

HUGO TREFFNERI GÜMNAASIUM

MARION LISETTE KASELA

12.C KLASS

KESKKONNAPROOVIDEST BAKTERIOFAAGIDE ERALDAMINE JA *PSEUDOMONAS PUTIDA* FAAGIVASTASTE KAITSESÜSTEEMIDE UURIMINE

JUHENDAJAD HEDVIG TAMMAN (TARTU ÜLIKOOL), ÕP ANGELA PEEB

SISSEJUHATUS

Bakteriofaagid ehk faagid on baktereid nakatavad viirused, mis moodustavad suure osa Maa biosfäärist ning omavad olulist tähtsust bakterite arvukuse ja mikroobikoosluste koosseisu reguleerimisel. Nende arvukus ja mitmekesisus on väga suur ning selleks, et faagid suudaksid baktereid tõhusamalt nakatada ja bakterid omakorda end faagide eest kaitsta, on mõlemad rühmad pidevalt evolutsioonilises muutumises. [1] Bakteriofaagide infektsioonitsükkel lõppeb peremeesraku lüüsimisega, mistõttu on bakteritel evolutsiooni käigus kujunenud välja erinevad kaitsesüsteemid faagide vastu. Kaitsesüsteemideks võivad bakteritel olla pärilikud mehhanismid, nagu restriksiooni-modifikatsioonisüsteemid, abortiivse infektsiooni süsteemid, toksiin-antitoksiin süsteemid ja faagi adsorptsiooni takistavad süsteemid, või elu jooksul arenevad mehhanismid, nagu adaptiivset immuunsust tagav CRISPR-Cas. [2] Kaitset teiste faagide eest võivad pakkuda ka profaagid, mis on varem bakteriraku kromosoomi integreerunud bakteriofaagide genoomid [3].

Alates bakteriofaagide avastamisest enam kui sajand tagasi on neid kasutatud erinevates olulistest valdkondades, nagu meditsiinis, põllumajanduses ning toidu- ja biotehnoloogias [1]. Üks tööstusliku tähtsusega bakter on keskkonnabakter *Pseudomonas putida* (töös kasutatud tüve ametlik nimetus *P. alloputida*), mille mitmekülgne ainevahetus ja vastupidavus ekstreemsetele keskkonnatingimustele võimaldavad bakteri kasutamist erinevates eluvaldkondades, näiteks biotehnoloogias saasteainete lagundamiseks ja tööstuslike kemikaalide tootmiseks [4; 5]. Kuigi on teada, et bakteril *P. putida* on olemas erinevad faagivastased kaitsesüsteemid keskkonnas levinud bakteriofaagide vastu võitlemiseks, on teadmised nende süsteemide tõhususe ja varieeruvuse kohta piiratud, sest varem pole palju uuritud, kuidas see bakteriliik end faagide eest kaitseb. Seega on *P. putida* kaitsesüsteemide

uurimine oluline, et vähendada või vältida faagirünnakute riski biotehnoloogilistele protsessidele.

Käesoleva töö eesmärk oli isoleerida erinevatest keskkonnaproovidest *P. putida* tüvesid nakatavaid bakteriofaage, selgitada välja, millised faagivastased kaitsesüsteemid kaitsevad testbakterit eraldatud faagide vastu ning tuvastada nende kaitsesüsteemide tõhusus erinevate faagiperekondade piires. Keskkonnaproovidena kasutati Raadi Majoraadi pargi tiigist võetud veeproovi ja koduaiast võetud kompostihunniku mullaproovi. Faagide keskkonnaproovidest eraldamiseks kasutati bakteri *P. putida* tüve PaW85 deletsioontüvesid Δ Def8 ja Δ Def8RloC. Eesmärgist lähtuvalt püstitati järgnevad uurimisküsimused.

- Milliseid *P. Putida*'t nakatavaid faagiisolaate leidub võetud keskkonnaproovides?
- Millised faagivastased kaitsesüsteemid kaitsevad *P. putida*'t eraldatud faagide vastu?
- Kuidas varieerub kaitsesüsteemide tõhusus erinevate faagiperekondade ja isolaatide korral?

Eesmärgi saavutamiseks keskkonnaproovid filtreeriti ning faagid eraldati proovidest rikastamisel põhineva isolatsioonimeetodiga. Saadud faagid isoleeriti faagide hoiustamispuhvriss (SM puhver). Seejärel paljundati faagide DNA lõike polümeraasi ahelreaktsiooni ehk PCR-meetodiga, määrati faagide perekonnad geelelektroforeesi abil, määrati faagi tiiter ning tehti kolm puhastuskülvi. Järgmisena suurendati faagilahuste kogust, ning määrati uuesti saadud lahuse tiiter. Saadud lahust kasutati ka selleks, et võrrelda tilkkülvi meetodil erinevate bakteri *P. putida* PaW85 tüve derivaatide faagidega nakatumist ning tuvastada aktiivsed kaitsesüsteemid.

Töö praktiline osa viidi läbi Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudis 2024. aasta oktoobrist 2025. aasta veebruarini kaasprofessor Hedvig Tammani juhendamisel.

Töös on allikatena kasutatud peamiselt erinevaid rahvusvahelistes teadusajakirjades ilmunud teadusartikleid, millest enamik saadi virtuaalsete teadustööde andmebaaside kaudu nagu PMC (PubMed Central) ja ScienceDirect.

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	1
KASUTATUD LÜHENDID	4
1. BAKTERIOFAAGID JA BAKTER <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>	5
1.1. Bakteriofaagide mitmekesisus ja elutsükkel.....	5
1.2. <i>P. putida</i> ja selle olulisus	7
1.3. <i>P. putida</i> 't nakatavad faagid ja bioloogiline kollektatsioon CEPEST	7
2. BAKTERITE FAAGIVASTASED KAITSESÜSTEEMID	9
2.1. Faagi adsorptsiooni takistamine	9
2.2. CRISPR-Cas süsteemid	9
2.3. Restriktiooni-modifikatsioonisüsteemid	10
2.4. Abortiivse infektsiooni süsteemid.....	10
2.5. Toksiin-antitoksiin süsteemid.....	11
2.6. Profaagid.....	11
2.7. Uued kaitsesüsteemid	12
3. MATERJAL JA METOODIKA.....	13
3.1. Keskkonnaproovis leiduvate faagide rikastamine peremeesbakteriga	14
3.2. Rikastuskultuurist faagide eraldamine	15
3.3. Faagide perekondade määramine	15
3.4. Faagide puhastamine	16
3.5. Faagitiitri määramine ja faagide paljundamine	17
3.6. Olemasolevate kaitsesüsteemide võrdlemine tilkkülvi meetodil	17
4. TULEMUSED JA ARUTELU	19
4.1. Keskkonnaproovidest eraldatud faagid.....	19
4.2. Eraldatud faagide vastu bakterit kaitsevad kaitsesüsteemid	20
4.2.1. G5 perekonna faage mõjutavad kaitsesüsteemid	21
4.2.2. G8 perekonna faagi mõjutavad kaitsesüsteemid	22
4.2.3. G2 perekonna faagi mõjutavad kaitsesüsteemid	23
4.3. Arutelu.....	23
KOKKUVÕTE	26
SUMMARY	27
KASUTATUD ALLIKAD	29
LISA 1. Faagide perekondade määramiseks kasutatud praimerid.....	32
LISA 2. Faagide kumulatiivne nakatamisvõime	34

KASUTATUD LÜHENDID

Abi süsteem – abortiivse infektsiooni süsteem (ingl *abortive infection system*)

CEPEST – *Pseudomonas putida*'t nakatavate keskkonnafaagide kollektsioon (ingl *Collection of Environmental Pseudomonas putida Phages from Estonia*)

cip – tsiprofloksatsiin (ingl *ciprofloxacin*)

CRISPR-Cas – rühmitatud ehk klasterdatud regulaarsete vahedega lühikesed palindroomsed kordused (ingl *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated*)

dNTP – deoksünukleotiid trifosfaat (ingl *deoxynucleotide triphosphate*), segu neljast deoksünukleotiidist: dATP, dTTP, dCTP, dGTP

dsDNA – kaheaahelaline DNA (ingl *double stranded DNA*)

dsRNA – kaheaahelaline RNA (ingl *double stranded RNA*)

LB – lüsogeenne sööde (ingl *lysogeny broth* või *Luria-Bertani broth*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (ingl *Polymerase Chain Reaction*)

P. putida – *Pseudomonas putida*

RM-süsteem – restriksiooni-modifikatsioonisüsteem (ingl *restriction-modification system*)

ssDNA – üheaahelaline DNA (ingl *single stranded DNA*)

SM – bakteriofaagide hoiustamispuhver (ingl *suspension medium*)

ssRNA – üheaahelaline RNA (ingl *single stranded RNA*)

TA – toksiin-antitoksiin (ingl *toxin-antitoxin*)

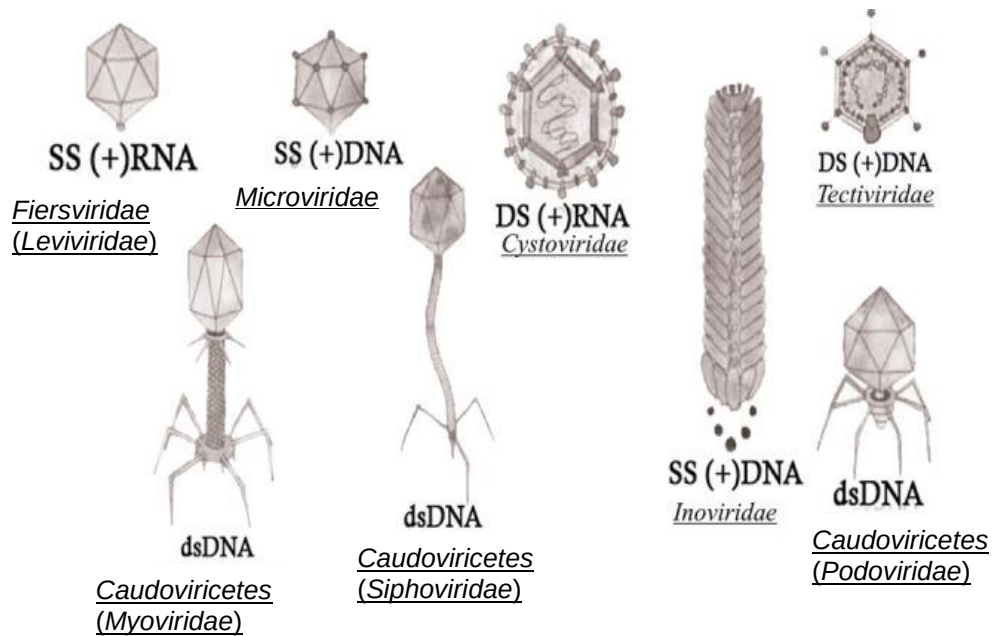
VIRIDIC – viiruste genoomidevaheliste sarnasuste kalkulaator (ingl *Virus Intergenomic Distance Calculator*)

1. BAKTERIOFAAGID JA BAKTER *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Bakteriofaagid on baktereid nakatavad viirused ning nad on ühed kõige laiemalt levinud organismid maailmas. Esmakordselt avastati bakteriofaagid enam kui 100 aastat tagasi, kui inglise bakterioloog Frederick Twort kirjeldas aastal 1915 bakteriofaagide tõttu lüüsunud bakterite kolooniate muutumist klaasjaks ja läbipaistvaks. [6] Aastal 1917 jõudis prantsuse mikrobioloog Felix d'Herelle järeldusele, et neil on võime baktereid tappa ning nimetas nad bakteriofaagideks ehk bakterite sööjateks [7]. Hinnanguliselt on planeedi Maa biosfääris 10^{31} bakteriofaagi ning nende arv ületab peremeesorganismide ehk bakterite, mille rakkudes faagid parasiteerivad, arvu ligi kümnekordselt [8]. Seetõttu on faage isoleeritud igast keskkonnast, kus bakterid eksisteerivad [6].

