυμερές δεν υπάρχει ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα, κυρίως λόγω της στήλης που χρησιμοποιούμε, αλλά και του εγκλωβισμού του πολωμένου φωτός, με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλές μικρές κορυφές στο πρόγραμμα ChemStation για >G₅, θεωρώντας τις για την διεξαγωγή του πειράματος ως μία. Πιο αναλυτικά, η κυτταρινάση διασπά το CMC πολυμερές (20g/L) σε G₁, G₂, G₃, G₄, G₅ και >G₅ μονομερή. Λόγω ότι το CMC είναι κυρίως άμορφη υδατοδιαλυτή κυτταρίνη, παρατηρούνται σχετικά υψηλά ποσοστά αποδόμησης στις 24h, με [G₁]= 0,08 g/l, [G₂]= 0,29 g/l, [G₃]= 0,18 g/l, [G₄]= 0,06 g/l και [G₅]= 0,36 g/l. Αντίστοιχα, στην κυτταρίνη PASC, η οποία είναι σε μικρότερο βαθμό υδατοδιαλυτή και

«φουσκωμένη» λόγω των φωσφορικών ομάδων (κυρίως άμορφη κυτταρίνη), τα προκύψαντα πολυμερή/μονομερή είναι τα εξής: [G1]= 0,03 g/l, [G2]= 0,44 g/l, [G3]= 0,35 g/l, [G4]= 0 g/l και [G5]= 0 g/l. Στις κυτταρίνες AVICELL και CELL₁₂₃-powder, οι οποίες είναι κρυσταλλικές, το ένζυμο δεν φαίνεται να έχει τόσο καλή επίδοση όπως στις άμορφες CMC & PASC, δίνοντας η GH5 κατά την ενζυμική διάσπαση κυρίως G2 [σελλοβιόζη] και G3 [σελλοτριόζη], [G2_{AVICELL}]= 0,02 g/l, [G3_{AVICELL}]= 0,01 g/l, ενώ [G2_{CELL123}]= 0,13 g/l, [G3_{CELL123}]= 0,04 g/l. Επιπρόσθετα, μόνο στην περίπτωση του CELL₁₂₃-powder, παρατηρείται διάσπαση σε G5, με [G5]= 0,12 g/l. G4 και G5 δεν παρατηρούμε ούτε στο CELL₁₂₃-powder ούτε στο Avicell. Από την καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης στην χρωματογραφία HPLC, η απορρόφηση OD=37.000 αντιστοιχεί σε 1 g/L. Επομένως, για να υπολογίσουμε τα g/L της κάθε κορυφής, πολλαπλασιάζουμε την OD με τον ρυθμό ροής, και έπειτα διαιρούμε με το 37000. Για κάθε μονομερές [G1, G2, G3, G4, G5] δεν μας ενδιαφέρει σαν τυφλό π.χ. η σελλοβιόζη ή η σελλοτριόζη κ.τ.λ., γιατί δουλεύουμε στην HPLC χρωματογραφία μόνο με την μάζα των σακχάρων. Έτσι, η απορρόφηση για τα G1, G2, G3, G4, G5 είναι 37.000 για 1 g/L.



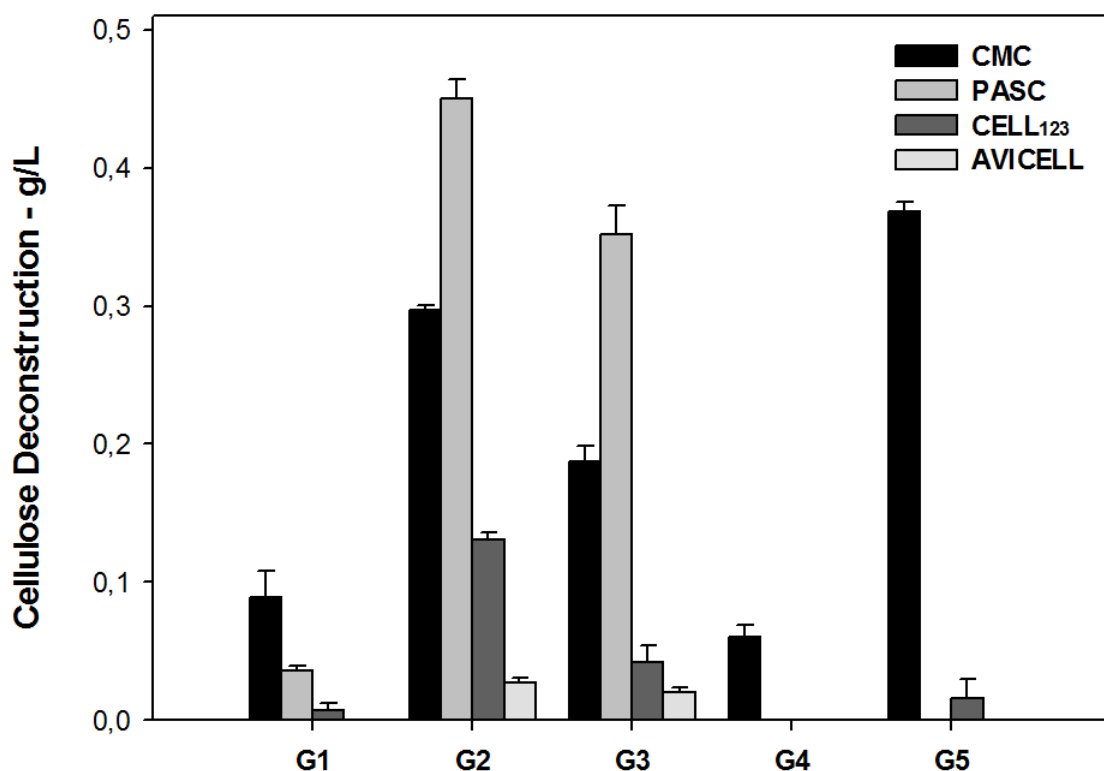
ΕΙΚΟΝΑ 19: Στην εικόνα απεικονίζονται τα προϊόντα της υδρόλυσης της κυτταρίνης (cellulose). Συγκεκριμένα, από την αποικοδόμηση του πολυμερούς από τις κυτταρινάσες προκύπτουν αρχικά οι σελλοδεκτρίνες (cellodextrins), οι οποίες και αυτές με τη σειρά του υδρολύονται, δίνοντας όλο και μικρότερα νέα προϊόντα, όπως σελλοεξόζη, σελλοπενταόζη, σελλοπενταόζη, σελλοτριόζη, σελλοτριόζη και γλυκόζη. Τα τελευταία παράγωγα μπορούν να εισαχθούν από το μικροβιακό

κύτταρο και να καταβολιστούν, ώστε να παραχθεί ενέργεια με την μορφή ATP, και έπειτα το κύτταρο ανάλογα με την "δυναμική" του, να παράξει διάφορα βιο-προϊόντα.

