



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos II kurso studentė

Emilija PETRAUSKAITĖ

Magistro baigiamasis darbas

***Pantoea* genties bakterijas infekuojančių bakteriofagų charakterizavimas**

Darbo vadovas:

Dr. Eugenijus Šimoliūnas

Vilnius, 2020

## ***Pantoea* genties bakterijas infekuojančių bakteriofagų charakterizavimas**

Magistrinis darbas atliktas VU Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje

Emilija Petrauskaitė

\_\_\_\_\_

Darbo vadovas:

Dr. Eugenijus Šimoliūnas

\_\_\_\_\_

## TURINYS

<b>SANTRUMPŲ SĄRAŠAS</b>	5
<b>ĮVADAS</b>	6
<b>1.1. Bakterijos ir jų sukeliama augalų liga</b>	7
<b>1.1.1. <i>Pantoea</i> ir <i>Erwinia</i> genties bakterijų sukeliama augalų liga</b>	7
<b>1.2. Bakteriofagai, jų įvairovė ir klasifikacija</b>	9
<b>1.2.1. <i>Pantoea</i> ir <i>Erwinia</i> bakteriofagai</b>	12
<b>1.3. Bakteriofagų reikšmė</b>	15
<b>1.3.1. Bakteriofagų praktinis taikymas augalininkystėje</b>	18
<b>2. MEDŽIAGOS IR METODAI</b>	20
<b>2.1. Medžiagos</b>	20
<b>2.1.1. Bakteriofagai</b>	20
<b>2.1.2. Bakterijų kamienai</b>	20
<b>2.1.3. Terpės ir tirpalai</b>	22
<b>2.1.4. Reagentai</b>	23
<b>2.1.5. Prietaisai</b>	23
<b>2.2.1. Bakterinių ląstelių auginimas</b>	24
<b>2.2.2. Bakteriofagų dauginimas ir titro nustatymas</b>	24
<b>2.2.3. Bakteriofagų gryninimas centrifuguojant cezio chlorido gradientu</b>	25
<b>2.2.4. Preparatų paruošimas TEM analizei</b>	25
<b>2.2.5. Genominės DNR išskyrimas</b>	25
<b>2.2.6. Fagų genominės DNR restrikcinė analizė</b>	26
<b>2.2.7. Bakteriofagų ląstelių šeimininkų spektro nustatymas</b>	26
<b>2.2.8. Bakteriofagų infekcinio efektyvumo ir adsorbcijos eksperimentai</b>	27
<b>2.2.9. Bakteriofagų atsparumo chloroformui ir inaktyvacijos temperatūros nustatymo eksperimentai</b>	27
<b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b>	28
<b>3.1. Bakteriofagų morfologija</b>	28
<b>3.2. Bakteriofagų fiziologija</b>	30
<b>3.2.1. Infekcinis efektyvumas</b>	30
<b>3.2.3. Šeimininkų spektras</b>	35
<b>3.2.4. Adsorbcijos efektyvumas</b>	37
<b>3.3. Jautrumas fiziniams ir cheminiams veiksniams</b>	38
<b>3.3.1. Jautrumo chloroformui nustatymas</b>	38
<b>3.3.2. Inaktyvacijos temperatūros nustatymas</b>	39
<b>3.4. Restrikcijos profilių ir genominės DNR modifikacijų nustatymas</b>	40

<b>IŠVADOS</b>	43
<b>SANTRAUKA</b>	47
<b>SUMMARY</b>	48
<b>LITERATŪROS ŠALTINIAI</b>	49

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

dg – dvigrandė

DNazė – deoksiribonukleazė

DSMZ – vokietijos mikroorganizmų ir ląstelių kultūrų kolekcija (*vok.* Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

EOP – infekcinis efektyvumas formuojant infekcinius centrus (*angl.* efficiency of plaquing)

g – pagreitis (santykinė išcentrinė jėga)

gDNR – genomine DNR

GRAS – laikomas saugus naudoti (*angl.* generally recognized as safe)

kb – kilobazė

LB terpė – Luria-Bertani terpė

LPS – lipopolisacharidas

MOI – infekcijos daugybiškumas (*angl.* multiplicity of infection)

NCBI – nacionalinis biotechnologijos informacijos centras (*angl.* National Center for Biotechnology Information)

OD – optinis tankis (*angl.* optical density)

PB – fosfatinis bakteriofagų suspensijos buferinis tirpalas (*angl.* phosphate buffer)

PFU – infekcinį centrą formuojantis vienetas (*angl.* plaque-forming unit)

PGR – polimerazės grandininė reakcija

REazės – restrikcijos endonukleazės

TE – Tris-HCl ir EDTA buferis

TEM – transmisinė elektroninė mikroskopija

vg – viengrandė

## IVADAS

Apskaičiuota, kad žemėje egzistuojančių bakterijų skaičius gali siekti iki  $5 \times 10^{30}$  vnt., tai yra daugiau nei augalų ir gyvūnų skaičius kartu sudėjus (Sharma et al., 2019). Kita vertus, dauguma bakterijų gali būti užkrėstos ir infekuotos vienu ar keliais virusais, vadinamais bakteriofagais (fagais), todėl pastarieji yra laikomi dar gausesniais ir įvairesniais nei jų ląstelės-šeimininkės (Sharma et al., 2019).