1.1. Bakteriofaagide mitmekesisus ja elutsükkel

Bakteriofaagide suurus ja morfoloogia on väga varieeruvad. Nende geneetilist materjali ümbritseb ja kaitseb kapsiid. Morfoloogiliselt eristatakse nn saba olemasolu ja valgulise kapsiidi kuju järgi filamentseid, ikosaeedrilisi, polümorfseid ning sabaga või sabata faage (vt joonis 1), kuid siiski umbes 96% ehk enamik teadaolevatest faagidest on ikosaeedrilise kapsiidiga ja sabaga. [1; 9] Mitmekesisust suurendab veelgi nende genoom, mis on miljardite aastate jooksul bakteritega kaaslemise käigus evolutsioneerudes ümber kombineerunud ning on seetõttu väga suure geneetilise varieeruvusega [6]. Enamik faagidest on kaheaahelalise DNA (dsDNA) genoomiga, kuid leidub ka üheaahelalise DNA (ssDNA) ja ühe- või kaheaahelalise RNA (ssRNA või dsRNA) genoomiga bakteriofaage [1].



Joonis 1. Bakteriofaagide erinevad morfoloogiad. Bakteriofaagid erinevad nii genoomi ülesehituse kui ka kuju poolest. Enamik bakteriofaagide klasse ja sugukondi on morfoloogialt hulktahkse ehk ikosaeedrilise kapsiidiga (välja arvatud filamentsed inoviiirused), kas sabaga klassist *Caudoviricetes* (endised sugukonnad *Myoviridae*, *Siphoviridae* ja *Podoviridae*) või sabata ning membraaniga (tsüstoviirused) või membraanita (joonis allikast [1], taksonoomia kaasajastatud International Committee on Taxonomy of Viruses kehtiva taksonoomia alusel <https://ictv.global/taxonomy>)

Seni teadaolevalt on bakteriofaagid väga liigispetsiifilised ja nakatavad ainult ühte bakteriliiki või mõne liigi konkreetset tüve [10]. Bakteriraku nakatamise protsess algab bakteriofaagi seondumisega raku pinnal olevate retseptoritega, milleks võivad olla erinevad valgud, suhkrud või muud sarnased biomolekulid [8]. Seejärel järgib faag kas lüütilist või lüsogeenset infektsioonitsükli. Lüütilised ehk virulentsed faagid sisestavad oma genoomi peremeesbakteri tsütoplasmasse ning kasutavad peremeesraku ressursse ja ribosome uute nakatamisvõimeliste virionide tootmiseks. Bakterirakk lüüsitakse ja sünteesitud virionid vabanevad keskkonda. Lüsogeensed bakteriofaagid on aga võimelised bakteri lüüsimise asemel integreeruma peremeesbakteri kromosoomi profaagina. Profaagid võivad hilisemates etappides muutuda lüütiliseks või jääda lüsogeenseks ning paljuneda peremeesbakteri pooldumisel ilma seda tapmata. [10]

Laia leviku ja väga suure mitmekesisuse pärast on bakteriofaagidel oluline roll erinevates bioloogilistes protsessides ning keskkonna mikroobikoosluse reguleerimises nii looduskeskkonnas kui ka laboritingimustes [1]. Näiteks tapavad bakteriofaagid ööpäevas hinnanguliselt 10–20% veebakterite rakkudest, mõjutades seeläbi tahkete osakeste ja lahustunud süsiniku suhet ning fütoplanktoni produktiivsuse ja hapnikutootmise määra [11]. Lisaks on lüsogeense elutsükliga bakteriofaagid suutelised vahendama bakterite vahelisi geeniülekanmeid ning seega mõjutavad bakteriofaagid bakterite evolutsioonilist arengut,

kujundades nende patogeensustfaktoreid ja kaitsesüsteemide valikuid [6]. Bakteriofaagidel on üldiselt oluline roll ka meditsiinis, toiduainete töötlemises, põllumajanduses, biotehnoloogias ja paljudes muudes valdkondades [1].

1.2. *P. putida* ja selle olulisus

P. putida on gramnegatiivne, pulgakujuline, aeroobne ja reeglina mittepatogeenne bakter, mida leidub mullas ja vees, tihti ka taimede risosfääris, kus sellel on oluline roll taimede kasvu soodustamisel ja nende patogeensete mikroorganismide eest kaitsmisel [12]. *P. putida* on erinevates keskkonnatingimustes vastupidav bakter, mille laia levikut looduses soodustab selle vähenõudlikkus toitumisel, kiire kasv ning vastupidavus oksüdatiivse stressi ja toksiliste kemikaalide vastu [13]. Seetõttu on seda leitud ka näiteks raskmetallide ja orgaaniliste ainetega saastunud muldadest [14].

*P. putida*l on väga mitmekesine ainevahetus ja ta on hästi vastupidav erinevates keskkonnatingimustes, mistõttu on sellel väga suur rakenduspotentsiaal keskkonna- ja tööstussektorites [4]. Praeguseks on *P. putida* laboratoorne tüvi KT2440 ja temaga isogeenne tüvi PaW85 täielikult sekveneeritud [15; 16], kuid teistest *P. putida* tüvedest erinevate geneetiliste markerite tõttu on neid soovitatud klassifitseerida *P. alloputida*'ks. Genoomiinfo aitab mõista bakteri erinevaid ainevahetusradasid, mis on olulised, et saaks konstrueerida võimalikult efektiivseid tüvesid biotehnoloogilisteks kasutusalaadeks [4]. *P. putida*'t kasutatakse näiteks rakuvabrikuna looduslike ühendite biosünteesiks ja erinevate kemikaalide tootmiseks. Keskkonnakaitses kasutatakse *P. putida*'t bioremediatsioonis erinevate toksiliste ainete lagundamiseks. [5]

1.3. *P. putida*'t nakatavad faagid ja bioloogiline kollektsioon CEPEST

Keskkonnast on *P. putida* erinevaid tüvesid nakatavaid faage isoleeritud vähe, sealhulgas on kollektsioonides vähe ka laboratoorsetes tingimustes rohkem kasutatud tüve KT2440 ja selle isogeenset tüve PaW85 nakatavaid faage [17]. Näiteks on aiamullast eraldatud *P. putida* KT2440 tüve nakatav faag nimega MiCath (perekond *Micathvirus*), mis on pikema sabaga *Caudoviricetes* klassi esindaja (varem morfoloogia alusel nimetatud müoviiruseks) (vt joonis 1) ning oli teistest seni sekveneeritud bakteriofaagidest genoomi poolest väga erinev – selle genoomi identsus kõige sarnasema faagi genoomiga oli vaid 2% [18]. Lisaks on faagiresistentsusele plasmiidide mõju uurivas teadustöös eraldatud kaheksa faagi ning neist neli nakatasid *P. putida* KT2440 tüve. Faagid eraldati reoveest ja kõik need *P. putida* faagid olid lühikese saba ja väiksema kapsiidiga (nn podoviiruse morfoloogia). [19]

Esimene suurem *P. putida*'t nakatavate bakteriofaagide kollektsioon on Tartu Ülikooli geneetika õppetooli kogu CEPEST (*Collection of Environmental Pseudomonas putida Phages*

from Estonia). Pidevalt täienev bioloogiline kogu koosneb ligi 125 faagiisolaadist, mis kuuluvad 46 faagiliiki ja 23 faagiperekonda (perekondade nimetused on tähistatud G1–G23), praeguseks avaldatud on vaid esimesed 23 faagiliiki üheksast perekonnast. [17] Üleüldisesse taksonoomiasse veel mitte kantud faagid on liigitatud perekondadesse VIRIDIC (*Virus Intergenomic Distance Calculator*) süsteemi alusel, mille kohaselt sarnanevad sama perekonna faagide genoomid enam kui 70% [20]. Kõige rohkem on praegu CEPEST kollektsioonis G2 ja G5 perekonda kuuluvaid faage. Enamik kollektsioonis olevaid faage suudavad baktereid nakatada paremini madalamatel temperatuuridel (optimaalne temperatuur on 20 °C) ja neil on kõrge spetsiifilisus peremeesorganismi suhtes. Kõik CEPEST kollektsiooni bakteriofaagid on dsDNA genoomiga ning ikosaeedrilise kapsiidi ja sabaga. Enamik kollektsioonis olevatest avaldatud faagidest on podoviiruse morfoloogiaga, välja arvatud G1 ja G3 perekonna faagid, mis on morfoloogialt pikema sabaga viirused (endine nimetus *Myoviridae*) ning mille genoom ja kapsiid on oluliselt suuremad kui lühikese sabaga podoviirustel. [17]

2. BAKTERITE FAAGIVASTASED KAITSESÜSTEEMID

Bakteriofaagide virionide arvukus ületab oluliselt bakterirakkude oma, mistõttu on bakteritel pidev evolutsiooniline surve omada ja varieerida erinevaid faagivastaseid kaitsemehhanisme. Ka faagid kasutavad erinevaid meetodeid, et omakorda bakterite kaitsesüsteemide vastu võidelda. [2] Bakterite kaitsesüsteemid on tihti kodeeritud bakterite genoomist väljaspool paiknevatel lühematel DNA molekulidel (plasmiididel) või need süsteemid koonduvad sageli ka mobiilsete DNA piirkondade nn genoomsetele saartele (*genomic island*), mis on bakterigenoomide muutlikud osad [21].

2.1. Faagi adsorptsiooni takistamine

Selleks, et bakteriofaagid saaksid bakterirakku nakatada, peavad need esmalt rakupinnale kinnituma. Faagid interakteeruvad rakupinnal peremehe-spetsiifiliste molekulide ehk retseptoritega, milleks võivad olla pinnavalatud, rakukesta teihhuhapped, välismembraani lipopolüsahhariidid või kapsli struktuursed komponendid. [22] Faagidega nakatumise vältimiseks suudavad bakterid pideva geeniekspressiooni ja retseptorite mitmekesisuse tõttu muuta retseptoreid raku pinna struktuuri modifitseerimise teel [23]. Veel võivad bakterid kaitsta end faagide eest blokeerides oma pinnaretseptoreid. Näiteks saavad bakterid blokeerida oma retseptoreid glükosüülimise abil, mille käigus lisatakse retseptorile glükaane ehk suhkrute molekule. [24] Lisaks glükosüülimisele võivad bakterid toota veel ka faagiga konkureerivaid retseptori inhibiitoreid ehk valke, mis seonduvad retseptoritega ja blokeerivad mehaaniliselt faagide kinnitumist. Need valgud konkureerivad seega faagidega samade seondumiskohtade pärast, takistades bakteriraku nakatumist. [25]

Faagide adsorptsiooni takistamiseks võivad bakterid toota ka rakuvälist maatriksit, mis varjab retseptoreid faagide eest. Selliseks maatriksiks on näiteks eksopolüsahhariidid, mis moodustavad bakterirakke ümbritsevat lima või kapsleid. Kui faagil ei ole polüsahhariide lagundavaid ensüüme, ei pääse see bakteriraku membraaniretseptoritele ligi. [25]

2.2. CRISPR-Cas süsteemid

CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated*) süsteem on bakterite adaptiivne immuunsüsteem. On leitud, et vähemalt 50% bakteritest leidub mõni selline süsteem genoomis. CRISPR-Cas süsteemid võivad bakteripopulatsioonile anda nn geneetilise mälu varasematest infektsioonidest ehk need suudavad säilitada võõr-DNA järjestusi ning integreerida need bakteri genoomi. [23]

CRISPR-Cas süsteem koosneb Cas valkudest ja bakteri genoomis olevatest CRISPR lookustest. Need lookused koosnevad lühikestest kordusjärjestustest, mille vahel on bakterit

varem nakatanud faagi DNA-st välja lõigatud järjestuste segmendid. Viimaste abil saavad bakterid uue infektsiooni korral faagi tuvastada ja tegeleda selle surmamisega. [25]