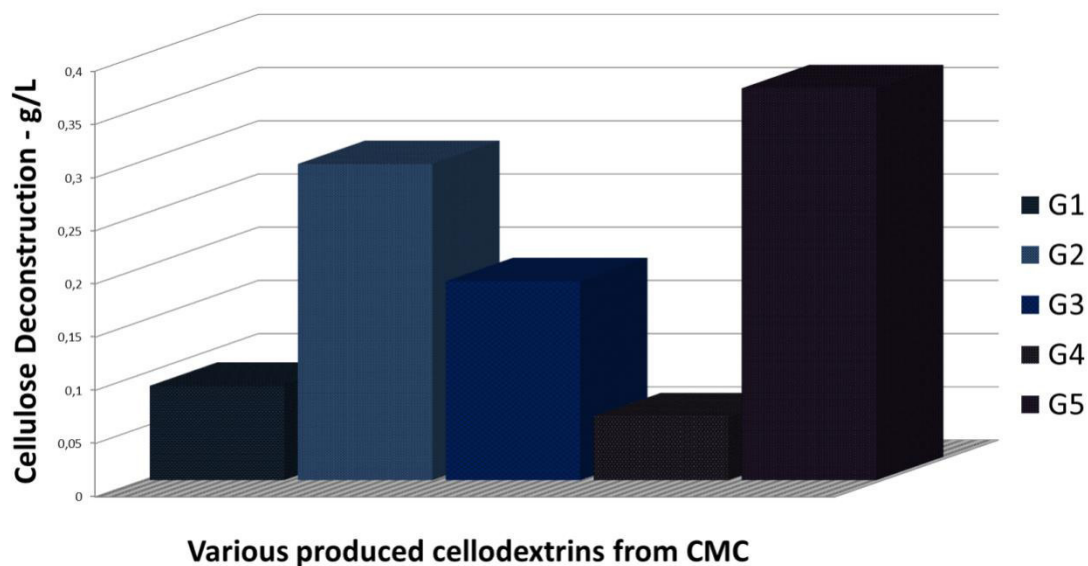
Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι, η κυτταρινάση GH5 του *Geobacillus* sp. SP50 έχει κυρίως δράση ενδο-γλουκανάσης, αφού στο υπόστρωμα PASC (άμορφη κυτταρίνη) και κυρίως στο CMC (υδατοδιαλυτή-άμορφη κυτταρίνη), τα ποσοστά της σελλοτριόζης, της σελλοτετραόζης και της σελλοπεντόζης είναι ιδιαίτερα υψηλά σε σχέση με της κρυσταλλικές κυτταρίνες [AVICELL και CELL₁₂₃-powder], όπου τα ποσοστά G3/G4/G5 είναι πολύ χαμηλά. Η PASC κυτταρίνη είναι πιο εύκολα προσβάσιμη από την κυτταρινάση GH5/CelA, με αποτέλεσμα αυτό να μπορεί πιθανότατα να εξηγήσει την απουσία G4/G5 από το διάλυμα της ενζυμικής αντίδρασης, ενώ η πρόσβαση στην CMC κυτταρίνη από το ένζυμο είναι πιο δύσκολη, αν και είναι υδατοδιαλυτή λόγω των καρβοξυλικών ομάδων. Η PASC κυτταρίνη, όντας φωσφορικά-φουσκωμένη έχει πιο πολλές εγκοπές στη δομή της με αποτέλεσμα η GH5 να κόβει πιο εύκολα, προτιμώντας να κόβει σε G2 και G3, ενώ στο CMC, το οποίο είναι πιο συμπαγές, το ένζυμο κόβει και σε G4 - G5, μάλλον λόγω της δομής του πολυμερούς της αρχικής κυτταρίνης. Αθροιστικά, τα ποσοστά G2, G3, G4, και G5 του CMC είναι τα ίδια με τα ποσοστά αποδόμησης G2 και G3 του PASC.

Το ένζυμο GH5 πέρα από δράση ενδο-γλουκανάσης, φαίνεται να έχει και δράση εξω-γλουκανάσης (σελλοϋδρολάσης), αφού τόσο στις άμορφες όσο και στις κρυσταλλικές κυτταρίνες, παρατηρούμε G2 πολυμερή σελλοβιόζης (ακόμα και G3 πολυμερή). Το ένζυμο έχει επίσης και δράση β-γλυκοσιδάσης στα θραύσματα G2/G3, τα οποία κόβει και έτσι απελευθερώνεται και ελεύθερη γλυκόζη (G1). Εντωμεταξύ, η κυτταρινάση GH5 δεν μπορεί να δράσει σε κρυσταλλικό κυτταρινικό υπόστρωμα, και αυτό διαπιστώνεται από τα κρυσταλλικά υποστρώματα AVICELL και CELL₁₂₃-powder, όπου παρατηρούμε μηδενικά σχεδόν ποσοστά πολυμερών G4 και G5, ενώ παρατηρούνται σχετικά υψηλά ποσοστά G2 και G3 πολυμερών. Αξίζει να σημειωθεί πως, ενώ θα περιμέναμε να δούμε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά ελεύθερης γλυκόζης, αφού παράγεται κυρίως σελλοβιόζη και σελλοτριόζη, η ενεργότητα της «β-γλυκοσιδάσης» της υπό μελέτη GH5 κυτταρινάσης είναι ιδιαίτερα χαμηλή.

HPLC - Cellulose Deconstruction - ChemStation									
Time: 24h	CMC deconstruction - g/L		Average	Error	Time: 24h	Cell123 deconstruction - g/L		Average	Error
G1	0,075	0,102	0,088	0,019	G1	0,003	0,011	0,0072	0,005
G2	0,299	0,2946	0,297	0,003	G2	0,127	0,1344	0,130	0,005
G3	0,178	0,195	0,187	0,011	G3	0,050	0,03	0,042	0,011
G4	0,053	0,0666	0,060	0,009	G4	0	0	0	0
G5	0,373	0,363	0,368	0,006	G5	0,025	0,005	0,015	0,014
>G5	3,499	3,280	3,390	0,155	>G5	0,119	0,132	0,125	0,008
Time: 24h	PASC deconstruction - g/L		Average	Error	Time: 24h	Avicell deconstruction - g/L		Average	Error
G1	0,038	0,034135135	0,036	0,002	G1	0	0	0	0
G2	0,439	0,459972973	0,449	0,014	G2	0,024	0,029	0,027	0,003
G3	0,337	0,36672973	0,352	0,020	G3	0,017	0,022	0,019	0,003
G4	0	0	0	0	G4	0	0	0	0
G5	0	0	0	0	G5	0	0	0	0
>G5	0,387	0,198908108	0,293	0,133	>G5	0,059	0,08	0,072	0,019



ΓΡΑΦΗΜΑ 29: Στο γράφημα απεικονίζεται η υδρόλυση των εκάστοτε μορφών κυτταρίνης (CMC, PASC, Avicell, Cell123) από την κυτταρινάση - ενδογλουκανάση Cel5 [GH5/CelA] δίνει κυρίως ως προϊόντα αποικοδόμησης σελλοτριόζη και σελλοτριόζη. Την καλύτερη βιο-αποικοδομητική ικανότητα της κυτταρινάσης Cel5 του *Geobacillus* sp. SP50, την παρατηρούμε στην περίπτωση του CMC (carboxy-methyl-cellulose), όπου παράγονται γλυκόζη, σελλοβιόζη, σελλοτριόζη, σελλοτετραόζη, και σελλοπεντόζη σε σημαντικές ποσότητες. Βέβαια, και στο PASC, τα προϊόντα υδρόλυσης είναι σχετικά ικανοποιητικά, παράγοντας κυρίως γλυκόζη, σελλοτριόζη και σελλοτριόζη. Οι άλλες δύο μορφές κυτταρίνης (Avicell/Cell123) δεν αποδομούνται σε σημαντικό βαθμό, δίνοντας ελάχιστες ποσότητες σελλοβιόζης και σελλοτριόζης.