Nors daugeliu atvejų akcentuojamasi į patogeninių bakterijų sukeltas žmonių ligas ir jų sprendimo būdus, tačiau nemažiau svarbi ir kovos priemonių prieš milžiniškus nuostolius maisto, žemės ūkio ir veterinarijos pramonėje sukeliančias bakterijas, paieška. Bakteriofagai ar jų pagrindu sukurti produktai – vienas iš sėkmingų pavyzdžių (Fernández et al., 2018; Svircev et al., 2018). Kita vertus, siekiant sėkmingai pritaikyti fagų ar jų pagrindu sukurtus produktus, ir siekiant išvengti galimo nepageidaujamo jų poveikio, reikalingas itin detalus šių tyrimo objektų ištyrimas ir charakterizavimas, tuo tarpu dabartinės mokslinės žinios atspindi tik labai mažą šių bakterijas infekuojančių virusų įvairovę. Nepaisant to, kad *Pantoea* genties bakterijos yra vienos gausiausių bakterijų filoseferoje ir yra žinomos ne tik kaip itin svarbūs epifitai ar endofitai, bet ir gali būti susijusios su įvairiomis vabzdžių, gyvūnų ar augalų ligomis (Walterson et al., 2015; Dutkiewicz et al., 2015), šias bakterijas infekuojantys bakteriofagai iki šiol tirti itin menkai (Šimoliūnas et al., 2018; Thompson et al., 2019; Šimoliūnienė et al., 2020).

Siekiant bent iš dalies pakeisti esamą situaciją, šio darbo metu buvo atliekama skyriaus darbuotojų ankstesnių darbų metu izoliuotų *Pantoea* genties bakterijas infekuojančių bakteriofagų vB\_PagS\_MED16 (MED16), vB\_PagS\_AAS23 (AAS23), vB\_PagS\_AAS21 (AAS21) ir vB\_PagM\_LIET2 (LIET2) morfologijos, fiziologijos bei biocheminiai tyrimai.

**Darbo tikslas:** naujų bakteriofagų, infekuojančių *Pantoea* genties bakterijas, charakterizavimas.

Šiam tikslui pasiekti buvo išskirti šie **uždaviniai**:

1. Atlikti fagų virionų TEM analizę.
2. Nustatyti bakteriofagų infekcinį efektyvumą.
3. Atlikti bakteriofagų ląstelių-šeimininkų spektro tyrimus.
4. Įvertinti fizinių ir cheminių veiksnių įtaką fagų infektyvumui.
5. Atlikti fagų genomines DNR restrikcijos profilių ir potencialių modifikacijų analizę.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Bakterijos ir jų sukeltos augalų ligos

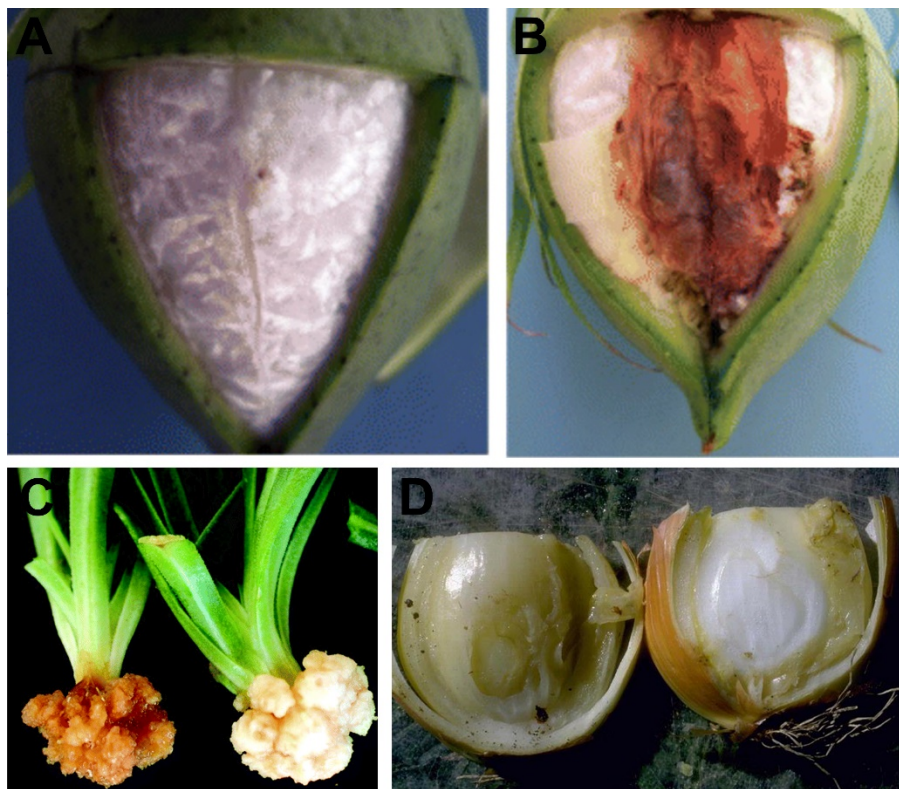
Bakterijos – tai vienaląsčiai (prokariotiniai) mikroorganizmai, kurie gyvena pačiose įvairiausiose buveinėse: nuo giliausių vandenynų ir dirvožemio sluoksnių iki žmonių virškinamojo trakto (Granato et al., 2019). Bakterijos pasižymi labai įvairiais metaboliniais gebėjimais, kaip maisto šaltinį naudodamos tiek įvairius organinius, tiek kai kuriuos neorganinius junginius. Bakterijos gali būti augalų ar bestuburių simbiotai, atliekantys tokias svarbias funkcijas kaip azoto fiksacija ar celiuliozės skaidymas. Be šių prokariotų dirvožemis nebūtų derlingas, o negyvos organinės medžiagos suirtų daug lėčiau (Rogers ir Kander, 2019). Kita vertus, bakterijos gali sukelti įvairias augalų ir gyvūnų (įskaitant žmones) ligas.