2.3. Restriksiooni-modifikatsioonisüsteemid

Ühed kõige levinumad kaitsesüsteemid bakterites on restriksiooni-modifikatsioonisüsteemid (RM-süsteemid). Nende geene on leitud ligi 96% bakterite genoomidest. [26] RM-süsteemid on rakuomased immuunsüsteemid, mis koosnevad peamiselt kahest ensüümist: metüültransferaasist ja restriksiooni endonukleasist ehk restriктаasist [24]. RM-süsteemid erinevates bakterites on väga varieeruva valgu- ja geenijärjestusega [26]. Restriктаas tunneb ära spetsiifilised DNA järjestused ehk restriksioonisaadid bakteriraku sisenenud faagi DNA-s ning „lõikab“ järjestuste kohalt ahela katki. Selleks, et bakteriraku enda genoom kahjustada ei saaks, metüleerib metüültransferaas restriksioonisaadid ära, lisades adeniinile või tsütosiinile metüülrühma ($-CH_3$). Klassikalises RM-süsteemis toimub metüülimine tavaliselt palindroomjärjestuses ehk mõlemad DNA ahelad on samas järjestuses modifitseeritud. Selline metüleerimine kaitseb bakteri enda DNA-d endonukleasi lõikuse eest. [23]

Bakterigenoomides on teada nelja tüüpi RM-süsteeme (tüüp I kuni IV). Nende klassifikatsioon põhineb peamiselt RM-süsteemi subühiku koostisel, järjestuse ära tundmisel, lõhustamise asukohal, substraadi spetsiifilisusel ja kofaktori nõudlusel. [25] Kõige levinumad on tüüp I ja tüüp II RM-süsteemid. Tüüp I süsteem koosneb kolme geeni sünteesitud valkkompleksist ja tüüp II süsteem koosneb kahe geeni kodeeritavast kahest erinevast valgust. Tüüp III süsteemi restriктаasid koosnevad kahe geeni kodeeritud valgu alaüksustest ja teostavad DNA äratundmist, restriksiooni või modifikatsiooni. Tüüp IV süsteem erineb teistest selle poolest, et selle restriктаasid on heterogeenne grupp ensüüme, mis koosnevad ühe või kahe geeni poolt kodeeritud valkudest, mis „lõikavad“ ainult faagide modifitseeritud DNA-d. [27, lk 505] Nendest süsteemidest on *P. putida* genoomis seniste analüüside põhjal ennustatud üks tüüp I ja üks tüüp II süsteem, kuid kummagi funktsionaalsust pole veel kinnitatud (A. Ainelo, avaldamata andmed).

2.4. Abortiivse infektsiooni süsteemid

Kui eelnevalt kirjeldatud kaitsesüsteemid ei ole olnud tõhusad, on raku ellujäämise tõenäosus väike, kuid faagi paljunemist rakus võivad oluliselt takistada ka abortiivsed kaitsesüsteemid (Abi süsteemid). Nende aktiveerumise korral läheb rakk apoptoosi ning faagi replikatsioonitsükkel ei saa lõpuni toimuda. Abi süsteemid kaitsevad seeläbi ülejäänud bakterikolooniat või sama liigi populatsiooni, takistades faagide levimist teistesse bakterirakkudesse. [23] Abi süsteeme aktiveerivad näiteks faagi genoomi replikatsiooni vaheproduktid, faagide struktuursed valgud, ulatuslik faagi DNA transkriptsioon või faagi vahendatud peremeesorganismi geeniekspressiooni sulgemine. Kõik Abi süsteemid aga ei

põhjusta rakusurma ning on teada mõned süsteemid, mis peatavad ajutiselt raku kasvu ning võivad olla pöörduvad. [28]

2.5. Toksiin-antitoksiin süsteemid

Toksiin-antitoksiin (TA) süsteemid on geneetilised elemendid, mis on bakterites laialt levinud. TA süsteemid koosnevad toksiini geenist ja sellele vastavat antitoksiini kodeerivast geenist. Kõigi seni teada olevate TA süsteemide toksiinid on valgud ning antitoksiinid on kas valgud või mittekodeeritavad RNA-d. [29] Toksiinid pärsvad raku ainevahetust ja elutegevust, häirides näiteks translatsiooni ja replikatsiooni toimumist, tsütoskeleti moodustumist, membraani terviklikkust või rakuseina biosünteesi [23; 29]. Antitoksiinid aga blokeerivad toksiinide hävitavat toimet. Praegu liigitatakse TA süsteemid kaheksasse erinevasse klassi (I kuni VIII) selle põhjal, kuidas toksiin ja antitoksiin omavahel interakteeruvad ning kuidas antitoksiin toksiini toimet pärsib. [23]

TA süsteeme esineb nii plasmiididel kui ka kromosoomis. Mõlemal juhul pakuvad need süsteemid bakteritele faagide eest kaitset, kuid plasmiididel on nende peamine funktsioon plasmidi stabiilsuse tagamine, samas kui kromosomaalsed TA süsteemid on rohkem spetsialiseerunud faagide ja invasiivsete plasmiidide vastu kaitsmisele. [23] Faagiinfektsiooni või stressitingimuste korral süsteem aktiveerub toksiini kontsentratsiooni suurenemisega, mis tuleneb antitoksiini lagundamisest või toksiini juurde tootmisest. RNA antitoksiinidega toksiine aktiveerib täpsemalt näiteks faagi põhjustatud peremeesorganismi transkriptsiooni väljalülitamine, mistõttu antitoksiini ehk RNA-d enam nii palju ei toodeta. Toksiinid võivad vabaneda ka faagi struktuurvalgu seondumisel toksiin-antitoksiin kompleksiga. Toksiini aktiveerumine põhjustab faagiga nakatunud bakterite surma või nende kasvu pidurdumise, seetõttu võib öelda, et TA süsteemid töötavad Abi süsteemide põhimõttel. Ehkki faagidega nakatunud bakterites on näidatud TA süsteemide aktiveerumist, pole nende roll faagivastaste süsteemidena veel lõplikku kinnitust leidnud. [17]

2.6. Profaagid

Profaag on bakteriraku kromosoomi integreerunud bakteriofaagi genoom. Kuna profaagi säilimine ja bakteriraku heaolu on otseselt seotud, siis on profaagid võimelised bakterirakku kaitsma, et soodustada raku ellu jäämist. [3] Paljud bakterite genoomi integreerunud profaagid ekspresseerivad geene, mis suurendavad peremeesraku paljunemisevõimet või virulentsust ning kaitsevad neid teiste lüütiliste faagide või teiste bakteriliikide konkurentsi eest [8]. Näiteks pärsvad mõned süsteemid uute faagide adsorptsiooni või takistavad nende genoomi süstimist bakterirakku. Profaagid võivad kodeerida ka TA või Abi süsteeme, mis takistavad eksogeensete faagide levikut bakteripopulatsioonis, põhjustades nakatunud raku surma. [17] Paljud neist ekspresseeritud geenidest asuvad enamasti profaagi geneetilistes elementides,

mida nimetatakse „*moron*“iteks. Sellised kaitsesüsteemid võivad erinevate faagide genoomide vahel levida ka horisontaalse geeniülekandega. [30]

P. putida PaW85 tüve genoom sisaldab nelja krüptilist profaagi ehk sellist profaagi, mis genoomist lahkudes nakkuslikke faagipartikleid ei tooda [31]. Tartu Ülikooli geneetika õppetoolis tehtud uurimistööd on näidanud, et need profaagid võivad pakkuda faagidevastast kaitset, kuid nende kaitse tõhusus on erinevate faagiperekondade puhul erinev [17].

2.7. Uued kaitsesüsteemid

Seoses DNA sekveneerimismetoodika kiire arenguga on aina rohkem hakatud uurima bakterigenoomi nii-öelda genoomsetel saartel asuvaid teadmata funktsiooniga geene ning on avastatud mitmeid uusi kaitsesüsteeme, mis ei kuulu eelnevalt tutvustatud klassikaliste kaitsesüsteemide hulka. Uusi kaitsesüsteeme leitakse tavaliselt lookustena, mis asuvad enamasti juba tuntud süsteemide lähedal. [32] Eksperimentaalsed katsed on näidanud, et enamasti kodeerivad need geenid aga siiski erinevaid restriksiooniensüüme [33].

Mõned uued kaitsesüsteemid, mille efektiivsust ka selles töös testitakse, on näiteks restriктаasil põhinev Gabija süsteem ning endonukleasse toimega Wadjet süsteem, mis lagundavad faagi DNA-d [34; 35]. Sarnase toimega on ka RloC nukleas, mis aktiveerub bakteri DNA lagundamise tuvastamisel ja lagundab tRNA-d ning häirib seega raku translatsiooni [36]. Samuti on nukleasse toimega kahest valgust koosnev HerA-DUF süsteem. Kompleks aktiveerub ja on võimeline DNA-d lagundama, kui HerA- Valk seondub DUF-valguga ja põhjustab struktuurimuutusi. [37] Selliseid uusi kaitsesüsteeme on aga üldiselt veel vähe uuritud ning paljude puhul on nende täpne mehhanism veel teadmata.

3. MATERJAL JA METOODIKA

Töös kasutati keskkonnabakteri *P. putida* metsiktüve PaW85 ja erinevaid deletsioontüvesid, mis on välja toodud tabelis 1. Baktereid kasvatati steriilses lüsogeenses söötmes (LB) (koostis: 1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Kasutatud tardsööde sisaldas 1,5% agarit ja faagide lüütilise tsükli indutseerimiseks ka antibiootikumi tsiprofloksatsiin (cip) kontsentratsiooniga 0,03 µg/ml. Kasutatud LB pehmeagar sisaldas 0,3% agarit. Baktereid ja faage kasvatati temperatuuril 20 °C ja faagilahuseid säilitati temperatuuril 4 °C. Faagide hoiustamiseks ja lahjenduste tegemiseks kasutati steriilset SM puhvrit (koostis: 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 ja 0,01% želatiin).

Tabel 1. Töös kasutatud *P. putida* tüved

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide
PaW85 ehk WT	Metsiktüvi, isogeenne tüvega KT2440	[38]
Δ4Φ	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud 4 krüptilist profaagi (P1, P2, P3 ja P4)	[17]
ΔP1	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud profaag P1	[17]
ΔP2	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud profaag P2	[17]
ΔP3	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud profaag P3	[17]
ΔP4	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud profaag P4	[17]
ΔDef2	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud 4 profaagi ja 13 toksiin-antitoksiin süsteemi, Δ13TAΔ4Φ	[17]
ΔDef3	ΔDef2 tüve derivaat, millest on eemaldatud Gabija süsteem	Sirli Rosendahl, avaldamata andmed
ΔDef4	ΔDef3 tüve derivaat, millest on eemaldatud Wadjet süsteem	Sirli Rosendahl, avaldamata andmed
ΔDef5	ΔDef4 tüve derivaat, millest on eemaldatud tüüp I restriksiooni-modifikatsioonisüsteem	Sirli Rosendahl, avaldamata andmed
ΔDef6	ΔDef5 tüve derivaat, millest on eemaldatud HerA-DUF süsteem	Sirli Rosendahl, avaldamata andmed

Δ Def7	Δ Def6 tüve derivaat, millest on eemaldatud tüüp II restriksiooni-modifikatsioonisüsteem	Sirli Rosendahl, avaldamata andmed
Δ Def8	Δ Def7 tüve derivaat, millest on eemaldatud faagikaitsesüsteem PD-T7	Sirli Rosendahl, avaldamata andmed
Δ Def8RloC	Δ Def8 tüve derivaat, millest on eemaldatud RloC geen	Sirli Rosendahl, avaldamata andmed
Δ Def11	Δ Def8RloC tüve derivaat, millest on eemaldatud faagikaitsesüsteemide kandidaadid (<i>Phage Defence Candidate</i>) PDC-S12 ja PDC-S21 süsteemid	Sirli Rosendahl, avaldamata andmed
Δ Gabija	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud Gabija süsteem	Andres Ainelo, avaldamata andmed
Δ Wadjet	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud Wadjet süsteem	Andres Ainelo, avaldamata andmed
Δ RM-I	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud tüüp I restriksiooni-modifikatsioonisüsteem	Rita Hõrak, avaldamata andmed
Δ RM-II	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud tüüp II restriksiooni-modifikatsioonisüsteem	Andres Ainelo, avaldamata andmed
Δ HerA-DUF	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud HerA-DUF süsteem	Andres Ainelo, avaldamata andmed

3.1. Keskkonnaproovis leiduvate faagide rikastamine peremeesbakteriga

Töös eraldati bakteriofaage veeproovidest (Raadi Majoraadi pargi tiigist, 58°24'04.0"N 26°44'50.3"E ja Raadi Majoraadi pargi kraavist, 58°23'59.1"N 26°44'52.3"E), mis koguti 06.10.2024, ning mullaproovist (Mõisatamme 19 kompostihunnikust, 58°24'18.4"N 26°44'02.6"E), mis koguti 18.11.2024. Proove säilitati kuni faagide eraldamiseni temperatuuril 4 °C.