ΓΡΑΦΗΜΑ 30: Στο γράφημα παρουσιάζεται η υψηλή απόδοση που εμφανίζει η υπό μελέτη κυτταρινάση GH5 του βακτηριακού στελέχους *Geobacillus* sp. SP50 στην κυτταρίνη CMC. Πιο αναλυτικά, η συγκεκριμένη κυτταρίνη αποδομείται από την CMCάση Cel5 σε πληθώρα μονομερών προϊόντων (G1/G2/G3/G4/G5), με την σελλοβιόζη, την σελλοτριόζη και την σελλοπενταόζη να παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες. Φαίνεται πως η κυτταρινάση GH5 έχει τόσο καλή απόδοση στην συγκεκριμένη κυτταρίνη σε σχέση με άλλες κυτταρίνες που προαναφέρθηκαν παραπάνω, γιατί CMC-κυτταρίνη είναι κατά κύριο λόγο άμορφη, ενώ οι υπόλοιπες είναι κυρίως κρυσταλλικές, με εξαίρεση την PASC που έχει και αυτή εν μέρη άμορφα τμήματα στη δομή της.

Συζήτηση

Συζήτηση

Τη τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί ραγδαία αύξηση και εξέλιξη των γνώσεων όσον αφορά την κατανόηση της φυσιολογίας των βακτηρίων του γένους *Geobacillus* (Studholme, 2015). Η επιστημονική κοινότητα άρχισε να χρησιμοποιεί πιο εντατικά στελέχη του γένους των γεωβακίλλων, αφού είναι σε θέση τα συγκεκριμένα βακτήρια να παράγουν από διάφορα ένζυμα μέχρι βιοκαύσιμα (Marchant and Banat, 2010). Τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη είναι θετικά κατά Gram αερόβια βακτήρια, ή δυνητικά αναερόβια, που σχηματίζουν ενδοσπόρια (Ash et al, 1991). Πιο συγκεκριμένα με βάση 16SrRNA/recN, το γένος *Geobacillus* περιλαμβάνει τώρα 11 είδη: a) *G. stearothermophilus*, b) *G. caldxylosilyticus*, c) *G. jurassicus*, d) *G. subterraneus*, e) *G. thermoantarticus*, f) *G. thermocatenulatus*, g) *G. thermodenitrificans*, h) *G. thermoglycosidasius*, j) *G. thermoleovorans*, i) *G. toebii*, & k) *G. uzenensis* (Logan, 2014). Η πλειοψηφία των στελεχών του γένους των γεωβακίλλων μπορεί να αυξηθεί από 45 έως 70°C, ενώ μπορούν σχετικά εύκολα να απομονωθούν από διάφορες περιοχές, όπως λιπάσματα, ιαματικές πηγές, βαθιές γεωθερμικές τοποθεσίες (Zeigler, 2014). Η περιεκτικότητα σε G+C του γονιδιώματος των γεωβακίλλων είναι από 48,2 έως 58% (Bezuidt et al, 2016). Αξίζει να σημειωθεί πως οι γεωβάκιλλοι έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν εμπορικά χρήσιμα ένζυμα, όπως αμυλάσες, πρωτεάσες, ισομεράσες, φωσφορυλάσες, λιπάσες, ημικυτταρινάσες, με απότοκο τα διάφορα στελέχη *Geobacillus* sp. να γίνονται αντικείμενο εκμετάλλευσης (Coorevits et al, 2012; Logan, 2014; Bryanskaya et al, 2015). Όσον αφορά την μεταβολική μηχανική για την παραγωγή καυσίμων και διαφόρων χημικών προϊόντων, η πιο ευρέως μελετημένη βιοτεχνολογική εφαρμογή των γεωβακίλλων είναι η ζύμωση για την παραγωγή βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς, μία προσπάθεια που έχει εστιαστεί κυρίως στο γεωβάκιλλο *G. Thermoglucosidasius* (Hussein et al, 2015).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε μία προσπάθεια να μελετηθούν τα βακτηριακά στελέχη *Geobacillus* sp. SP24 και *Geobacillus* sp. SP50 (Stathopoulou et al, 2012; Brumm et al, 2014; Brumm et al, 2015). Τα στελέχη αυτά έχουν απομονωθεί το 2003 από την περιοχή της Νέας Καμμένης στην Σαντορίνη (Santorini, Greece, 25°25' N, 36°25' E) (Kuisiene et al, 2007; Meintanis et al, 2006). Τα δύο αυτά στελέχη, όντας γεωβάκιλλοι (*Bacteria*; *Firmicutes*; *Bacilli*; *Bacillales*; *Bacillaceae*; *Geobacillus*) εμφανίζουν κάποια χαρακτηριστικά που ταιριάζουν με την πλειοψηφία των *Geobacillus* spp. (Zeigler, 2014), όπως είναι Gram[+], το σχήμα των κυττάρων είναι βάκιλλοι/αλυσίδες βακίλλων, σχηματίζουν ενδοσπορίων, ενώ έχουν εύρος θερμοκρασίας από 50 έως 75°C [βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης - 65°C], και εύρος pH από 5,5 έως 8,0 [βέλτιστο pH ανάπτυξης - 6.5]. Ακόμα, είναι αερόβια - δυνητικά αναερόβια βακτήρια, και μη-παθογόνα (Nazina et al, 2001; Zeigler, 2005).

Με απώτερο σκοπό την παρουσίαση των φυλογενετικών σχέσεων των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών εντός του γένους των γεωβακίλλων (*Geobacillus*), κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με διάφορες φυλογενετικές μεθόδους. Για την εξαγωγή αυτών των συμπερασμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης, η οποίες είναι η μέθοδος Σύνδεσης Γειτόνων (Neighbor Joining), η μέθοδος της Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum parsimony), και η Μπείσειανή Συμπερασματολογία (Bayesian Inference) (Saitou and Nei, 1987; Swofford et al, 1996; Huelsenbeck et al, 2001; Tamura et al, 2013; Studholme, 2014; Logan, 2014; Hussein et al, 2015). Από τον συνδυασμό των τριών παραχθέντων φυλογενετικών δέντρων για το γονίδιο 16S rDNA, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα δύο στελέχη των γεωβακίλλων που εξετάσαμε ανήκουν στον κλάδο "kaustophilus". Πιο συγκεκριμένα, σε επίπεδο είδους σύμφωνα πάντα με την φυλογενετική μελέτη υποστηρίζεται πως τόσο το *Geobacillus* sp. SP24 και το *Geobacillus* sp. SP50, ανήκουν στο είδος *Geobacillus thermoparaffinivorans* (Abol Fotouh et al, 2016).

Από τα δύο βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν πειραματικά, με στόχο την πληρέστερη κατανόηση της φυσιολογίας τους (McMullan et al, 2004; Brux et al, 2006; Chamkha et al, 2008), το στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 παρουσιάζει μεγαλύτερο επιστημονικό και βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον από το *Geobacillus* sp. SP24 ως θερμόφιλος μικροοργανισμός (Meintanis et al, 2008; Rozanov et al, 2014), αφού πέρα από την παραγωγή ξυλανασών, έχει και κυτταρινολυτική ικανότητα (Ng et al, 2009; Rastogi et al, 2010; Mitra et al, 2014; Brumm et al, 2015; Kananavičiūtė and Čitavičius, 2015), κάνοντας το σχεδόν μοναδικό, αφού βιβλιογραφικά ελάχιστα στελέχη του γένους *Geobacillus* έχει βρεθεί ότι παράγουν κυτταρινάσες της οικογένειας GH5/CelA [endo-β-1,4-glucanase / cellulase (EC 3.2.1.4)] (Khasin et al, 1993; Tai et al, 2004; Takami et al, 2004; Czjzek et al, 2005).