Žemės ūkyje dažnai susiduriama su bakterijomis, sukeliančiomis augalų ligas. Tai viena iš didžiausių problemų, galinčių paveikti visą agrokultūrą (Sundin et al, 2016). Nestabdomai plisdamos patogeninės bakterijos leidžia plisti ir jų sukeliams ligoms. Bakterinių patogenų augimo greitis, esant optimalioms aplinkos sąlygoms ir nesant veiksmingų antibakterinių kovos priemonių, gali greitai padidinti mikroorganizmų populiaciją, kuri suteikia galimybę ligai išplisti į naujas infekcijos vietas, sukeliant ligų epidemijas, o tuo pačiu ir didžiulius ekonominius nuostolius (Sundin et al, 2016). Patogeninės augalų bakterijos gali sukelti įvairius augalų pažeidimus: formuojasi galai, atsiranda dėmės ant lapų, susidaro minkštieji puviniai (Ellis et al., 2008). Dėl patogeninių bakterijų sukeltų augalų pažeidimų mažėja produkcijos kiekis, kuris yra svarbus siekiant išmaitinti šiuo metu vis dar augantį pasaulio gyventojų skaičių (Svircev et al., 2018). Dėl šios priežasties, yra itin svarbu nustatyti (įvardinti) ligas sukeliančias bakterijas ir imtis priemonių, kurios padėtų efektyviai apsaugoti augalus nuo šių ligų.

### 1.1.1. *Pantoea* ir *Erwinia* genties bakterijų sukeltos augalų ligos

*Erwinia* ir *Pantoea* genties bakterijos yra Gram-neigiamos, lazdelės formos, filogenetiniu požiūriu tarpusavyje itin glaudžiai susijusios bakterijos, priklausančios *Enterobacteriales* eilei, *Erwiniaceae* šeimai (Thompson et al., 2019). *Pantoea agglomerans* bakterijos anksčiau buvo žinomos kaip *Enterobacter agglomerans* arba *Erwinia herbicola* ir tik 1989 metais buvo perklasifikuotos į naują gentį *Pantoea* (Büyükcām et al., 2018). Šios bakterijos yra išskirtos iš daugelio aplinkų, įskaitant dirvožemį, vandenį ir augalus (Moradi Amirabad ir Khodakaramian et al., 2016; Walterson ir Stavrinides, 2015).

*Erwinia* ir *Pantoea* genties bakterijos yra žinomos ne tik kaip itin svarbūs augalų epifitai ar endofitai, bet ir gali būti susijusios su įvairiomis vabzdžių, žmonių, taip pat augalų ligomis, kurios pakenkia vaismedžiams, daržovėms ar agrokultūriniam augalams (Bhat et al., 2010; Coutinho ir Venter, 2009; Panditrao ir Panditrao, 2018; Büyükcem et al., 2018). Šie patogenai yra didelė našta žemės ūkiui ir šiuo metu yra įvardyti kaip galimi biologinio terorizmo sukėlėjai (Thompson et al., 2019). Pavyzdžiui, *Erwinia amylovora* sukelia vaismedžių (kriaušių ir obuolių) bakterinę degligę, kuri vidutiniškai per metus padaro apie 100 milijonų JAV dolerių žalos vaismedžių sodams (Thompson et al., 2019). *Pantoea ananatis* sukelia svogūnų centrinį puvinį (1 pav. D), o *Pantoea agglomerans* – bulvių puvinius, medvilnės išorinio apvalkalo pažeidimus (1 pav. A ir B). *Pantoea agglomerans* taip pat gali sukelti ligas įvairių rūšių žolėms: varpučiui, aukštajai avižuolei, pajūrio pelėžirniui lapų nekrozę, kukurūzams lapų vytimą. Kai kurie patogeniniai *P. agglomerans* kamienai gali sukelti augalų auglius ir formuoja galus runkeliuose, gubojose (1 pav. C), spanguolėse (Dutkiewicz et al., 2016).