Bakteriofaagide isoleerimiseks rikastati proovides leiduvaid faage peremeesbakteri (*P. putida* PaW85 deletsioontüved Δ Def8 ja Δ Def8RloC, vt tabel 1) kultuuris. Δ Def8RloC tüve kasutati eesmärgiga suurendada tõenäosust isoleerida lisaks G5 perekonna faagidele, mida juba metsiktüvega on isoleeritud, ka teistesse perekondadesse kuuluvaid faage. Kõik kogutud proovid poolitati, et neid mõlema tüvega rikastada. Veeproovide puhul eraldati iga proovi kohta kahte steriilsesse tuubi mõlemasse 40 ml proovist ning mullaproovi puhul tõsteti kahte tuubi mõlemasse 20 ml mulda. Mullaproovide maht viidi milliQ-veega lahjendades 40 ml-ni. Rikastuskultuuri tegemiseks lisati igasse tuubi 2 ml 10x LB vedelsöödet (lõppkontsentratsioon proovis 0,5x LB), profaagide indutseerimiseks 4 µl antibiootikumi tsiprofloksatsiin

(lõppkontsentratsioon 0,01 µg/ml) ning veeproovidele 1 ml eksponentsiaalses kasvufaasis peremeesbakteri kultuuri, mullaproovile 250 µl üleöö kasvanud peremeesbakteri kultuuri. Segusid aereeriti loksutil üleöö.

3.2. Rikastuskultuurist faagide eraldamine

Rikastuskultuuridest faagide eraldamiseks tsentrifuugiti üleöö aereeritud proovidest mullaosakesed ja bakterirakud põhja. Proove tsentrifuugiti täispööretel (5000 rpm) 20 minutit (Hettich Universal 320R tsentrifuugiga). Läbipaistev supernatant filtreeriti seejärel läbi 0,45 µm poorisuurusega süstlafiltriga, et eemaldada lahusest järelejäänud bakterirakud ja mullaosakesed. Filtreerimise tulemusena saadi ligikaudu 10 ml potentsiaalselt faagi sisaldavat filtraati.

Järgmisena valati proovidest kahekihilise agariga tassid. Iga proovi kohta valmistati 8 tassi ehk 4 mõlema bakteritüvega (Δ Def8 ja Δ Def8RloC). Selleks pipeteeriti tuubidesse ühe tassi kohta 25 µl 1 mM CaCl₂ (lõppkontsentratsioon 5 mM) ja 200 µl eksponentsiaalses kasvufaasis (OD₅₈₀ optical density) peremeesbakteri vedelkultuuri. CaCl₂ lisati, sest Ca⁺ ioonid soodustavad bakteriofaagide kinnitumist bakteri pinnale. Kuna faagide kontsentratsioon filtraadis oli veel teadmata, siis lisatava filtraadi kogus oli igas tuubis erinev. See oli vajalik, et ei toimuks lausalist lüüsi ning tassidel oleks hiljem võimalik eristada üksikuid lüüsunud laike. Seega lisati ühte tuubi 100 µl faagidega filtraati, teise 1 ml ning ülejäänud ligikaudu 9 ml jagati võrdselt kahe tuubi vahel. Sellest tulenevalt valati esimesse kahte tuubi mõlemasse veel ka 5 ml 0,3% LB agarsöödet ning suurema filtraadi kogusega tuubidesse valati mõlemasse 1 ml 1,5% LB agarsöödet. Kõik segud segati ning valati kohe tardsöötmetele (sisaldus LB + cip 0,03 µg/ml), sest sööde jahtus ja tardus kiiresti. Tasse inkubeeriti üleöö agar allpool.

Üleöö seisnud tassidel tuvastatud faagilaigud eraldati valikuliselt, eelistades võimalikult erineva morfoloogiaga faagilaike, et saada potentsiaalselt erinevat liiki faage. Faagilaigud eraldati steriilselt tuubidesse, kus neid suspendeeriti 100 µl SM puhvris. Bakterite lüüsimiseks lisati 4 µl kloroformi. Tuubid pandi Biosan Microspin loksutisse 20–30 minutiks.

3.3. Faagide perekondade määramine

Eraldatud faagide perekondade määramiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodit ja geelelektroforeesi. PCR-meetodiga paljundati faagi DNA-d. Proovi lõppmaht oli 20 µl ning see sisaldas 1x PCR puhvrit (10x *DreamTaq Green Buffer*, Thermo Fisher Scientific), 0,2 mM deoksünukleotiid trifosfaatide (dNTP) segu, 10 pmol mõlema DNA ahelaga seonduvat praimerit (praimeripaar; kasutatud praimerid on toodud lisas 1), 1 ühik DreamTaq polümeraasi (Thermo Fisher Scientific) ja milli-Q vett. Igale proovile lisati 1 µl testitavat faagilahust.

PCR-i reaktsioon toimus termotsükleris ning koosnes 25 tsüklist, mis sisaldas järgnevaid etappe:

1. denaturatsioon: 95 °C, 20 sekundit;
2. praimerite seondumine: 58 °C, 45 sekundit;
3. DNA süntees: 72 °C, aeg sõltus amplifitseeritava ala pikkusest (u 30–40 sekundit).

Tsüklile eelnes 5 minuti pikkune eelkuumutus temperatuuril 95 °C ja 25. tsüklile järgnes 5 minuti pikkune lisasüntees temperatuuril 72 °C, et pooleliolevad ahelad saaksid lõpuni sünteesitud.

Faagide perekondade kindlakstegemist alustati enamlevinud perekondade spetsiifiliste praimerite kasutamisega ning lähtuti ka faagilaikude suurusest ja morfoloogiast. Praimereid kasutati seguna ehk korraga testiti vastavust mitme perekonna praimeriga. Töös kasutatud praimerid ja nende segud on välja toodud lisas 1. Iga perekonna testimisel tehti ka kontrollproov varasemalt isoleeritud vastava perekonna faagidega (CEPEST kollektsioon).

PCR-i produkte analüüsiti geelelektroforeesi abil. Geelelektroforeesiks kasutati 2% TAE-agarosgeeli (1x Tris-atsetaat-EDTA puhver, milles lahustati agaros, lõppkontsentratsiooniga 2%, ja lisati etiidiumbromiid). Selleks pipeteeriti proovid 5 µl kaupa geeli süvenditesse ning proove voolutati 1x TAE puhvris 20 minutit pingel 130 V. DNA fragmentide pikkuse hindamiseks, lisati proovide kõrvale ka firma Thermo Scientific DNA markerit *ZipRuler Express DNA Ladder*. Sünteesitud DNA fragmendid visualiseeriti ja pildistati UV-valguses. Kui DNA süntees oli toimunud ja fragmendite pikkused ühtisid kontrollprooviga, siis sellega oli bakteriofaagi perekond määratud. Kui sünteesi ei toimunud, siis korraldati katset uute praimeritega ja võrreldi teise perekonna kontrolliga.

3.4. Faagide puhastamine

Bakteriofaagide säilituskultuuride tegemiseks oli vaja faagiproove puhastada, et vältida võimalikke muid üksikuid faage, mis võisid olla proovidesse sattunud. Selleks viidi iga faagiprooviga läbi kolm puhastuskülvi.

Puhastuskülvide jaoks valmistati kahekihilise ehk topeltagariga tassid. Tasside alumiseks kihiks oli tsiprofloksatsiini sisaldav LB tardsööde ning selle peale valati segu, mis sisaldas 50 µl CaCl₂, 50 µl *P. putida* ΔDef8 tüve üleöö bakterirakke ning kuni 5 ml 0,3% LB agarsöödet. Enne pealmise kihi tardumist kasteti steriilse puutiku ots puhastatava faagiproovi sisse ning tõmmati tikuga läbi agarikihi nii, et oleks võimalik eristada üksikuid faagilaike. Tasse inkubeeriti üleöö temperatuuril 20 °C. Järgmisel päeval eraldati steriilsete 1000 µl pipetiotsikutega igalt tassilt üks eraldiseisev lüüsilaike ning see suspendeeriti 100 µl SM puhvris. Segule lisati

bakterite lüüsimiseks ka 4 µl kloroformi. Segud segati masinaga *Microspin* (20 minutit). Kogu protsessi korraldi iga faagiproovi kohta veel kaks korda.

3.5. Faagitiitri määramine ja faagide paljundamine

Edasisteks katseteks oli vaja faagide kontsentratsiooni suurendada ning selleks oli vaja määrata iga bakteriofaagi sisaldava proovi faagitiiter, et faagide paljundamisel lisada segusse õige kogus faage. Selleks, et faagi maksimaalselt paljundada, oli oluline, et esineks palju lüüsunud faagilaike, kuid laigud oleksid samas ka omavahel eristatavad. Tiitri määramiseks valati „bakterimuru“ nagu kirjeldatud peatükis „Faagide puhastamine“, kuid seekord kasutati eksponentsiaalses faasis Δ Def8 bakterikultuuri, mida lisati 200 µl. Söötmele lasti täielikult tarduda. Faagilahustest tehti kümnekordsete lahjenduste read steriilsesse puhvrisesse. Saadud lahjendused pipeteeriti 1,5 µl kaupa ridadena eelnevalt valatud „bakterimurule“. Tasse inkubeeriti üleöö temperatuuril 20 °C. Järgmisel päeval loeti kokku moodustunud faagilaigud ning arvutati faagilahuse tiiter (infektsiooniliste faagide hulk ühes milliliitris algproovis).

Faagide kontsentratsiooni suurendamiseks tehti lauslöösi tassid. Suurema lõppmahu saamiseks tehti iga faagiisolaadi kohta 3 tassi. „Bakterimuru“ valmistati nagu eelnevalt selles peatükis kirjeldatud, kuid igale segule lisati ka vastavat puhastatud faagilahust, mille kogus optimeeriti tiitri põhjal. Seega suuri laiike põhjustava faagi puhul lisati arvutuslikult 2000 osakest ning väiksemate laikudega faage lisati ligikaudu 50 000 osakest. Tasse inkubeeriti üleöö ning järgmisel päeval kraabiti steriilse külviasaga kokku faage sisaldavad pealmised agarikihid, mis koguti tuubidesse, kuhu lisati ka 2 ml SM puhvrit ja 300 µl kloroformi. Tuube loksutati 15 minutit Biosan Microspini masinal, et teha agaritükid väiksemateks tükkideks ning seejärel tsentrifuugiti segusid 15 minutit 5000 rpm (tsentrifuugiga Hettich Universal 320R). Tsentrifuugimisel sadestus agar tuubi põhja. Supernatant filtreeriti läbi 0,22 µm poorisuurusega süstlafiltri. Filtreerimise käigus eemaldati lahusesse jäänud bakterirakud ja agari jäägid ning saadi puhas faagi sisaldav lahus, mida hoiustati steriilses Eppendorfi tuubis. Saadud lahusest määrati taas faagitiiter.