Πιο αναλυτικά, τα υπο μελέτη στελέχη *Geobacillus*, και συγκεκριμένα το βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. SP50 (Stathopoulou et al, 2012), παράγουν ημικυτταρινάσες (ξυλανάσες κ.α.). Ωστόσο, είναι ένα από τα ελάχιστα βακτηριακά στελέχη των γεωβακίλλων παγκοσμίως που έχει βρεθεί πως παράγουν εκτός των άλλων και κυτταρινάσες (οικογένεια GH5/CelA). Το υπό εξέταση ένζυμο της GH5 ενδογλυκανάσης (Cel5) του στελέχους *Geobacillus* sp. SP50 (Galanopoulou et al, 2016) είναι ιδιαίτερα σταθερό και λειτουργικό σε παρόμοιες τιμές pH και θερμοκρασίας, όπως και η κυτταρινάση του *Geobacillus* sp. 70PC53. Το ένζυμο εμφανίζει το ένζυμο εμφανίζει μέγιστη ενεργότητα στο pH=6 [optimal pH], με εύρος ικανοποιητικής λειτουργίας από το pH=5 μέχρι το pH=7. Ακόμα, το ένζυμο ελέγχθηκε και σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από τους 55°C μέχρι τους 80°C. Βρέθηκε πως η T-optimal είναι στους 65°C για την GH5/CelA, αλλά με εύρος ικανοποιητικής λειτουργίας από τους 60°C μέχρι τους 70°C. Όσον αφορά την

σταθερότητα της GH5 κυτταρινάσης σε διάφορες θερμοκρασίες, παρατηρούμε πως η σχετική ενεργότητα του ενζύμου παραμένει σε πολύ υψηλά επίπεδα πάνω από 90-95% για θερμοκρασίες 60-65°C, με χρόνο επώασης πάνω από 2 ημέρες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως, η κυτταρινάση GH5 εντοπίζεται ελεύθερη στο υπερκείμενο και όχι στο ίζημα των κυττάρων, δείχνοντας πως πρόκειται για εξωκυττάριο ένζυμο. Από τον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε για πιθανή παρεμποδιστική δράση της σελλοβιόζης και της γλυκόζης στο ένζυμο κυτταρινάση GH5, ενώ αποδομεί το CMC [Carboxy-methyl-Cellulose], η σελλοβιόζη παρουσιάζει παρεμπόδιση, κάτι που δεν διαπιστώνεται με την παρουσία γλυκόζης. Το ένζυμο φαίνεται να παράγει επίσης κατά την αποδόμηση του CMC, κυρίως σελλοβιόζη, σελλοτριόζη, και σελλοπεντόζη. Πρόσφατα λύθηκε και η κρυσταλλογραφική δομή της πρωτεΐνης ενδογλυκανάσης *GsCelA P1* [PDB: 4XZB] με την χρήση ακτίνων-X (Lee et al, 2015) από το στέλεχος *Geobacillus* sp. 70PC53.

Από τα διάφορα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής, δείχνουν πως το συγκεκριμένο βακτήριο - *Geobacillus* sp. SP50 - έχει μεγάλη βιοτεχνολογική σημασία και καθίσταται ιδιαίτερα χρήσιμο όσον αφορά την παραγωγή ενέργειας (βιοκαυσίμων) από διάφορες ανανεώσιμες πηγές, αφού τα ένζυμά του (ξυλανάσες κ.α), και κυρίως η κυτταρινάση GH5, που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους επιστήμονες μέσω ετερόλογης έκφρασης σε άλλους μικροοργανισμούς μοντέλα [συνθετική βιολογία – παραγωγή βιοκαυσίμων] (Lamsen and Atsumi, 2012; Reyes et al, 2012; Adkins et al, 2012; Wang et al, 2012; Jun Lee et al, 2013; Chiarabelli et al, 2013; Zhang and Nielsen, 2014).

Συμπερασματικά, η κυτταρίνη αποτελεί το αφθονότερο οργανικό πολυμερές που συναντάται στη φύση (Horn et al, 2012), γεγονός που την καθιστά κατάλληλη ως φτηνά αξιοποιήσιμη πηγή άνθρακα και πρώτη ύλη για ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Sticklen, 2008; Burton et al, 2010; Ratanakhanokchai et al, 2013), όπως η παραγωγή στερεών και υγρών βιοκαυσίμων. Ως εκ τούτου, η απομόνωση νέων ενζύμων με δράση που στοχεύει στην αποικοδόμηση ή την τροποποίηση των κυτταρινούχων υλικών κρίνεται απαραίτητη (Hussein et al, 2015). Οι θερμοφιλοι οργανισμοί, όπως τα βακτηριακά στελέχη του γένους *Geobacillus* (Marchant and Barat, 2010; Logan, 2014), αποτελούν σημαντική πηγή κυτταρινολυτικών ενζύμων με πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές, καθώς οι διεργασίες αυτές συνήθως απαιτούν συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας.

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

- Abol Fotouh, D. M., Bayoumi, R. A., & Hassan, M. A. (2016). Production of Thermoalkaliphilic Lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and Application in Leather Industry. *Enzyme research*, 2016.
- Adebayo, E. A., & Martínez-Carrera, D. (2015). Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. *African Journal of Biotechnology*, 14(1), 52-67.
- Adkins, J., Pugh, S., McKenna, R., & Nielsen, D. R. (2014). Engineering microbial chemical factories to produce renewable "biomonomers". *Synthetic biology applications in industrial microbiology*, 31.
- Alalouf, O., Balazs, Y., Volkinshtein, M., Grimpel, Y., Shoham, G., & Shoham, Y. (2011). A new family of carbohydrate esterases is represented by a GDSL hydrolase/acetylxyylan esterase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 41993-42001.
- Alm, E. J., Huang, K. H., Price, M. N., Koche, R. P., Keller, K., Dubchak, I. L., & Arkin, A. P. (2005). The MicrobesOnline Web site for comparative genomics. *Genome research*, 15(7), 1015-1022.
- Alper, Hal, and Gregory Stephanopoulos. "Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential?." *Nature Reviews Microbiology* 7.10 (2009): 715-723.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Ansorge-Schumacher, M. B., & Thum, O. (2013). Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6475-6490.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., & Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 13(4), 202-206.
- Aspeborg, H., Coutinho, P. M., Wang, Y., Brumer, H., & Henrissat, B. (2012). Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC evolutionary biology*, 12(1), 1.
- Atsumi, Shota, and James C. Liao. "Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*." *Current opinion in biotechnology* 19.5 (2008): 414-419.
- Bajpai, P. (2013). Global Production of Bioethanol. In *Advances in Bioethanol*(pp. 79-88). Springer India.
- Baker, R. N., Alenty, A. L., & Zack, J. F. (1969). Simultaneous determination of lower alcohols, acetone and acetaldehyde in blood by gas chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 7(5), 312-314.
- Balan, A., Ibrahim, D., Abdul Rahim, R., & Ahmad Rashid, F. A. (2012). Purification and characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra. *Enzyme research*, 2012.
- Balazs, Y. S., Lisitsin, E., Carmiel, O., Shoham, G., Shoham, Y., & Schmidt, A. (2013). Identifying critical unrecognized sugar-protein interactions in GH10 xylanases from *Geobacillus stearothermophilus* using STD NMR. *FEBS Journal*, 280(18), 4652-4665.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Biochemistry New York. NY: *WH Freeman*.
- Bezuidt, O. K., Pierneef, R., Gomri, A. M., Adesioye, F., Makhalanyane, T. P., Kharroub, K., & Cowan, D. A. (2016). The *Geobacillus* Pan-Genome: Implications for the Evolution of the Genus. *Frontiers in microbiology*, 7.
- Bin, L., Zhao, C., & Xie, L. H. (2012). haracterization of a Recombinant Thermostable Xylanase from Hot Spring Thermophilic *Geobacillus* sp. TC-W7. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(10), 1388-1394.
- Boonmak, C., Takahashi, Y., & Morikawa, M. (2014). Cloning and expression of three ladA-type alkane monooxygenase genes from an extremely thermophilic alkane-degrading bacterium *Geobacillus thermoleovorans* B23. *Extremophiles*, 18(3), 515-523.
- Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R., & Krishna, S. H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in biotechnology*, 20(10), 433-437.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brumm, P. J., Land, M. L., & Mead, D. A. (2015). Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93, a novel biomass degrader isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Standards in genomic sciences*, 10(1), 1.