**1 pav. A, B** – *Pantoea agglomerans* sukeltas medvilnės išorinio apvalkalo pažeidimas. (a) nepažeistas žiedas; (b) pažeistas žiedas (Dutkiewicz et al., 2016). **C** – *Pantoea agglomerans* sukelti galai muilinei gubojai (Dutkiewicz et al., 2016). **D** – *Pantoea ananatis* sukeltas centrinis svogūno puvinys (Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org)

*Erwinia* ir *Pantoea* genties bakterijų sukeltos ligos ir patiriami nuostoliai agrokultūroje skatina ieškoti būdų, kurie padėtų įveikti ligas ir pagerinti žemės ūkio kokybę.



Bakterinės degligės infekcijos yra gydomos antibiotikais, tačiau 70% šių gamtoje randamų ir ligą sukeliančių bakterijų yra atsparios šiuo metu naudojamiems antibiotikams (Dy et al, 2018). Dėl šios priežasties ieškoma naujų, efektyvių kovos priemonių prieš patogenines, antibiotikams atsparias bakterijas, o vienas iš alternatyvių būdų, kuris leistų apsaugoti augalus nuo įvairių bakterijų sukeltų ligų – bakteriofagų ar jų produktų panaudojimas biokontrolėje (Dy et al, 2018).

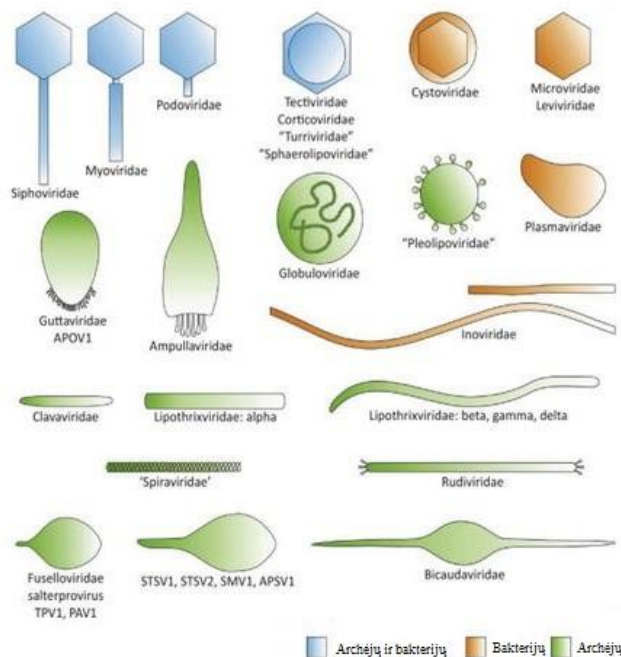
## 1.2. Bakteriofagai, jų įvairovė ir klasifikacija

Bakteriofagai – virusai, infekuojantys bakterijas. Tai vieni iš labiausiai paplitusių virusų Žemėje, kuriuos galima rasti vandenynuose, dirvožemyje bei visose gyvose sistemose: žmoguje, gyvūnuose, augaluose, vabzdžiuose ir bakterijose (White ir Orlova, 2019; Dion et al., 2020). Manoma, kad bendras bakteriofagų skaičius biosferoje gali svyruoti nuo  $10^{30}$  iki  $10^{32}$  vnt., o 1 ml neužteršto vandens siekti apie  $2 \times 10^8$  gyvybingų virusinių dalelių (Abuladze et al., 2008).

Bakteriofagai yra sudaryti iš genetinės medžiagos ir ją gaubiančio baltyminio apvalkalo – kapsidės. Fagų genomus sudaro DNR arba RNR, kuri gali būti dvigrandė arba viengrandė, linijinė arba žiedinė, su grandinės galuose prisitvirtinisiais baltymais arba be jų (Ackermann, 2009). Kapsidė gali būti polihedrinė (*Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* ir *Cystoviridae* šeimų bakteriofagų), filamentinė (*Inoviridae* šeima), pleomorfinė (*Plasmaviridae* šeima) arba sujungta su uodegėle (*Caudovirales* eilė) (Dion et al., 2020).

Bakteriofagų klasifikacija į tam tikras grupes remiasi virusų genomo, morfologinėmis, fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, taip pat reprodukcijos charakteristikomis bei biologinėmis savybėmis, pavyzdžiui, šeimininkų spektru ar temperatūrinio infektyvumo savybėmis (Ackermann, 2009). Šeimininkų spektro nustatymas yra svarbi charakteristika, leidžianti įvertinti praktinio fagų taikymo kovoje prieš įvairias bakterijas galimybes, o sąvoka platus šeimininkų spektras (*angl.* broad host range) apibūdina bakteriofagus, gebančius infekuoti kelias bakterijų rūšis (Yu et al., 2016) ar užkrėsti santykinai didelį skaičių tos pačios rūšies bakterijų kamienų (Xu et al., 2016). Tuo tarpu remiantis fagų vystymosi temperatūra, Seeley ir Primrose išskyrė tris bakteriofagų tipus: žemos temperatūros (*angl.* low-temperature, LT) bakteriofagai, kurie vystosi iki 30 °C temperatūroje, vidutinės temperatūros (*angl.* mid-temperature, MT) bakteriofagai, kurių vystymosi ribos yra 15–45 °C ir aukštos temperatūros (*angl.* high-temperature, HT) bakteriofagai, kurie vystosi tik esant aukštesnei nei 25 °C temperatūrai (Seeley ir Primrose, 1980).