3.6. Olemasolevate kaitsesüsteemide võrdlemine tilkkülvi meetodil

Selleks, et teha kindlaks, millised kaitsesüsteemid kaitsevad bakterit *P. putida* selle töö käigus keskkonnast eraldatud bakteriofaagide vastu, valati „bakterimuruga“ tassid (kirjeldatud peatükis „Faagide puhastamine“) ning kasutati tilkkülvi meetodit, et võrrelda faagide nakatamisvõimet tiitrite põhjal. Seekord kasutati peremeesbakterina erinevaid *P. putida* PaW85 derivaattüvesid, millest olid eemaldatud kindlad kaitsesüsteemid (tabel 1). Valatud bakterimurule pipeteeriti faagilahustest tehtud kümnekordsete lahjenduste read 1,5 µl kaupa. Faagilahuseid lahjendati SM puhvril mikrotiiterplaadil ning lahjendusi tehti vahemikus 1×10^{-1} kuni 1×10^{-6} või 10^{-7} . Järgmisel päeval uuriti visuaalselt tekkinud lüüsilaikude arvu ja suurust, loeti laigud kokku ning arvutati nende põhjal tiitrid (faagipartiklit/ml). Lüüsilaike loeti vähimast

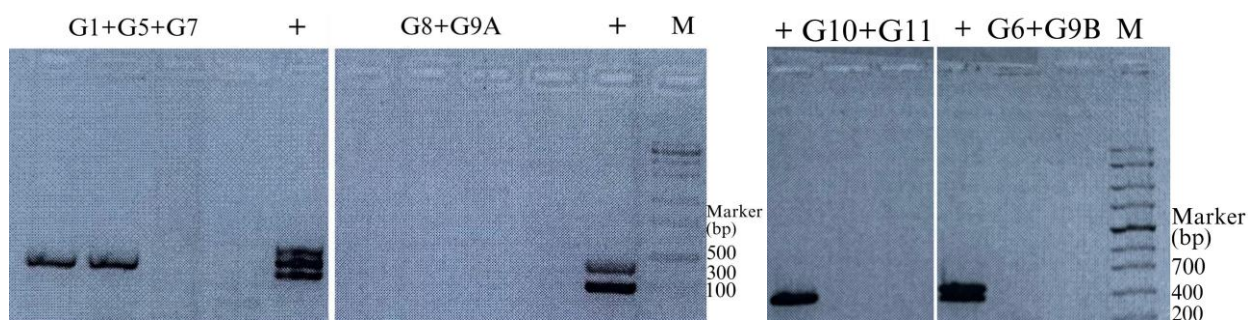
lahjendusest, milles oli võimalik üksiklaikude piire eristada. Visuaalsete vaatluste ja arvutatud tiitrite põhjal sai võrrelda erinevate bakteritüvede nakatumist kõigi faagide korral. Bakteritüvede nakatumist võrreldi metsiktüve (PaW85) suhtes, millelt ei olnud eemaldatud ühtegi potentsiaalset kaitsesüsteemi. Kui faagi nakatamisvõime suurenes mingi bakteritüve kasutamisel, siis järeldati, et faagi vastu kaitseb tüvest eemaldatud kaitsesüsteem. Vaatlusandmetest koostati kokkuvõtlikud tabelid.

4. TULEMUSED JA ARUTELU

Tulemuste analüüsil võrreldi omavahel peamiselt sama päeva katsete tulemusi, sest korduskatsetel saadud tulemused võisid mõnevõrra erineda. Kaitsesüsteemide mõju hindamiseks kasutati soojuskaardi formaadis tabelleid ning võrdlemisel arvestati nii arvutatud faagitiitrit kui ka nakatuvuse ulatust lahjendusridades. Tulemuste esitamisel kasutati lühendatud nimetusi: Raadi Majoraadi pargi tiigi faage nimetati Raadi faagideks ja aia kompostmullast pärinevaid faage aia faagideks.

4.1. Keskkonnaproovidest eraldatud faagid

Töö käigus kasutati kokku kolme keskkonnaproovi: Raadi Majoraadi pargi tiigist ja Raadi Majoraadi pargi kraavist võetud veeproove ja töö autori koduaia kompostikasti mullaproovi. Raadi tiigist võetud proovist eraldati Δ Def8 ja Δ Def8RloC bakteritüvedega tassidelt mõlemalt 2 faagilaiku. Δ Def8 tüvega tassidel oli faagilaike kordades rohkem ning laigud olid selgemad ja suurema läbimõõduga kui Δ Def8RloC tüvega tassidel ehk suuruselt vastavalt ligikaudu 2 mm ja 1 mm. PCR-testi tulemuste kohaselt kuulusid Δ Def8 tüvega tassidelt eraldatud faagid G5 perekonda, kuid Δ Def8RloC tüvega tassidelt eraldatud faagid ühelgi PCR-testil tulemust ei andnud (joonis 2). Edasisel puhastamisel ei tekkinud nendega ka tassidele faagilaike.

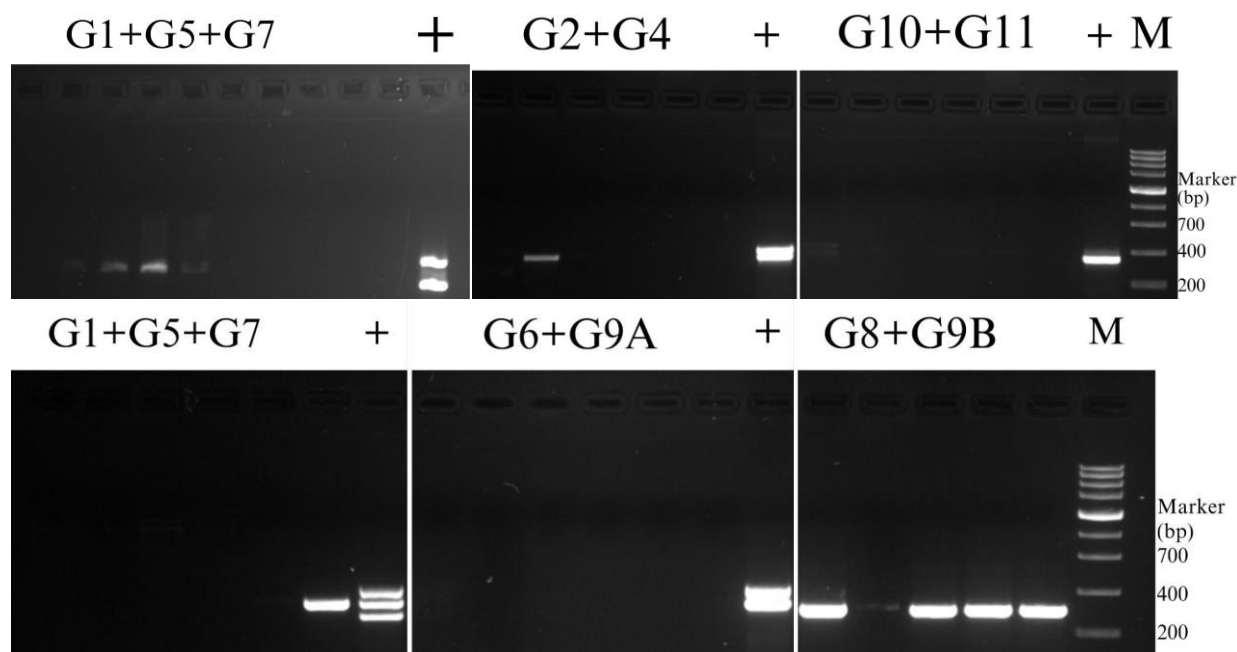


Joonis 2. Raadi tiigi faagide määramise PCR-i tulemused. G1, G5, G7, G8 ja G9A perekonna praimeritega testiti kõiki nelja laiku ning Δ Def8RloC tüvega tasside faage testiti ka G6, G9B, G10 ja G11 perekonna praimeritega. Tähisega + on tähistatud positiivne kontrollproov ja tähisega M marker. Markeris sisalduvate DNA lõikude pikkused (*base pairs*, bp, ehk aluspaari) on näidatud joonisel

Raadi Majoraadi pargi kraavist võetud veeproovist ei tekkinud tassidele ühtegi faagilaiku ning faage isoleerida ei suudetud.

Kompostikasti mullaproovist eraldatud faagid tekitasid laike mõlema bakteritüve puhul, mistõttu eraldati mõlema tüve kohta 5 laiku. Eraldatud laigud valiti eri suuruse, kuju ja hägususega. Ühel tassil esines ka ligi 5 mm läbimõõduga teistest tunduvalt suurem faagilaik.

Kõigist eraldatud faagilaikudest kuulus PCR-testi tulemusena üks kõige suurem G2 perekonda, neli G8 perekonda ja viis väiksemat G5 perekonda (joonis 3).



Joonis 3. Kompostmulla faagide määramise PCR-i tulemused. Kõiki laike testiti G1, G5 ja G7 perekonna praimeritega (üleval vasakul) ning selle käigus tuvastamata jäänud laike testiti ka G2, G4, G10, G11, G6, G9A, G8 ja G9B praimeritega ning veel kord nende samade praimeritega. Tähistega + on tähistatud positiivne kontrollproov ja tähistega M marker. Markeris sisalduvate DNA lõikude pikkused (*base pairs*, bp, ehk aluspaari) on näidatud joonisel

Faagide nakatamisvõime ja kontsentratsioon oli üldiselt suurem Δ Def8 bakteritüve puhul, mistõttu kasutati seda tüve ka edasistes puhastuskülvides ja tiitrite määramisel. Kaitsesüsteemide tõhususe ja varieeruvuse võrdlemiseks valiti igast faagiperekonnast üks faagiisolaat ning G5 perekonna faagidest valiti üks Raadi tiigi ja üks kompostmulla isolaat eeldusel, et need võivad olla eri liigist.

4.2. Eraldatud faagide vastu bakterit kaitsevad kaitsesüsteemid

Selleks, et saada ülevaadet, millised kaitsesüsteemid bakterit *P. putida* töö käigus eraldatud faagide vastu potentsiaalselt kaitsevad, testiti faagide nakatamisvõimet kõigi olemasolevate *P. putida* metsiktüvest konstrueeritud defektsete tüvedega (vt lisa 2). Bakteritüvedel, mille puhul nakatuvus suurenes metsiktüvega võrreldes mitmekümne astme kordselt (tabel 2), eeldati olevat eemaldatud kaitset pakkuv süsteem. Erinevusi faagide nakatamisvõimes tuvastati peamiselt Δ 4 Φ , Δ Def3, Δ Def5 ja Δ Def6 bakteritüvede korral. Δ Def6 bakteritüvest alates ühegi faagi nakatamisvõime ei suurenenud. Kumulatiivsetes testides erinevuste tuvastamisel testiti edaspidi faagide nakatamisvõimet *P. putida* tüvedega, millest olid eemaldatud vaid üksikud kaitsesüsteemid.

Tabel 2. Erinevatest perekondadest bakteriofaagide suurim kümnendlahjendus, millega oli erinevate derivaattüvede korral võimalik laike tuvastada

Faag	WT	$\Delta 4\Phi$	$\Delta Def2$	$\Delta Def3$	$\Delta Def4$	$\Delta Def5$	$\Delta Def6$	$\Delta Def7$	$\Delta Def8$	$\Delta Def1$ 1
Aia G5	-3	-5	-5	-6	-6	-6	-7	-7	-7	-7
Aia G8	-5	-6	-6	-6	-7	-7	-7	-7	-7	-7
Aia G2	-6	-6	-6	-6	-6	-7	-7	-7	-7	-7
Raadi G5	-2	-4	-4	-4	-5	-6	-7	-7	-7	-7

4.2.1. G5 perekonna faage mõjutavad kaitsesüsteemid

Mõlema G5 perekonna faagi ehk nii aia kompostmulla kui ka Raadi tiigi G5 perekonna faagi nakatamisvõime suurenes märgatavalt kui *P. putida* bakteritüvest oli eemaldatud neli krüptilist profaagi (tabel 3). Aia G5 faagi nakatamisvõime suurenes metsiktüvega võrreldes 10000-kordselt ning Raadi G5 faagi nakatamisvõime 100-kordselt. Üksikult eraldatud profaagidega testides suurenes mõlema faagi nakatamisvõime peamiselt ilma P1 profaagita bakteritüve korral. See suurenes mõlemal metsiktüve suhtes 100-kordselt. Aia G5 faagi nakatamisvõime suurenes ka profaag P2 eemaldamisel 100-kordselt, kuid $\Delta P1$ tüvega võrreldes olid laigud väiksemad, hägusemad ning neid oli vähem, mistõttu oli ka faagitiiter peaaegu 10 korda väiksem. Tulemused näitavad, et aia G5 faagi vastu kaitsevad seega profaagid P1 ja veidi vähem ka P2 ning Raadi G5 faagi vastu peamiselt vaid profaag P1 (tabel 3). Olenemata asjaolust, et mõlemad faagid on samast perekonnast, mõjutavad profaagid aia G5 faagiisolaadi toimet tunduvalt rohkem kui Raadi G5 faagi puhul.