Brumm, P., Land, M. L., Hauser, L. J., Jeffries, C. D., Chang, Y. J., & Mead, D. A. (2014). Complete genome sequences of *Geobacillus* sp. Y412MC52, a xylan-degrading strain isolated from obsidian hot spring in Yellowstone National Park. *Standards in genomic sciences*, 10(1), 1.

Brück, C., Ben-David, A., Shallom-Shezifi, D., Leon, M., Niefind, K., Shoham, G., ... & Schomburg, D. (2006). The structure of an inverting GH43 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. *Journal of molecular biology*, 359(1), 97-109.

Bryanskaya, A. V., Rozanov, A. S., Slynko, N. M., Shekhovtsov, S. V., & Peltek, S. E. (2015). *Geobacillus icigianus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(3), 864-869.

Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural product reports*, 28(12), 1883-1896.

Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Singh, R. (2011). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current opinion in biotechnology*, 22(3), 394-400.

Burrows, S. M., Elbert, W., Lawrence, M. G., & Pöschl, U. (2009). Bacteria in the global atmosphere—Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 9(23), 9263-9280.

Burton, Rachel A., Michael J. Gidley, and Geoffrey B. Fincher. "Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls." *Nature chemical biology* 6.10 (2010): 724-732.

Buswell, J. A., & Twomey, D. G. (1975). Utilization of phenol and cresols *Bacillus stearothermophilus*, strain PH24. *Microbiology*, 87(2), 377-379.

Chamkha, M., Mnif, S., & Sayadi, S. (2008). Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading *Geobacillus* from a Tunisian high-temperature oil field. *FEMS microbiology letters*, 283(1), 23-29.

Charbonneau, D. M., Meddeb-Mouelhi, F., & Beauregard, M. (2010). A novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*: evidence for a new carboxylesterase family. *Journal of biochemistry*, 148(3), 299-308.

Chee, G. J., Takaki, Y., & Takami, H. (2004). Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic acids research*, (21), 6292-6303.

Chen, X. G., Stabnikova, O., Tay, J. H., Wang, J. Y., & Tay, S. T. L. (2004). Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. *Extremophiles*, 8(6), 489-498.

Chiarabelli, C., Stano, P., & Luisi, P. L. (2014). Chemical synthetic biology: a mini-review. *Synthetic biology applications in industrial microbiology*, 123.

Clomburg, James M., and Ramon Gonzalez. "Biofuel production in *Escherichia coli*: the role of metabolic engineering and synthetic biology." *Applied microbiology and biotechnology* 86.2 (2010): 419-434.

Connor, Michael R., and Shota Atsumi. "Synthetic biology guides biofuel production." *BioMed Research International* 2010 (2010).

Coorevits, A., Dinsdale, A. E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., & Logan, N. A. (2012). Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidasius* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(7), 1470-1485.

Crewe, A. V., Wall, J., & Welter, L. M. (1968). A high-resolution scanning transmission electron microscope. *Journal of Applied Physics*, 39(13), 5861-5868.

- Cripps, R. E., Eley, K., Leak, D. J., Rudd, B., Taylor, M., Todd, M., ... & Atkinson, T. (2009). Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metabolic engineering*, 11(6), 398-408.
- Czjzek, M., David, A. B., Bravman, T., Shoham, G., Henrissat, B., & Shoham, Y. (2005). Enzyme-substrate complex structures of a GH39 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of molecular biology*, 353(4), 838-846.
- Dai, J., Liu, Y., Lei, Y., Gao, Y., Han, F., Xiao, Y., & Peng, H. (2011). A new subspecies of *Anoxybacillus flavithermus* ssp. *yunnanensis* ssp. nov. with very high ethanol tolerance. *FEMS microbiology letters*, 320(1), 72-78.
- Dale, Jeremy W., and Simon F. Park. *Molecular genetics of bacteria*. John Wiley & Sons, 2013.
- De Clercq, E. (2011). A 40-Year Journey in Search of Selective Antiviral Chemotherapy*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 51, 1-24.
- De Maayer, P., Brumm, P. J., Mead, D. A., & Cowan, D. A. (2014). Comparative analysis of the *Geobacillus* hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulolysis. *BMC genomics*, 15(1), 1.
- DeAngelis, Kristen M., et al. "Evidence supporting dissimilatory and assimilatory lignin degradation in *Enterobacter lignolyticus* SCF1." *Frontiers in microbiology* 4 (2013).
- Dieffenbach, C. W., & Dveksler, G. S. (2003). *PCR primer: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dieffenbach, C. W., Dveksler, G. S., & Primer, P. C. R. (1995). A Laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Doi, Roy H., and Akihiko Kosugi. "Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes." *Nature Reviews Microbiology* 2.7 (2004): 541-551.
- Duffner, F. M., Kirchner, U., Bauer, M. P., & Müller, R. (2000). Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene*, 256(1), 215-221.
- Eisert, R., & Levsen, K. (1996). Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A*, 733(1), 143-157.
- Eram, M. S., & Ma, K. (2013). Decarboxylation of pyruvate to acetaldehyde for ethanol production by hyperthermophiles. *Biomolecules*, 3(3), 578-596.
- Ewis, H. E., Abdelal, A. T., & Lu, C. D. (2004). Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene*, 329, 187-195.
- Ezeji, T. C., & Bahl, H. (2006). Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. *Journal of biotechnology*, 125(1), 27-38.
- Feitkenhauer, H., Müller, R., & MAuml, H. (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 6070 C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation*, 14(6), 367-372.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- Feng, L., Wang, W., Cheng, J., Ren, Y., Zhao, G., Gao, C., ... & Liu, R. (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5602-5607.
- Förster, Andreas H., and Johannes Gescher. "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2 (2014).
- Galanopoulou, A. P., Moraïs, S., Georgoulis, A., Morag, E., Bayer, E. A., & Hatzinikolaou, D. G. (2016). Insights into the functionality and stability of designer cellulosomes at elevated temperatures. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-13.
- Galperin, M. Y., Mekhedov, S. L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y. I., & Rigden, D. J. (2012). Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental microbiology*, 14(11), 2870-2890.

Garfinkel, Michele S., et al. "Synthetic genomics: options for governance." *Industrial Biotechnology* 3.4 (2007): 333-365.

Garland, J. L., & Mills, A. L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and environmental microbiology*, 57(8), 2351-2359.

Giannoutsou, E. P., Meintanis, C., & Karagouni, A. D. (2004). Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability for its fermentation. *Bioresource technology*, 93(3), 301-306.

Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R. Y., Algire, M. A., ... & Merryman, C. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *science*, 329(5987), 52-56.

Gil, Rosario, et al. "Determination of the core of a minimal bacterial gene set." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68.3 (2004): 518-537.

Hadidi, A., & Candresse, T. (2003). Polymerase chain reaction. *Viroids, properties, detection, diseases and their control*, 115-121.

Hahn-Hägerdal, Bärbel, et al. "Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today." *Trends in biotechnology* 24.12 (2006): 549-556.

Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.

Hawumba, J. F., Theron, J., & Brözel, V. S. (2002). Thermophilic protease-producing *Geobacillus* from Buranga hot springs in Western Uganda. *Current microbiology*, 45(2), 144-150.