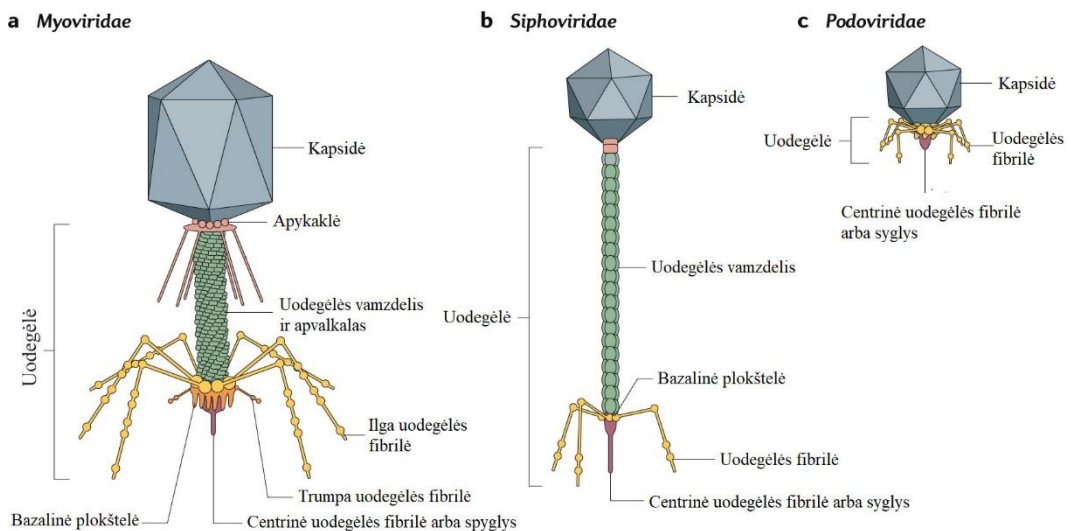
Visgi, esminis kriterijus, į kurį yra atsižvelgiama atliekant taksoniminę bakteriofagų klasifikaciją, yra jų genomo savybė – nukleorūgšties tipas (vgDNR, vgRNR, dgDNR ar dgRNR) (Dion et al., 2020). Taksonominę bakteriofagų klasifikaciją vykdo Tarptautinis virusų taksonomijos komitetas (ICTV) (Dion et al., 2020). Šiuo metu žinomos prokariotų virusų šeimos ir joms būdingi morfologiniai požymiai pateikiami 2 paveiksle.



**2 pav.** Bakterijas ir archėjas infekuojančios virusų šeimos. Paveikslas parengtas remiantis White ir Orlova pateikta informacija (White ir Orlova, 2019).

Gausiausia ir šiuo metu detaliausiai ištirta fagų grupė yra uodeguotieji fagai (eilė *Caudovirales*), kurie sudaro apie 96% visų žinomų bakterijas infekuojančių virusų (Fokine ir Rossmann, 2014; Cai et al., 2019). Uodeguotiesiems bakteriofagams būdinga ikosaedrinė kapsidė ir uodegėlė, kuri yra prisitvirtinusi prie vienos iš 12 kapsidės viršūnių (Fokine ir Rossmann, 2014). Pati uodegėlė yra sudėtinga vamzdelio formos struktūra, kuri pasižymi spiraline simetrija (Fokine ir Rossmann, 2014). Uodegėlė gali turėti fibriles, spygliukus arba galiuką, kurie funkcionuoja kaip receptorių surišantys baltymai, reikalingi specifiskai atpažinti šeimininko receptorius ir kurie, kartu su uodegėle, yra pagrindiniai veiksniai, lemiantys atitinkamo fago specifiskumą ir infekcijos procesą (Veesler ir Cambillau, 2011; Parmar et al., 2017; White ir Orlova, 2019). Uodegėlės receptorių surišantys baltymai padeda bakteriofagai sąveikauti tik su atitinkamais šeimininkais, nes jis atpažįsta tik specifinius ląstelės-šeimininkės receptorius, tokius kaip lipopolisaharidas, teicho rūgštys ir porinai, todėl tokia sąveika lemia bakteriofago infekuojamų ląstelių-šeimininkių ratą (Parmar et al., 2017; Nobrega et al., 2018).

Ilgą laiką uodeguotųjų bakteriofagų (eilė *Caudovirales*) grupę sudarė trys šeimos (*Myoviridae*, *Podoviridae* ir *Siphoviridae*) (3 pav.), į kurias virusai buvo skirstomi atsižvelgiant į jų morfologiją, o esminis jų tarpusavio morfologinis skirtumas – uodegėlės struktūra (Nobrega et al., 2018). Pastaruoju metu didėjant virusų (įskaitant bakteriofagus) genetinės informacijos kiekiui ir atsižvelgiant ne tik į jų morfologines savybes, bet ir į filogenetinį ryšį su kitais bakteriofagais, neseniai buvo atliktas *Caudovirales* fagų šeimų perklasifikavimas, patvirtintos naujos fagų grupės ir šiuo metu yra išskiriamos jau devynios bakteriofagų šeimos: *Ackermannviridae*, *Autographiviridae*, *Chaseviridae*, *Demereciviridae*, *Drexelviridae*, *Herelleviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* ir *Siphoviridae* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/2020-04-09>). Visgi, nepaisant besikeičiančios taksonominės klasifikacijos, dauguma šiuo metu identifikuotų bakteriofagų vis dar yra *Myoviridae*, *Podoviridae* ir *Siphoviridae* šeimų atstovai (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/2020-04-09>).