Tabel 3. G5 perekonna faagide suurimad kümnendlahjendused, millega eemaldatud profaagidega bakteritüvede korral oli võimalik lüüsilaike tuvastada

Faag	WT	$\Delta 4\Phi$	$\Delta P1$	$\Delta P2$	$\Delta P3$	$\Delta P4$
Aia G5	-1	-5	-3	-3	0	0
Raadi G5	-1	-3	-3	-1	-1	0

Kõigis tehtud katsetes suurenes mõlema G5 perekonna faagi nakatamisvõime metsiktüve suhtes 1000-kordselt ka $\Delta Def3$ või $\Delta Def4$ bakteritüve korral (tabel 2). Katsetes, kus kasutatud *P. putida* tüvest oli eemaldatud üksikult vaid Wadjet süsteem või Gabija süsteem, suurenes aga nakatamisvõime vaid aia G5 faagi korral (tabel 4). Wadjet süsteemi eemaldamisel suurenes aia G5 faagi nakatamisvõime metsiktüve suhtes 10-kordselt. Gabija kaitsesüsteemi eemaldamine ei suurendanud ühelgi korral kummagi faagi nakatamisvõimet. Kui aia G5 faagi vastu kaitseb ka Wadjet süsteem, siis tulemused viitavad, et Raadi G5 faagi vastu Wadjet ega Gabija süsteem eraldi kaitset ei paku, kuid võivad toimida koosmõjuna (tabel 4).

Tabel 4. G5 perekonna faagide suurimad kümnendlahjendused, millega WT, Δ Wadjet või Δ Gabija bakteritüvede korral oli võimalik faagilaike tuvastada

Faag	WT	Δ Wadjet	Δ Gabija
Aia G5	-2	-3	-2
Raadi G5	-2	-2	-2

Erinevalt aia G5 faagiisolaadist, suurenes igas katses Raadi G5 faagi nakatamisvõime Δ Def5 bakteritüve korral Δ Def4 tüvega võrreldes vähemalt 10-kordselt (tabel 2). Testides faagide nakatamisvõimet bakteritüve korral, millest oli eemaldatud ainult tüüp I restriksiooni-modifikatsioonisüsteem, suurenesid Raadi G5 faagi tiiter ja nakatamisvõime metsiktüve suhtes samuti 10-kordselt (tabel 5). Vaatamata sellele, et mõlemad faagid on samast perekonnast, mõjutab tüüp I restriksiooni-modifikatsioonisüsteemi olemasolu vaid Raadi G5 faagi nakatamisvõimet.

Tabel 5. G5 perekonna faagide suurimad kümnendlahjendused, mille WT ja Δ RMI tüvede korral oli võimalik laiike tuvastada

Faag	WT	Δ RMI
Aia G5	-1	-1
Raadi G5	-1	-2

Nii aia G5 faagi kui ka Raadi G5 faagi nakatamisvõime suurenes Δ Def6 bakteritüve korral Δ Def5 tüve suhtes 10-kordselt (tabel 2). Katsetades faagide nakatamisvõimet bakteritüve korral, millest oli eemaldatud ainult HerA-DUF süsteem, suurenes tunduvalt mõlema faagi laikude arv tassidel (tabel 6). HerA-DUF süsteemi eemaldamine suurendas aia G5 faagi nakatamisvõimet ligi 100-kordselt ning Raadi G5 nakatamisvõimet ligi 10-kordselt. Aia G5 faagi puhul muutis kaitsesüsteemi eemaldamine lüüsilaiigud ka läbipaistvamaks. Tulemused viitavad, et HerA-DUF süsteem mõjutab mõlema G5 faagi nakatamisvõimet, kuid aia G5 faagi nakatamisvõimet rohkem kui Raadi G5 faagil (tabel 6).

Tabel 6. G5 perekonna faagide suurimad kümnendlahjendused, millega WT ja Δ HerA-DUF tüvede korral oli võimalik faagilaike tuvastada

Faag	WT	Δ HerA-DUF
Aia G5	-2	-4
Raadi G5	-2	-3

4.2.2. G8 perekonna faagi mõjutavad kaitsesüsteemid

Ainuke bakteritüvi, mille korral aia kompostmulla G8 perekonna faagi nakatamisvõime kõigis katsetes märgatavalt suurenes, oli Δ 4 Φ deletsioontüvi. Selle tüve korral suurenes nakatavus 10-kordselt. Ühegi tüvega, kust oli eemaldatud ainult üks neljast krüptilisest profaagist,

faagilaikude arv ja faagi nakatamisvõime aga ei suurenenud (tabel 7). Üksikuid väikeseid laiike esines $\Delta P1$ ja $\Delta P2$ tüvega tassidel sarnaselt $\Delta 4\Phi$ tüvega ka 10^{-6} lahjenduses, kuid laikude vähesuse tõttu jäi tiiter võrdlemisi samaks ning üksikult profaagid seega G8 perekonna faagile suuremat mõju ei avaldanud.

Tabel 7. G8 perekonna faagide suurimad kümnendlahjendused, millega eemaldatud profaagidega bakteritüvede korral oli võimalik laiike tuvastada

Faag	WT	$\Delta 4\Phi$	$\Delta P1$	$\Delta P2$	$\Delta P3$	$\Delta P4$
Aia G8	-5	-6	-6	-6	-5	-5

4.2.3. G2 perekonna faagi mõjutavad kaitsesüsteemid

Kompostmulla G2 perekonna faagilaigud olid teiste faagidega võrreldes oluliselt suuremad, läbimõõdult ligikaudu 4–5 mm, mistõttu laiike eristada ning muutusi lüüsilaiikude arvus tuvastada oli keerulisem. Üldiselt püsis G2 perekonna faagide nakatamisvõime metsiktüvega võrreldes konstantne või derivaattüvede puhul oli ühtlaselt suurenev. Ainuke märgatav erinevus oli $\Delta Def5$ tüve korral, sest $\Delta Def4$ bakteritüvega võrreldes suurenes faagilaikude arv ligi 10-kordselt (tabel 2). Kui bakteritüvest oli eemaldatud ainult restriksiooni-modifikatsioonisüsteem I, suurenes faagide nakatamisvõime metsiktüve suhtes samuti ligi 10-kordselt (tabel 8), mistõttu järeldub, et selle G2 faagi vastu kaitseb *P. putida* bakterit vähesel määral tüüp I restriksiooni-modifikatsioonisüsteem.

Tabel 8. G2 perekonna faagide suurimad kümnendlahjendused, millega metsiktüve ja $\Delta RM-I$ tüve korral oli võimalik laiike tuvastada

Faag	WT	$\Delta RM-I$
Aia G2	-5	-6

4.3. Arutelu

Töö käigus suudeti aia kompostmullast eraldada G2, G5 ja G8 perekonna faage ning Raadi tiigi veeproovist G5 perekonna faage. G5 ja G2 perekonna faagide esinemine oli oodatav, sest ka varasemates isolatsioonikatsetes on need perekonnad olnud enim esindatud. Näiteks CEPEST kollektsioonis on just G5 perekonna faagide osakaal suurim ning G2 perekonna faagide osakaal arvult teine [17]. G8 perekonna faagid on aga CEPEST kollektsioonis siiani kõige haruldasemad, sest varem on neid eraldatud vaid ühel korral [39]. Lisaks asjaolule, et G5 ja G2 perekonna bakteriofaagid on keskkonnas levinud *P. putida* faagide rühmad [17], võib eraldatud faagide profiil tuleneda ka sellest, et eraldusmeetodid ja tingimused olid just nende perekondade faagide jaoks sobivamad. Samuti võisid ka kasutatud bakteritüved soosida nimetatud bakteriofaagide eraldamist. Seega tegelikult võib keskkonnas ja ka selles töös võetud proovides leiduda veel erinevaid faage, mis ei tekita isolatsioonitassidel märgatavaid lüüsilaiike, sest nende vastu kaitsevad mehhanismid on veel avastamata ning eraldamiseks sobilikke bakteritüvesid pole seetõttu veel loodud.

Tilkkülvikatsete tulemustest ilmneb, et kuigi kõik eraldatud faagid nakatavad sama *P. putida* tüve, on bakteril iga faagi vastu võitlemiseks erinevad kaitsesüsteemid. Selgus, et isegi samasse perekonda kuuluvate faagide vastu, mille genoom on vähemalt 70% ulatuses identne [20], on bakteril erinevad kaitsemehhanismid. Näiteks mõlema isoleeritud G5 perekonna faagi vastu kaitsesid bakterit *P. putida* genoomis olevad krüptilised profaagid ning HerA-DUF süsteem, kuid nende mõju oli aia kompostmullast pärinevale G5 faagiisolaadile suurem, sest Raadi G5 faagiisolaadi nakatamisvõimet mõjutas peamiselt restriksiooni-modifikatsioonisüsteem I. Ka kaitset tagavate profaagide mõjud olid faagide puhul mõnevõrra erinevad, sest aia G5 faagi vastu kaitsesid nii P1 kui ka P2 profaag, samas kui Raadi G5 faagi vastu kaitses bakterit peamiselt ainult P1 profaag. Varem tehtud katsetest on seni järeldunud, et G5 perekonna faage mõjutavad tihti just profaagid [17], mistõttu RM-I süsteemi kaitse Raadi G5 faagi vastu on märkimisväärne. Kuna RM-süsteemide aktiivsust *P. putida* faagikaitses ei ole varasemates töödes tõestatud, siis kinnitab see ka, et tüüp I RM-süsteem on sellel bakteril aktiivne ja funktsioneerib faagikaitsesüsteemina. Lisaks mainitud süsteemidele kaitses aia G5 faagi vastu ka Wadjet süsteem, mis Raadi G5 faagile mõju ei avaldanud ning ka varasemates katsetes ei ole G5 faagide nakatamisvõimet mõjutanud. Antud töö põhjal aga Wadjet süsteemi täpsemat mõju G5 perekonna faagidele hinnata ei saa ning pigem järeldubki, et bakterite kaitsemehhanismid võivad olla väga faagispetsiifilised ning varieeruda isegi geneetiliselt sarnaste faagide puhul. Need erinevused viitavad ka tõenäosusele, et töös isoleeritud G5 perekonna faagid kuuluvad erinevatesse liikidesse.

G8 perekonna faag erines samuti oluliselt teistest faagidest, sest selle nakatamisvõime suurenes ainult profaagide eemaldamisel bakteritüvest. Profaagide võime kaitsta bakterit *P. putida* selle G8 perekonna faagi vastu, on kooskõlas ka varasemalt tehtud katsetega, milles on tuvastatud, et profaagid kaitsevad näiteks ka CEPEST kollektisioonis oleva G8 faagiisolaadi vastu [17]. Erinevalt G5 perekonna faagidest ei suurenenud aga G8 perekonna faagi nakatamisvõime, kui bakteritüvest oli eemaldatud ainult mõni üksik profaag. Tehtud katsete tulemused näitavad, et selle faagi vastu võivad profaagid kaitsta pigem koosmõjuna. Faagivastaste kaitsesüsteemide koosmõju uurimiseks on varem tehtud mitu katset ning on tuvastatud, et mõned faagiliigid aktiveerivad bakteris mitmete kaitsesüsteemide sünergilise kaitse. Samas uuringus selgus ka, et bakteripopulatsioonid, mis selliseid sünergilisi süsteeme omasid, saavutasid evolutsioonilise eelise ja tugevama kaitse kui üksikuid kaitsesüsteeme omavad bakterid. [40] Seega on võimalik, et ka *P. putida* genoomis olevad profaagid toimivad aia G8 faagi vastu sünergiliselt.