He, M. X., Wu, B., Qin, H., Ruan, Z. Y., Tan, F. R., Wang, J. L., ... & Tang, X. Y. (2014). *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnology for biofuels*, 7(1).

Herring, Christopher D., and Frederick R. Blattner. "Conditional lethal amber mutations in essential *Escherichia coli* genes." *Journal of bacteriology* 186.9 (2004): 2673-2681.

Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.

Hussein, A. H., Lisowska, B. K., & Leak, D. J. (2015). Chapter One-The Genus *Geobacillus* and Their Biotechnological Potential. *Advances in applied microbiology*, 92, 1-48.

Ingram, L. O., and T. Conway. "Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*." *Applied and environmental microbiology* 54.2 (1988): 397-404.

Ingram, L. O., et al. "Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* 53.10 (1987): 2420-2425.

Iqbal, I., Aftab, M. N., Afzal, M., Ur-Rehman, A., Aftab, S., Zafar, A., ... & Ul-Haq, I. (2015). Purification and characterization of cloned alkaline protease gene of *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of basic microbiology*, 55(2), 160-171.

Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in Biotechnology*, 13(4), 390-397.

Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 315-351.

Joachimsthal, Eva, et al. "A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations." *Biotechnology letters* 20.2 (1998): 137-142.

Juhas, Mario, Leo Eberl, and John I. Glass. "Essence of life: essential genes of minimal genomes." *Trends in cell biology* 21.10 (2011): 562-568.

Kananavičiūtė, R., & Čitavičius, D. (2015). Genetic engineering of *Geobacillus* spp. *Journal of microbiological methods*, 111, 31-39.

Kang, Yisheng, et al. "Systematic mutagenesis of the *Escherichia coli* genome." *Journal of bacteriology* 186.15 (2004): 4921-4930.

- Khanniri, E., Bagheripoor-Fallah, N., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., Khosravi-Darani, K., & Mohammad, R. (2016). Application of liposomes in some dairy products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(3), 484-493.
- Khasin, A., Alchanati, I., & Shoham, Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1725-1730.
- Kirchner, U., Westphal, A. H., Müller, R., & van Berkel, W. J. (2003). Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47545-47553.
- Kitagawa, Masanari, et al. "Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (a complete set of E. coli K-12 ORF archive): unique resources for biological research." *DNA research* 12.5 (2006): 291-299.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., & Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of molecular biology*, 56(2), 341-361.
- König, Harald, et al. "Synthetic genomics and synthetic biology applications between hopes and concerns." *Current genomics* 14.1 (2013): 11.
- Korshunova, A. V., Tourova, T. P., Shestakova, N. M., Mikhailova, E. M., Poltarau, A. B., & Nazina, T. N. (2011). Detection and transcription of n-alkane biodegradation genes (alkB) in the genome of a hydrocarbon-oxidizing bacterium *Geobacillus subterraneus* K. *Microbiology*, 80(5), 682-691.
- Kouvelis, Vassili N., et al. "Finished genome of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* strain CP4, an applied ethanol producer." *Genome announcements* 2.1 (2014): e00845-13.
- Kovács, Á. T., Smits, W. K., Mirończuk, A. M., & Kuipers, O. P. (2009). Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. *Environmental microbiology*, 11(8), 1911-1922.
- Kuisiene, N., Raugalas, J., Stuknyte, M., & Chitavichius, D. (2007). Identification of the genus *Geobacillus* using genus-specific primers, based on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer. *FEMS microbiology letters*, 277(2), 165-172.
- Kuriki, T., Okada, S., & Imanaka, T. (1988). New type of pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 170(4), 1554-1559.
- Lamsen, E. N., & Atsumi, S. (2014). Recent progress in synthetic biology for microbial production of C3–C10 alcohols. *Synthetic biology applications in industrial microbiology*, 6.
- Lau, Ming W., et al. "Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production." *Biotechnology for Biofuels* 3.1 (2010): 11.
- Lee, H. S., Kim, M. S., Cho, H. S., Kim, J. I., Kim, T. J., Choi, J. H., ... & Park, K. H. (2002). Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21891-21897.
- Lee, Jeong Wook, et al. "Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals." *Nature chemical biology* 8.6 (2012): 536-546.
- Lee, K. Y., Park, J. M., Kim, T. Y., Yun, H., & Lee, S. Y. (2010). The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. *Microbial cell factories*, 9(1), 94.
- Lee, Kyung Y., et al. "The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies." *Microbial cell factories* 9.1 (2010): 94.
- Lee, S. J., Lee, S. J., & Lee, D. W. (2014). Design and development of synthetic microbial platform cells for bioenergy. *Synthetic biology applications in industrial microbiology*, 87.
- Lee, Sang Jun, Sang-Jae Lee, and Dong-Woo Lee. "Design and development of synthetic microbial platform cells for bioenergy." *Frontiers in microbiology* 4 (2013).
- Lee, Sang Yup, Jong Hyun Choi, and Zhaohui Xu. "Microbial cell-surface display." *Trends in biotechnology* 21.1 (2003): 45-52.

Lee, Sung Kuk, et al. "Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels." *Current opinion in biotechnology* 19.6 (2008): 556-563.

Lewis, Daniel D., et al. "Synthetic biology outside the cell: linking computational tools to cell-free systems." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2 (2014).

Li, L., Liu, X., Yang, W., Xu, F., Wang, W., Feng, L., ... & Rao, Z. (2008). Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase. *Journal of molecular biology*, 376(2), 453-465.

Li, W., Zhang, W. W., Yang, M. M., & Chen, Y. L. (2008). Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular biotechnology*, 40(2), 195-201.

Lin, P. P., Rabe, K. S., Takasumi, J. L., Kadisch, M., Arnold, F. H., & Liao, J. C. (2014). Isobutanol production at elevated temperatures in thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Metabolic engineering*, 24, 1-8.

Liu, Y. C., Zhou, T. T., Zhang, J., Xu, L., Zhang, Z. H., Shen, Q. R., & Shen, B. (2009). Molecular characterization of the alkB gene in the thermophilic *Geobacillus* sp. strain MH-1. *Research in microbiology*, 160(8), 560-566.

Logan, N. A. (2014). The Genus *Geobacillus*. In *The Prokaryotes* (pp. 133-147). Springer Berlin Heidelberg.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.

Marchant, R., & Banat, I. M. (2010). The genus *Geobacillus* and hydrocarbon utilization. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1887-1896). Springer Berlin Heidelberg.

Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., & Berzano, M. (2002). The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental Microbiology*, 4(10), 595-602.

Marchant, R., Franzetti, A., Pavlostathis, S. G., Tas, D. O., Erdbrügger, I., Únyayar, A., ... & Banat, I. M. (2008). Thermophilic bacteria in cool temperate soils: are they metabolically active or continually added by global atmospheric transport?. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(5), 841-852.

Marchant, R., Sharkey, F. H., Banat, I. M., Rahman, T. J., & Perfumo, A. (2006). The degradation of n-hexadecane in soil by thermophilic geobacilli. *FEMS microbiology ecology*, 56(1), 44-54.

Margeot, Antoine, et al. "New improvements for lignocellulosic ethanol." *Current opinion in biotechnology* 20.3 (2009): 372-380.

Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., García-Carmona, F., Takami, H., & Sánchez-Ferrer, Á. (2008). Characterization and structural modeling of a novel thermostable glycine oxidase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 70(4), 1429-1441.

Masai, Eiji, et al. "Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6." *Applied and environmental microbiology* 68.9 (2002): 4416-4424.

Masai, Eiji, et al. "Detection and localization of a new enzyme catalyzing the β -aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6)." *FEBS letters* 249.2 (1989): 348-352.