**3 pav.** *Caudovirales* eilės pagrindinių šeimų (*Myoviridae* – a, *Siphoviridae* – b, *Podoviridae* – c) bakteriofagų struktūros pagal Nobregą (Nobrega et al., 2018).

*Siphoviridae* – tai šeima, kuri sudaro didžiąją *Caudovirales* eilės fagų dalį – 61%. Būdinga ilga, lanksti ir nesusitraukianti uodegėlė. Genomui būdinga linijinė dvigrandė DNR apie 22-134 kb, turinti 37-88 genų (King et al., 2011; Nobrega et al., 2018). Kita fagų šeima, kuri sudaro 25% visų *Caudovirales* fagų yra *Myoviridae* šeima. Palyginus su kitais uodeguotaisiais fagais, miovirusai dažnai turi: didesnes galvutes, didesnę DNR kiekį bei yra jautresni užšaldymui, atšildymui ir osmosiniam šokui. Šiems fagams būdinga ilga, nelanksti ir susitraukianti uodegėlė, o genetinė medžiaga – linijinė, dvigrandė DNR apie 34-500 kb, koduojanti 40-600 baltymų (King et al., 2011; Nobrega et al., 2018). Mažiausią dalį (14%) visų *Caudovirales* fagų sudaro *Podoviridae* šeima. Šios šeimos virusų galvutė yra ikosaedrinė, apie

60 nm skersmens, uodegėlė trumpa, nelanksti ir nesusitraukianti, o genetinė medžiaga daugeliu atvejų sudaryta iš 39-45 kb linijinės dvigrandės DNR, koduojančios 46-68 genus (King et al., 2011; Nobrega et al., 2018).

### 1.2.1. *Pantoea* ir *Erwinia* bakteriofagai

Remiantis NCBI GenBank duomenimis, šiuo metu šioje duomenų bazėje yra paskelbti 75 bakteriofagų, kurie yra įvardinti kaip *Pantoea* arba *Erwinia* bakteriofagai, genomai (apibendrinti duomenys apie šiuos bakteriofagus pateikti 1 lentelėje). Kaip matyti iš 1 lentelėje pateiktų duomenų, *Pantoea* ir *Erwinia* fagų genomai svyruoja nuo 29 564 bp (*Erwinia* fagas ENT90) iki 275 000 bp (*Erwinia* fagas MadMel), identifikuotų *Erwinia* bakteriofagų skaičius (63) gerokai viršija *Pantoea* bakteriofagų (12) skaičių. Tiek *Pantoea*, tiek *Erwinia* bakteriofagai priklauso visoms trimis pagrindinėms bakteriofagų morfologinėms šeimoms (*Siphoviridae*, *Myoviridae* ir *Podoviridae*), o du *Erwinia* bakteriofagai (vB\_EamM-Bue1 ir phiEa2809) yra naujos, *Ackermannviridae*, šeimos atstovai. Įdomu tai, kad nors, kaip jau minėta anksčiau, dauguma šiuo metu žinomų bakteriofagų yra *Siphoviridae* šeimos atstovai, tačiau šiuo atveju absoliuti dauguma (44 iš 63) iki šiol identifikuotų *Erwinia* ir bakteriofagų su pilnai nustatytais ir paskelbtais genomais yra miovirusai, o sifovirusų tėra tik keturi. *Pantoea* genties bakteriofagų kol kas nustatyta tik 12, todėl apie jų pasiskirstymą dar sunku daryti išvadas.

**1 lentelė.** NCBI GenBank duomenų bazėje paskelbti *Pantoea* ir *Erwinia* bakteriofagai.

	Bakteriofagas	GenBank genomo nr.	Šeima	Genomo dydis, bp
1	<i>Erwinia</i> fagas vB_EamM_MadMel	MG655269.1	<i>Myoviridae</i>	275000
2	<i>Erwinia</i> fagas vB_EamM_Mortimer	MG655270.1	<i>Myoviridae</i>	273914
3	<i>Erwinia</i> fagas Rebecca	MK514281.1	<i>Myoviridae</i>	273731
4	<i>Erwinia</i> fagas vB_EamM_Deimos- Minion	KU886225.1	<i>Myoviridae</i>	273501
5	<i>Erwinia</i> fagas vB_EamM_Special G	KU886222.1	<i>Myoviridae</i>	273224
6	<i>Erwinia</i> fagas vB_EamM_Desertfox	MG655268.1	<i>Myoviridae</i>	272458
7	<i>Erwinia</i> fagas vB_EamM_Bosolaphorus	MG655267.1	<i>Myoviridae</i>	272228
8	<i>Erwinia</i> fagas vB_EamM_RAY	KU886224.1	<i>Myoviridae</i>	271182
9	<i>Erwinia</i> fagas vB_EamM_Simmy50	KU886223.1	<i>Myoviridae</i>	271088
10	<i>Erwinia</i> fagas Ea35-70	KF806589.1	<i>Myoviridae</i>	271084