G2 perekonna faagiisolaat erines teistest uuritud faagidest selle poolest, et erinevad kaitsesüsteemid või nende puudumine selle nakatamisvõimet oluliselt ei mõjutanud. Varem on tuvastatud, et G2 perekonna faagid on teiste faagidega võrreldes võimelised erinevaid bakteritüvesid ja -liike paremini nakatama [17]. See võibki tuleneda sellest, et G2 perekonna

faagide vastu pole bakteritel nii palju toimivaid kaitsesüsteeme. Näiteks, kui teiste faagide nakatamisvõime suurenes profaagide-vabas tüves, siis G2 perekonna faagile see mõju ei avaldanud. Sarnast sõltumatust profaagidest on täheldatud ka varasemates katsetes teiste sama perekonna CEPEST kollektsiooni faagidega [17]. Kuigi tüüp I RM-süsteem osales G2 faagi vastu kaitsmisel, oli selle mõju suhteliselt nõrk ja ei olnud korratav igal katsel (oli tuvastatav kahel katsel kolmest), mistõttu vajab selle kaitsesüsteemi roll G2 perekonna faagide kaitses edasist uurimist.

KOKKUVÕTE

Pseudomonas putida on biotehnoloogiliselt oluline bakter, sest seda kasutatakse tööstuses erinevate kemikaalide tootmiseks ja saasteainete lagundamiseks. Selleks, et vältida bakteriofaagide rünnakut ja suurendada tööstusprotsesside tõhusust, on vaja teada, millised kaitsesüsteemid kaitsevad kõige tõhusamalt erinevate baktereid lüüsvate viiruste ehk bakteriofaagide vastu. Seetõttu oli töö eesmärk isoleerida keskkonnast *P. putida*'t nakatavaid faage ja tuvastada seda bakterit kaitsvate kaitsemehhanismide tõhusus. Eesmärgi saavutamiseks isoleeriti käesolevas töös *P. putida*'t nakatavaid bakteriofaage Raadi Majoraadi pargi tiigi veeproovist ja aia kompostihunniku mullaproovist, kasutades bakteri PaW85 deletsioontüvesid Δ Def8 ja Δ Def8RloC. Isoleeritud faagide perekondade määramiseks kasutati PCR-analüüsi ja geelelektroforeesi ning kaitsesüsteemide mõju hindamiseks võrreldi faagide võimet nakatada erinevaid derivaattüvesid, millest olid eemaldatud kindlad kaitsesüsteemid. Töös isoleeriti faagid G2, G5 ja G8 perekondadest. Kompostmullast saadi suurema perekondliku mitmekesisusega faagide kogum võrreldes tiigiveega, millest eraldati vaid G5 faage.

Tulemuste põhjal selgus, et *P. putida* kaitsesüsteemid mõjusid kõigile eraldatud faagiisolaatidele erineva efektiivsusega. Nagu varasemad CEPEST kollektsooni faagidega tehtud uuringud on näidanud, kaitsesid bakterigenoomis olevad profaagid oluliselt ka antud töös isoleeritud faagide vastu. P1 profaag kaitses mõlema G5 perekonna faagi vastu, samas kui P2 profaag mõjutas ainult aia G5 faagi nakatamisvõimet. Profaagid mõjutasid üldiselt tugevamalt aia G5 faagi. Tulemused viitavad, et G8 perekonna faagi vastu kaitsevad profaagid bakterit sünergiliselt ning üksikult olulist mõju ei avalda. Lisaks mõjutasid faagide nakatamisvõimet märgatavalt ka HerA-DUF kaitsesüsteem ning tüüp I RM-süsteem. HerA-DUF süsteem kaitses mõlema isoleeritud G5 faagi vastu, kuid süsteem oli aia G5 faagi korral tõhusam, sest Raadi G5 faagi vastu kaitses peamiselt RM-I süsteem. RM-I süsteemi aktiivsust *P. putida* faagikaitsesüsteemina pole varasemalt täheldatud, mistõttu oli tulemus märkimisväärne. Aia G2 faagiisolaati erinevad kaitsesüsteemid eriti ei mõjutanud, ainult RM-I süsteemi eemaldamise korral oli faagi nakatamisvõime veidi suurem, kuid kindlate järelduste tegemiseks on vaja enam korduvaid katsetulemusi. Samuti kaitses *P. putida*'t aia G5 faagiisolaadi vastu Wadjet süsteem, mille mõju teiste G5 faagide korral varem täheldatud pole.

Tööst järeldub, et bakteri *P. putida* kaitsesüsteemid on väga faagispetsiifilised ja nende tõhusus erineb isegi geneetiliselt sarnaste ja samasse perekonda kuuluvate faagide korral. Edasistes uuringutes saaks veel keskenduda näiteks tüüp I RM-süsteemi ja Wadjet süsteemi täpsema rolli ja toimemehhanismide uurimisele, et paremini mõista nende tähtsust *P. putida* faagikaitses.

Märksõnad: bakteriofaag, mikrobioloogia, *Pseudomonas putida*, kaitsekohastumused

SUMMARY

Hugo Treffner Gymnasium

Marion Lisette Kasela

Supervisors Hedvig Tamman (University of Tartu) and Angela Peeb

Isolation of bacteriophages from environmental samples and investigation of phage defence systems in *Pseudomonas putida*

Research Paper

2025

Pseudomonas putida is an industrially important bacterium, which is used for the production of various chemicals and the degradation of pollutants. Therefore, it is necessary to understand which defence systems most effectively protect against different cell-lysing bacteriophages in order to prevent bacteriophage infections and to improve the efficiency of industrial processes. The aim of this study was to isolate phages infecting *P. putida* strain PaW85 from environmental samples and to determine the effectiveness of the bacterium's defence mechanisms. To achieve this, bacteriophages infecting *P. putida* were isolated from a pond water sample collected at Raadi Manor Park and from a compost soil sample collected from a garden in Tartu, using *P. putida* PaW85 derivative strains Δ Def8 and Δ Def8RloC. Phage genera were identified through PCR analysis and gel electrophoresis, and the effect of defence systems was evaluated by comparing the infection efficiency of phages in bacterial strains lacking potential specific defence systems. The isolated phages belonged to the G2, G5 and G8 genera and the compost sample had a higher diversity of phage genera compared to the pond sample, from which only phage isolates belonging to the G5 genus could be isolated.

The results demonstrated that *P. putida* defence systems varied significantly in their effectiveness against different phages. As previous studies with CEPEST (Collection of Environmental *Pseudomonas putida* Phages from Estonia) phages have shown, prophages located in the genome of the bacterium also provided significant protection against the phages isolated in this study. The P1 prophage protected against both of the isolated G5 phages, whereas the P2 prophage only affected the infection efficiency of the compost-derived G5 phage isolate, with prophages overall having a greater impact on the compost G5 phage. The findings suggest that prophages provide synergistic protection against the G8 phage, as single prophages were not sufficient to protect against infection and lysis on their own. In addition, the HerA-DUF defence system and the type I restriction-modification system also significantly influenced phage infection. The HerA-DUF system protected against both G5 phages, although it provided better protection against the compost G5 phage, while the Raadi G5 phage was primarily protected by the type I RM system. This finding is notable because the activity

of the RM-I system in *P. putida*'s phage defence has not been observed before. All these different defence systems had only a minor effect on the compost-derived G2 phage, with only the removal of the RM-I system causing a slight increase in phage infectivity. Even so, the changes were too minor and sometimes inconsistent to draw firm conclusions. In addition, the Wadjet system also contributed to the defence against the compost-originated G5 phage, although its role in defence had not been previously described for other G5 phages.

This study concludes that the defence systems of *P. putida* are highly phage-specific, with their effectiveness differing even among genetically similar phages from the same genus. Future research could focus on investigating the precise role and mechanisms of the type I RM system and the Wadjet system to better understand their importance in *P. putida*'s phage resistance.

Keywords: bacteriophage, microbiology, *Pseudomonas putida*, defence adaptations

KASUTATUD ALLIKAD

- [1] Naureen, Z., Dautaj, A., Anpilogov, K., Camilleri, G., Dhuli, K., Tanzi, B., Maltese, P. E., Cristofoli, F., De Antoni, L., Beccari, T., Dundar, M., Bertelli, M. 2020. Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta bio-medica: Atenei Parmensis*, 91(13), e2020024. Kättesaadav: <https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-S.10819>.
- [2] Hampton, H. G., Watson, B. N., Fineran, P. C. 2020. The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, 577(7790), 327–336. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>.
- [3] Cumby, N., Davidson, A. R., Maxwell, K. L. 2012. The moron comes of age. *Bacteriophage*, 2(4), e23146. Kättesaadav: <https://doi.org/10.4161/bact.23146>.
- [4] Puchałka, J., Oberhardt, M. A., Godinho, M., Bielecka, A., Regenhardt, D., Timmis, K. N., Papin, J. A., Martins dos Santos, V. A. P. 2008. Genome-Scale Reconstruction and Analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 Metabolic Network Facilitates Applications in Biotechnology. *PLOS Computational Biology*, 4(10), e1000210. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000210>.
- [5] Loeschcke, A., Thies, S. 2015. *Pseudomonas putida* - a versatile host for the production of natural products. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(15), 6197–6214. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6745-4>.
- [6] Keen, E. C. 2015. A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 37(1), 6–9. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1002/bies.201400152>.
- [7] Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., Heaphy, S. 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. Kättesaadav: <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>.
- [8] Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T. F., Stanton, C. R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G. R., Sobey, C. G., Chan, H. T., Seviour, R. J., Petrovski, S., Franks, A. E. 2019. Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(3), 100. Kättesaadav: <https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>.
- [9] Zinke, M., Schröder, G. F., Lange, A. 2022. Major tail proteins of bacteriophages of the order *Caudovirales*. *The Journal of biological chemistry*, 298(1). Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101472>.
- [10] Kasman, L. M., Porter, L. D. 2022. Bacteriophages. StatPearls. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/> (23.11.2024).
- [11] Suttle, C. A. 1994. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbial ecology*, 28, 237–243. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1007/BF00166813>.
- [12] Vančura, V. 1989. Inoculation of plants with *Pseudomonas putida*. *Developments in soil science*, 18, 185–190. Kättesaadav: [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70213-7](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70213-7).
- [13] Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D. C., Nikel, P. I., Wittmann, C. 2020. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 7745–7766. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9>.
- [14] Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., van der Lelie, D. 2011. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS microbiology reviews*, 35(2), 299–323. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00249.x>.
- [15] Nelson, K. E., Weinl, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Lee, P. C., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T.,

- Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J., Timmis, K. N., Düsterhöft, A., Tümmeler, B. and Fraser, C. M. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 4(12), 799–808. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>.
- [16] Rosendahl, S., Tamman, H., Brauer, A., Remm, M., Hörak, R. 2020. Chromosomal toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas putida* are rather selfish than beneficial. *Scientific Reports*, 10, 9230. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65504-0>.
- [17] Brauer, A., Rosendahl, S., Kängsep, A., Lewańczyk, A. C., Rikberg, R., Hörak, R., Tamman, H. 2024. Isolation and characterization of a phage collection against *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology*, 26(6), e16671. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16671>.
- [18] Jaryenneh, J., Schoeniger, J. S., Mageeney, C. M. 2023. Genome sequence and characterization of a novel *Pseudomonas putida* phage, MiCath. *Scientific Reports*, 13(1), 21834. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48634-z>.
- [19] Ngiam, L., Weynberg, K. D., Guo, J. 2022. The presence of plasmids in bacterial hosts alters phage isolation and infectivity. *ISME communications*, 2(1), 75. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00158-9>.
- [20] Moraru, C., Varsani, A., Kropinski, A. M. 2020. VIRIDIC—A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. *Viruses*, 12(11), 1268. Kättesaadav: <https://doi.org/10.3390/v12111268>.
- [21] Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Snir, S., Koonin, E. V. 2011. Defense Islands in Bacterial and Archaeal Genomes and Prediction of Novel Defense Systems. *Journal of Bacteriology*, 193(21). Kättesaadav: <https://doi.org/10.1128/jb.05535-11>.
- [22] Hyman, P. (2013). Phage Receptor. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 277-279. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01141-4>.
- [23] Wang, X., Leptihn, S. 2024. Defense and anti-defense mechanisms of bacteria and bacteriophages. *Journal of Zhejiang University Science B*, 25(3), 181–196. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1631/jzus.B2300101>.
- [24] Dimitriu, T., Szczelkun, M. D., Westra, E. R. 2020. Evolutionary ecology and interplay of prokaryotic innate and adaptive immune systems. *Current Biology*, 30(19), 1189–1202. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.028>.
- [25] Orzechowska, B., Mohammed, M. 2019. The War between Bacteria and Bacteriophages. *IntechOpen*. Kättesaadav: <https://doi.org/10.5772/intechopen.87247>.
- [26] Bower, E. K. M., Cooper, L. P., Roberts, G. A., White, J. H., Luyten, Y., Morgan, R. D., Dryden, D. T. F. 2018. A model for the evolution of prokaryotic DNA restriction-modification systems based upon the structural malleability of Type I restriction-modification enzymes. *Nucleic Acids Research*, 46(17), 9067–9080. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1093/nar/gky760>.
- [27] Heinaru, A. 2012. Viirusede geneetika. *Geneetika: õpik kõrgkoolile*, 493-526. Kättesaadav: <https://geneetika.ee/wp-content/uploads/2014/09/Geneetika-XVI-osa-A.-Heinaru.pdf> (27.12.2024).
- [28] Lopatina, A., Tal, N., Sorek, R. 2020. Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy. *Annual review of virology*, 7(1), 371–384. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011620-040628>.
- [29] Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., Rozhon, W. 2013. Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mobile genetic elements*, 3(5), e26219. Kättesaadav: <https://doi.org/10.4161/mge.26219>.
- [30] Owen, S. V., Wenner, N., Dulberger, C. L., Rodwell, E. V., Bowers-Barnard, A., Quinones-Olvera, N., Rigden, D. J., Rubin, E. J., Garner, E. C., Baym, M., Hinton, J. C. D.