Masai, Eiji, Yoshihiro Katayama, and Masao Fukuda. "Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.1 (2007): 1-15.

McCarthy, B. J., & Bolton, E. T. (1964). Interaction of complementary RNA and DNA. *Journal of molecular biology*, 8(2), 184-200.

McMullan, G., Christie, J. M., Rahman, T. J., Banat, I. M., Ternan, N. G., & Marchant, R. (2004). Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. *Biochemical Society Transactions*, 32(2), 214-217.

Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362-1375.

Meintanis, C., Chalkou, K. I., Kormas, K. A., & Karagouni, A. D. (2006). Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island. *Biodegradation*, 17(2), 3-9.

Meintanis, C., Chalkou, K. I., Kormas, K. A., Lymperopoulou, D. S., Katsifas, E. A., Hatzinikolaou, D. G., & Karagouni, A. D. (2008). Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus Geobacillus. *Letters in applied microbiology*, 46(3), 395-401.

Menon, Vishnu, and Mala Rao. "Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept." *Progress in Energy and Combustion Science* 38.4 (2012): 522-550.

Mirończuk, A. M., Kovács, Á. T., & Kuipers, O. P. (2008). Induction of natural competence in *Bacillus cereus* ATCC14579. *Microbial biotechnology*, 1(3), 226-235.

Mitra, S., Mukhopadhyay, B. C., Mandal, A. R., Arukha, A. P., Chakrabarty, K., Das, G. K., ... & Biswas, S. R. (2015). Cloning, overexpression, and characterization of a novel alkali-thermostable xylanase from *Geobacillus* sp. WBI. *Journal of basic microbiology*, 55(4), 527-537.

Montoro-García, S., Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., Takami, H., García-Carmona, F., & Sánchez-Ferrer, Á. (2009). Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family. *Journal of bacteriology*, 191(9), 3076-3085.

Moraïs, S., Morag, E., Barak, Y., Goldman, D., Hadar, Y., Lamed, R., ... & Bayer, E. A. (2012). Deconstruction of lignocellulose into soluble sugars by native and designer cellulosomes. *MBio*, 3(6), e00508-12.

Moraïs, S., Stern, J., Kahn, A., Galanopoulou, A. P., Yoav, S., Shamshoum, M., ... & Bayer, E. A. (2016). Enhancement of cellulosome-mediated deconstruction of cellulose by improving enzyme thermostability. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 164.

Moraïs, Sarah, et al. "Deconstruction of lignocellulose into soluble sugars by native and designer cellulosomes." *MBio* 3.6 (2012): e00508-12.

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.

Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 155, 335.

Mullis, K. B., Erlich, H. A., Gelfand, D. H., Horn, G., & Saiki, R. K. (1990). *U.S. Patent No. 4,965,188*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Mullis, K., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series*, 17-17.

Mushegian, Arcady R., and Eugene V. Koonin. "A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93.19 (1996): 10268-10273.

Mushegian, Arcady. "The minimal genome concept." *Current opinion in genetics & development* 9.6 (1999): 709-714.

Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.

Ng, I. S., Li, C. W., Yeh, Y. F., Chen, P. T., Chir, J. L., Ma, C. H., ... & Tong, C. G. (2009). A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. *Extremophiles*, 13(3), 425-435.

Nicholson, W. L. (2003). Using thermal inactivation kinetics to calculate the probability of extreme spore longevity: implications for paleomicrobiology and lithopanspermia. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 33(6), 621-631.

Nielsen, J. E., & Borchert, T. V. (2000). Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 253-274.

Notani, N. K., & Setlow, J. K. (1974). Mechanism of bacterial transformation and transfection. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 14, 39-100.

- Offen, W. A., Viksoe-Nielsen, A., Borchert, T. V., Wilson, K. S., & Davies, G. J. (2015). Three-dimensional structure of a variant Termamyl-like Geobacillus stearothermophilus α -amylase at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 71(1), 66-70.
- Ogden, T. H., & Rosenberg, M. S. (2006). Multiple sequence alignment accuracy and phylogenetic inference. *Systematic Biology*, 55(2), 314-328.
- Ohta, Kazuyoshi, et al. "Genetic improvement of Escherichia coli for ethanol production: chromosomal integration of Zymomonas mobilis genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II." *Applied and Environmental Microbiology* 57.4 (1991): 893-900.
- Ohta, Masahiko, Takayoshi Higuchi, and Shojiro Iwahara. "Microbial degradation of dehydrodiconiferyl alcohol, a lignin substructure model." *Archives of Microbiology* 121.1 (1979): 23-28.
- Omokoko, B., Jäntges, U. K., Zimmermann, M., Reiss, M., & Hartmeier, W. (2008). Isolation of the phe-operon from G. stearothermophilus comprising the phenol degradative meta-pathway genes and a novel transcriptional regulator. *BMC microbiology*, 8(1), 197.
- Panda, T., & Gowrishankar, B. S. (2005). Production and applications of esterases. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(2), 160-169.
- Pavlostathis, S. G., Marchant, R., Banat, I. M., Ternan, N. G., & McMullan, G. (2006). High growth rate and substrate exhaustion results in rapid cell death and lysis in the thermophilic bacterium Geobacillus thermoleovorans. *Biotechnology and bioengineering*, 95(1), 84-95.
- Ragauskas, Arthur J., et al. "Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery." *Science* 344.6185 (2014): 1246843.
- Ragauskas, Arthur J., et al. "The path forward for biofuels and biomaterials." *science* 311.5760 (2006): 484-489.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Leow, T. C., Salleh, A. B., & Basri, M. (2007). Geobacillus zalihae sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *BMC microbiology*, 7(1), 1.
- Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Christopher, L. P., & Sani, R. K. (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by Bacillus and Geobacillus strains. *Bioresource technology*, 101(22), 8798-8806.
- Rastogi, Gurdeep, et al. "Presence of glucose, xylose, and glycerol fermenting bacteria in the deep biosphere of the former Homestake gold mine, South Dakota." *Frontiers in microbiology* 4 (2013).
- Ratanakhanokchai, Khanok, et al. "Paenibacillus curdlanolyticus strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization." *Biomass Now-Cultivation and Utilization* (2013).
- Reyes, L. H., Winkler, J., & Kao, K. C. (2012). Visualizing evolution in real-time method for strain engineering. *Frontiers in microbiology*, 3, 198.
- Rodionov, Dmitry A., et al. "Transcriptional regulation of the carbohydrate utilization network in Thermotoga maritima." *Frontiers in microbiology* 4 (2013).
- Rogers, P. L., et al. "Ethanol production by Zymomonas mobilis." *Microbial reactions*. Springer Berlin Heidelberg, (1982), 37-84.
- Rogers, P. L., Kye Joon Lee, and D. E. Tribe. "Kinetics of alcohol production by Zymomonas mobilis at high sugar concentrations." *Biotechnology letters* 1.4 (1979): 165-170.
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (Eds.). (2014). *The Prokaryotes: Actinobacteria*. Springer Berlin Heidelberg.
- Rozanov, A. S., Ivanisenko, T. V., Bryanskaya, A. V., Shekhovtsov, S. V., Logacheva, M. D., Saik, O. V., ... & Peltek, S. E. (2014). Bioinformatics analysis of the genome of Geobacillus stearothermophilus 22 Strain isolated from the Garga hot spring, Baikal Region. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 4(4), 267-272.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324(6093), 163-166.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.

- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sakaff, M. K. L. M., Rahman, A. Y. A., Saito, J. A., Hou, S., & Alam, M. (2012). Complete genome sequence of the thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans* CCB_US3_UF5. *Journal of bacteriology*, 194(5), 1239-1239.
- Salama, R., Alalouf, O., Tabachnikov, O., Zolotnitsky, G., Shoham, G., & Shoham, Y. (2012). The *abp* gene in *Geobacillus stearothermophilus* T-6 encodes a GH27 β -l-arabinopyranosidase. *FEBS letters*, 586(16), 2436-2442.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning* (Vol. 2, pp. 14-9). New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Sambrook, J., Russell, D. W., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)* (Vol. 999). Cold Spring Harbor, New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Schochetman, G., Ou, C. Y., & Jones, W. K. (1988). Polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases*, 1154-1157.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*, 101(3), 514-525.
- Shulami, S., Raz-Pasteur, A., Tabachnikov, O., Gilead-Gropper, S., Shner, I., & Shoham, Y. (2011). The L-Arabinan utilization system of *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of bacteriology*, 193(11), 2838-2850.
- Soliman, N. A., Abdel-Fattah, Y. R., Mostafa, H. E., & Gaballa, A. (2014). Heterologous expression of thermostable esterase gene from *Geobacillus thermoleovorans* YN under different expression promoters. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(1), 119-126.
- Sorek, R., Lawrence, C. M., & Wiedenheft, B. (2013). CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual review of biochemistry*, 82, 237-266.
- Stathopoulou, P. M., Galanopoulou, A. P., Anasontzis, G. E., Karagouni, A. D., & Hatzinikolaou, D. G. (2012). Assessment of the biomass hydrolysis potential in bacterial isolates from a volcanic environment: biosynthesis of the corresponding activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(9), 2889-2902.
- Sticklen, Mariam B. "Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol." *Nature Reviews Genetics* 9.6 (2008): 433-443.
- Studholme, D. J. (2015). Some (bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. *Microbial biotechnology*, 8(1), 40-48.
- Studier, J. A., & Keppler, K. J. (1988). A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Molecular biology and evolution*, 5(6), 729-731.
- Stulnig, T. M., & Amberger, A. (1994). Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *Biotechniques*, 16(3), 402-404.
- Swofford, D. L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), 1996.
- Swofford, D. L., & Sullivan, J. (2003). Phylogeny inference based on parsimony and other methods using PAUP*. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*, cap, 7, 160-206.
- Tabachnikov, O., & Shoham, Y. (2013). Functional characterization of the galactan utilization system of *Geobacillus stearothermophilus*. *FEBS Journal*, 280(3), 950-964.
- Tai, S. K., Lin, H. P. P., Kuo, J., & Liu, J. K. (2004). Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater. *Extremophiles*, 8(5), 345-349.
- Takami, H., Nishi, S., Lu, J., Shimamura, S., & Takaki, Y. (2004). Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench. *Extremophiles*, 8(5), 351-356.
- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G. J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., ... & Uchiyama, I. (2004). Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic acids research*, 32(21), 6292-6303.

- Takami, H., Takaki, Y., Chee, G. J., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., ... & Uchiyama, I. (2004). Thermodaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic acids research*, 32(21), 6292-6303.
- Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, N., & Imanaka, T. (1992). Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at alpha-(1----4)- and alpha-(1----6)-glucosidic linkages. *Journal of Biological Chemistry*, 267(26), 18447-18452.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tang, Y. J. (2009). Analysis of metabolic pathways and fluxes in a newly discovered thermophilic and ethanol-tolerant *Geobacillus* strain. *Lawrence Berkeley National Laboratory*.
- Taylor, M. P., Eley, K. L., Martin, S., Tuffin, M. I., Burton, S. G., & Cowan, D. A. (2009). Thermophilic ethanologenesis: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends in biotechnology*, 27(7), 398-405.
- 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.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Tourova, T. P., Nazina, T. N., Mikhailova, E. M., Rodionova, T. A., Ekimov, A. N., Mashukova, A. V., & Poltarau, A. B. (2008). alkB homologs in thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus*. *Molecular Biology*, 42(2), 217-226.
- Trinh, Cong T., Pornkamol Unrean, and Friedrich Srienc. "Minimal Escherichia coli cell for the most efficient production of ethanol from hexoses and pentoses." *Applied and environmental microbiology* 74.12 (2008): 3634-3643.
- Underwood, S. A., et al. "Lack of protective osmolytes limits final cell density and volumetric productivity of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation." *Applied and environmental microbiology* 70.5 (2004): 2734-2740.
- Van den Heuvel, R. H., Westphal, A. H., Heck, A. J., Walsh, M. A., Rovida, S., van Berkel, W. J., & Mattevi, A. (2004). Structural studies on flavin reductase PheA2 reveal binding of NAD in an unusual folded conformation and support novel mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12860-12867.
- Vander Heiden, M. G. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature reviews Drug discovery*, 10(9), 671-684.
- Waggott, W. (1998). Long Range PCR. In *Clinical Applications of PCR* (pp. 81-91). Humana Press.
- Wang, B., Wang, J., Zhang, W., & Meldrum, D. R. (2012). Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. *Frontiers in microbiology*, 3, 344.
- Wang, L., Tang, Y., Wang, S., Liu, R. L., Liu, M. Z., Zhang, Y., ... & Feng, L. (2006). Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles*, 10(4), 347-356.
- Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., & Throne-Holst, M. (2007). Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), 1209-1221.
- Wolff, S. D., Yancey, P. H., Stanton, T. S., & Balaban, R. S. (1989). A simple HPLC method for quantitating major organic solutes of renal medulla. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 256(5), F954-F956.
- Xiao, G. Q., Corle, T. R., & Kino, G. S. (1988). Real-time confocal scanning optical microscope. *Applied physics letters*, 53(8), 716-718.
- Xiao, Z., Wang, X., Huang, Y., Huo, F., Zhu, X., Xi, L., & Lu, J. R. (2012). Thermophilic fermentation of acetoin and 2, 3-butanediol by a novel *Geobacillus* strain. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 1.
- Xu, Peng, and Mattheos AG Koffas. "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biofuel production." *Biofuels* 1.3 (2010): 493-504.

- Yan, Yajun, and James C. Liao. "Engineering metabolic systems for production of advanced fuels." *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 36.4 (2009): 471-479.
- Yang, Z., Zhang, Y., Shen, T., Xie, Y., Mao, Y., & Ji, C. (2013). Cloning, expression and biochemical characterization of a novel, moderately thermostable GDSL family esterase from *Geobacillus thermodenitrificans* T2. *Journal of bioscience and bioengineering*, 115(2), 133-137.
- Yelle, D. J., Wei, D., Ralph, J., & Hammel, K. E. (2011). Multidimensional NMR analysis reveals truncated lignin structures in wood decayed by the brown rot basidiomycete *Postia placenta*. *Environmental Microbiology*, 13(4), 1091-1100.
- Yomano, L. P., S. W. York, and L. O. Ingram. "Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20.2 (1998): 132-138.
- Zeigler, D. R. (2001). The genus *Geobacillus*. Introduction and strain catalog. *Catalog of strains*, 3.
- Zeigler, D. R. (2005). Application of a recN sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(3), 1171-1179.
- Zeigler, D. R. (2014). The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?. *Microbiology*, 160(1), 1-11.
- Zhang, W., & Nielsen, D. R. (2014). Synthetic biology applications in industrial. *Synthetic biology applications in industrial microbiology*, 4.
- Zhang, Z. G., Yi, Z. L., Pei, X. Q., & Wu, Z. L. (2010). Improving the thermostability of *Geobacillus stearothermophilus* xylanase XT6 by directed evolution and site-directed mutagenesis. *Bioresource technology*, 101(23), 9272-9278.
- Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q., & Shen, P. (2007). Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1592-1597.