11	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Alexandra	MH248138.1	<i>Myoviridae</i>	266532
12	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Y3	KY984068.1	<i>Myoviridae</i>	261365
13	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Yoloswag	KY448244.1	<i>Myoviridae</i>	259700
14	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Kwan	KX397369.1	<i>Myoviridae</i>	246390
15	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Asesino	KX397364.2	<i>Myoviridae</i>	246290
16	<i>Erwinia fagas</i> Wellington	MH426724.1	<i>Myoviridae</i>	244950
17	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_ChrisDB	KX397366.1	<i>Myoviridae</i>	244840
18	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Stratton	KX397373.1	<i>Myoviridae</i>	243953
19	<i>Erwinia fagas</i> phiEaH2	JX316028.1	<i>Myoviridae</i>	243050
20	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Machina	KX397370.1	<i>Myoviridae</i>	241654
21	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Caitlin	KX397365.1	<i>Myoviridae</i>	241147
22	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Parshik	KX397371.1	<i>Myoviridae</i>	241050
23	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Huxley	KX397368.1	<i>Myoviridae</i>	240761
24	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Joad	MF459647.1	<i>Myoviridae</i>	235374
25	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_RisingSun	MF459646.1	<i>Myoviridae</i>	235108
26	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_Phobos	KX397372.1	<i>Myoviridae</i>	229501
27	<i>Erwinia fagas</i> Derbicus	MK514282.1	<i>Myoviridae</i>	223950
28	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_EarlPhillipIV	KX397367.1	<i>Myoviridae</i>	223935
29	<i>Erwinia fagas</i> PhiEaH1	KF623294.1	<i>Myoviridae</i>	218339
30	<i>Erwinia fagas</i> Cronus	MH059636.2	<i>Myoviridae</i>	175774
31	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM-Bue1	MG973030.1	<i>Ackermannviridae</i>	164037
32	<i>Erwinia fagas</i> phiEa2809	KP037007.1	<i>Ackermannviridae</i>	162160
33	<i>Erwinia fagas</i> Hena1	MN732867.1	<i>Myoviridae</i>	148842
34	<i>Erwinia fagas</i> pEp_SNUABM_01	MN184887.1	<i>Myoviridae</i>	147321
35	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagS_AAS21</b>	MK770119.1	<i>Siphoviridae</i>	116649
36	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM-M7	HQ728263.1	<i>Myoviridae</i>	84694
37	<i>Erwinia fagas</i> phiEa21-4	EU710883.1	<i>Myoviridae</i>	84576
38	<i>Erwinia fagas</i> phiEa104	FQ482083.1	<i>Myoviridae</i>	84565
39	<i>Erwinia fagas</i> SunLIRen	MH426725.1	<i>Myoviridae</i>	84559
40	<i>Erwinia fagas</i> phiEaP-8	MH160392.1	<i>Podoviridae</i>	75929
41	<i>Erwinia fagas</i> Ea9-2	KF806588.1	<i>Podoviridae</i>	75568