2021. Prophages encode phage-defense systems with cognate self-immunity. *Cell host & microbe*, 29(11), 1620–1633. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.09.002>.
- [31] Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M., de Lorenzo, V. 2015. Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. *Environmental microbiology*, 17(1), 76–90. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12492>.
- [32] Macdonald, E., Wright, R., Connolly, J. P., Strahl, H., Brockhurst, M., van Houte, S., Blower, T. R., Palmer, T., Mariano, G. 2023. The novel anti-phage system Shield co-opts an RmuC domain to mediate phage defense across *Pseudomonas* species. *PLOS Genetics*, 19(6), e1010784. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010784>.
- [33] Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., Doron, S., Sorek, R. 2018. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nature microbiology*, 3(1), 90–98. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0051-0>.
- [34] Deep, A., Gu, Y., Gao, Y. Q., Ego, K. M., Herzik, M. A., Zhou, H., Corbett, K. D. 2022. The SMC-family Wadjet complex protects bacteria from plasmid transformation by recognition and cleavage of closed-circular DNA. *Molecular Cell*, 82(21), 4145–4159. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.09.008>.
- [35] Antine, S. P., Johnson, A. G., Mooney, S. E., Leavitt, A., Mayer, M. L., Yirmiya, E., Amitai, G., Sorek, R., Kranzusch, P. J. 2024. Structural basis of Gabija anti-phage defence and viral immune evasion. *Nature*, 625(7994), 360–365. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06855-2>.
- [36] Agapov, A., Baker, K. S., Bedekar, P., Bhatia, R. P., Blower, T. R., Brockhurst, M. A., Brown, C., Chong, C. E., Fothergill, J., Graham, S., Hall, J. P., Maestri, A., McQuarrie, S., Olina, A., Pagliara, S., Recker, M., Richmond, A., Shaw, S. J., Szczelkun, M. D., Taylor, T. B., van Houte, S., Went, S. C., Westra, E. R., White, M. F., Wright, R. 2024. Multi-layered genome defences in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 78, 102436. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102436>.
- [37] Rish, A. D., Fosuah, E., Shen, Z., Marathe, I. A., Wysocki, V. H., Fu, T. M. 2025. Architecture remodeling activates the HerA-DUF anti-phage defense system. *Molecular Cell*, 85(6), 1189–1201. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2025.02.001>.
- [38] Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., Broda, P. 1977. Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Molecular and General Genetics MGG*, 154, 203–204. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1007/BF00330838>.
- [39] Laipaik, J. M. 2024. *Pseudomonas putida* bakteriofaagide keskkonnast eraldamise meetodid. Bakalaureusetöö. Tartu ülikool: molekulaar- ja rakubioloogia instituut. Kättesaadav: <https://dspace.ut.ee/server/api/core/bitstreams/fd7c9f2e-81d8-4bc4-954b-eb5e93e2d11f/content> (29.03.2025).
- [40] Wu, Y., Garushyants, S. K., van den Hurk, A., Aparicio-Maldonado, C., Kushwaha, S. K., King, C. M., Ou, Y., Todeschini, T. C., Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Gençay, Y. E., Koonin, E. V., Nobrega, F. L. 2024. Bacterial defense systems exhibit synergistic anti-phage activity. *Cell Host & Microbe*, 32(4), 557–572. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.01.015>.

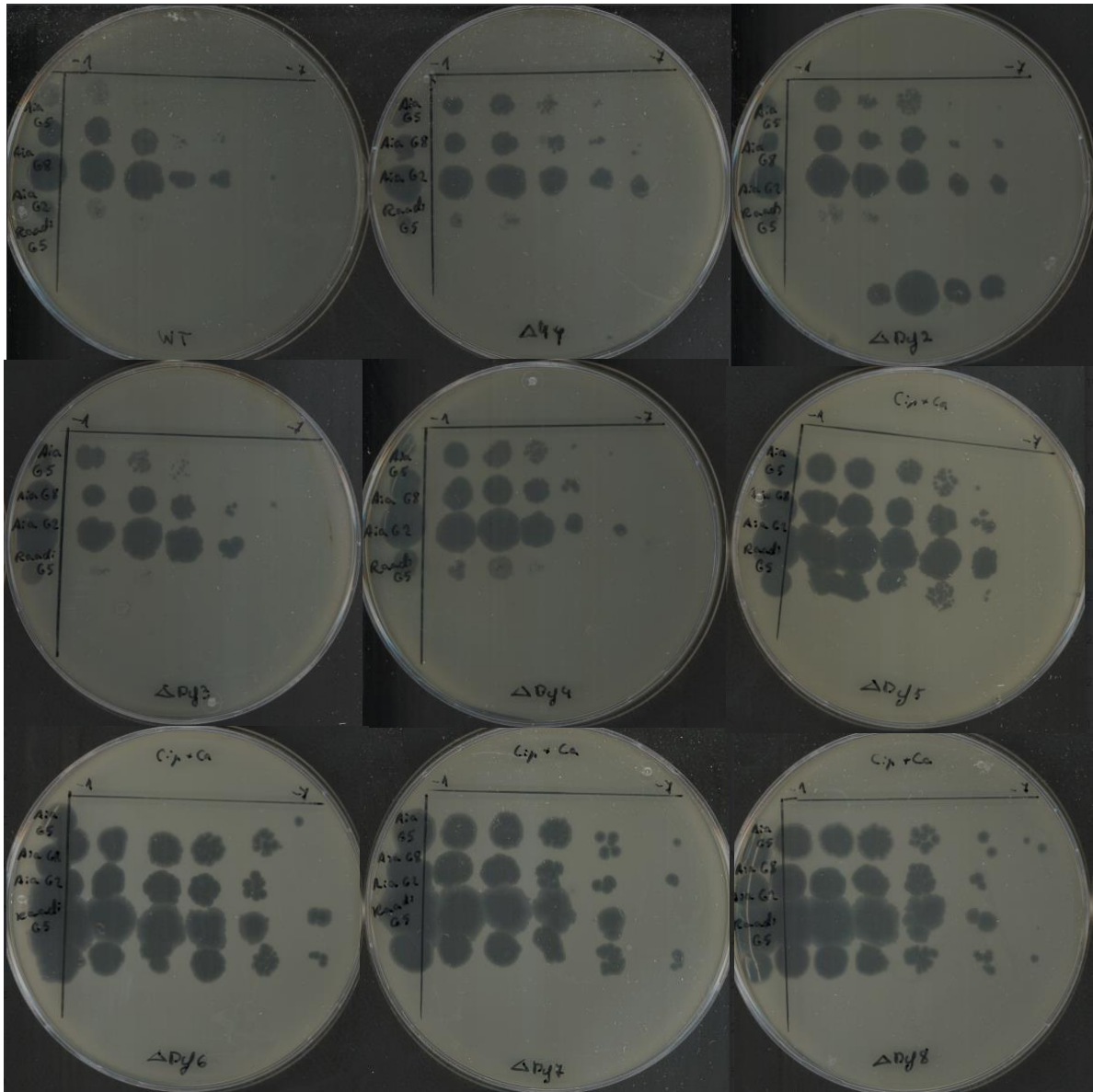
LISA 1. Faagide perekondade määramiseks kasutatud praimerid

Töös kasutatud praimerid bakteriofaagide perekondade määramiseks

Praimeri nimetus	Nukleotiidne järjestus (5'→3')	Otstarve	Segu
G1-orf17-L	GGAAGAAGGGAACAGAGGCT	G1 faagiperekonna määramine	G1+G5+G7
G1-orf17-R	GCCAATCTGTCTGCTCCATG		
G5(Konna)-orf46-L	AGATAGAGGATGACGACCCG	G5 faagiperekonna määramine	
G5(Konna)-orf46-R	GTACCCGGTGAACATCTCGT		
G7-orf43-L	CACCATGCAGATCCTCATCA	G7 faagiperekonna määramine	
G7-orf43-R	GGACTTGACTCATGAAGCCG		
G2(F1)-orf33-L	CCCTGAAGAACTCGCAATGG	G2 faagiperekonna määramine	G2+G4
G2(F1)-orf33-R	TCTTCCCCGTCGATCTCTTG		
G4-orf41-L	TGATGATCGACCGACCAGAG	G4 faagiperekonna määramine	
G4-orf41-R	GACGTTGATCTCGAAGGCAC		
G6(Luke3)-orf44-L	GACCTGACCAACGGAACAAC	G6 faagiperekonna määramine	G6+G9A
G6(Luke3)-orf44-R	GGACGACGTATTCCCGGATA		
G9A-orf40-L	TTGGTCGTGGCGTTTACTTC	G9A faagiperekonna määramine	
G9A-orf40-R	CGTCACTTGTCGCTTCATGT		
G6(Luke3)-orf44-L	GACCTGACCAACGGAACAAC	G6 faagiperekonna määramine	G6+G9B
G6(Luke3)-orf44-R	GGACGACGTATTCCCGGATA		
G9B-orf36-L	TCCCTGTTCCCGAAAGACTC	G9B	

G9B-orf36-R	ACAATTTGCAGAACGGTCCC	faagiperekonna määramine	
G8-orf38-L	GAACGCTTGCCTGAAATCCA	G8 faagiperekonna määramine	G8+G9A
G8-orf38-R	GATGTGTACGACCATGCTGC		
G9A-orf40-L	TTGGTCGTGGCGTTTACTTC	G9A faagiperekonna määramine	
G9A-orf40-R	CGTCACTTGTCGCTTCATGT		
G8-orf38-L	GAACGCTTGCCTGAAATCCA	G8 faagiperekonna määramine	G8+G9B
G8-orf38-R	GATGTGTACGACCATGCTGC		
G9B-orf36-L	TCCCTGTTCCCGAAAGACTC	G9B faagiperekonna määramine	
G9B-orf36-R	ACAATTTGCAGAACGGTCCC		
G10 (PuKo-2)-L	GTCACCACTATCGCACCAAC	G10 faagiperekonna määramine	G10+G11
G10 (PuKo-2)-R	ACGAGGAAGTCACAGGTCTG		
G11 (Azores-1)-L	TTTGGCGTCCGAACAACTG	G11 faagiperekonna määramine	
G11 (Azores-1)-R	CACCACCATCTTCTGCTTCG		

LISA 2. Faagide kumulatiivne nakatamisvõime



Töös eraldatud faagide nakatamisvõime erinevate *P. putida* deletsioontüvedega tilkkülvi tassidel (WT kuni $\Delta\text{Def}8$)