42	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamP_Rexella	KX098390.2	<i>Podoviridae</i>	75448
43	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamP_Frozen	KX098389.2	<i>Podoviridae</i>	75147
44	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagM_LIET2</b>	MK388689.1	<i>Myoviridae</i>	74710
45	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamP-S6	HQ728266.1	<i>Podoviridae</i>	74669
46	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamP_Gutmeister	KX098391.1	<i>Podoviridae</i>	71173
47	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM_TropicalSun	MN013090.1	<i>Myoviridae</i>	68439
48	<i>Erwinia fagas</i> pEp_SNUABM_08	MN184886.1	<i>Siphoviridae</i>	62716
49	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagS_Vid5</b>	MG948468.1	<i>Siphoviridae</i>	61437
50	<i>Erwinia fagas</i> Pavtok	MH426726.1	<i>Podoviridae</i>	61401
51	<i>Erwinia fagas</i> PEp14	JN585957.1	<i>Podoviridae</i>	60714
52	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamM-Y2	HQ728264.1	<i>Myoviridae</i>	56621
53	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagM_SSEM1</b>	MT230534.1	<i>Myoviridae</i>	54982
54	<i>Erwinia fagas</i> Faunus	MH191398.1	<i>Myoviridae</i>	54065
55	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagS_AAS23</b>	MK095606.1	<i>Siphoviridae</i>	51170
56	<i>Erwinia fagas</i> Midgardsormr38	MN602881.1	<i>Siphoviridae</i>	50485
57	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagM_AAM37</b>	MK798143.1	<i>Myoviridae</i>	49990
58	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagM_PSKM</b>	MK798144.1	<i>Myoviridae</i>	49935
59	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagM_AAM22</b>	MK798142.1	<i>Myoviridae</i>	49744
60	<i>Erwinia fagas</i> phiEt88	FQ482085.1	<i>Myoviridae</i>	47279
61	<i>Erwinia fagas</i> vB_EhrS_59	MH443101.1	<i>Siphoviridae</i>	47116
62	<i>Erwinia fagas</i> vB_EhrS_49	MH443100.1	<i>Siphoviridae</i>	46835
63	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagS_MED16</b>	MK095605.1	<i>Siphoviridae</i>	46103
64	<i>Erwinia fagas</i> phiEa100	FQ482086.1	<i>Podoviridae</i>	45554
65	<i>Erwinia fagas</i> phiEa1H	FQ482084.1	<i>Podoviridae</i>	45522
66	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamP-S2	MG736918.1	<i>Podoviridae</i>	45495
67	<i>Erwinia fagas</i> Era103	EF160123.1	<i>Podoviridae</i>	45445
68	<b><i>Pantoea fagas</i> LIMelight</b>	FR687252.1	<i>Podoviridae</i>	44546
69	<b><i>Pantoea fagas</i> LIMezero</b>	FR751545.1	<i>Podoviridae</i>	43032
70	<b><i>Pantoea fagas</i> vB_PagP-SK1</b>	MN450150.1	<i>Podoviridae</i>	39938
71	<i>Erwinia fagas</i> FE44	KF700371.1	<i>Podoviridae</i>	39860
72	<i>Erwinia fagas</i> pEp_SNUABM_09	MN184885.1	<i>Podoviridae</i>	39848
73	<i>Erwinia fagas</i> vB_EamP-L1	HQ728265.1	<i>Podoviridae</i>	39282
74	<i>Erwinia fagas</i> EtG	MF276773.2	<i>Myoviridae</i>	30413

75	<i>Erwinia fagas</i> ENT90	HQ110084.1	<i>Myoviridae</i>	29564
----	----------------------------	------------	-------------------	-------

Vidutinis *Erwiniaceae* šeimos bakterijas infekuojančių uodeguotųjų fagų genomų G+C kiekis yra 48,5%, o atskirų fagų svyruoja nuo 38,4% iki 55,4% (Thompson et al., 2019). *Erwinia amylovora* yra dažniausia *Erwinia* fagų ląstelių-šeimininkių rūšis, o šių fagų vidutinis G+C kiekis yra 53,6%. Tuo tarpu *Pantoea agglomerans* yra dažniausios *Pantoea* bakteriofagų ląstelės-šeimininkės, šiems fagams būdingas 55,1% G+C kiekis (Thompson et al., 2019).

Fagų ląstelių-šeimininkių tyrimai atskleidė, kad dalis *Erwiniaceae* šeimos bakterijas infekuojančių bakteriofagų yra plataus šeimininkų spektro virusai, t.y., sugeba infekuoti daugiau nei vienos genties bakterijas. Pavyzdžiui, *Erwinia* bakteriofagai Joad, RisingSun (Arens et al., 2018), Y3 (Buttimer et al., 2017), phiEa2809 (Lagonenko et al., 2015), taip pat infekuoja ir *Pantoea* genties bakterijas (Thompson et al., 2019). Šie rezultatai ne tik suteikia žinių apie fagų infekcinio efektyvumo galimybes, bet ir įrodo *Erwinia* ir *Pantoea* bakterijų artimą filogenetinį ryšį. Kita vertus, nustatyta, kad *Erwinia* ir *Pantoea* genties bakterijas gali infekuoti ir genetiniu požiūriu šioms bakterijoms tolimesnes bakterijas infekuojantys bakteriofagai. Pavyzdžiui, *Pectobacterium* bakteriofagui vB\_PcaM\_CBB taip pat yra imlios ir *Erwinia mallotivora* ląstelės (Buttimer et al., 2017), o *Serratia fagas* phiOT8 infekuoja ir *Pantoea agglomerans* (Evans et al., 2010).

### 1.3. Bakteriofagų reikšmė

Bakteriofagus 1915 m. atrado Frederikas Williamas Twortas, o terminą bakteriofagai sukūrė Feliksas d'Herelle (Maciejewska et al., 2018). Nuo pat bakteriofagų atradimo pradžios jais imtasi domėtis kaip priemone kovoje prieš patogenines, įvairias ligas sukeliančias bakterijas, fagai buvo nedelsiant pripažinti kaip galimi antibakteriniai vaistai bei naudoti bakterinėms infekcijoms gydyti jau 1920-1930 metais (Maciejewska et al., 2018). Deja, dėl tuometinių virusologijos žinių trūkumo gydymo rezultatai neretai būdavo priešaringi, o vėliau, atradus ir pradėjus naudoti antibiotikus, pasižyminčius efektyviu veikimu prieš bakterijas, susidomėjimas bakteriofagų terapija daugelyje Vakarų šalių itin sumenko. Vis dėlto, pastaruoju metu vis didėjantis bakterijų atsparumas antibiotikams verčia ieškoti naujų, efektyvių kovos būdų prieš patogenines, antibiotikams atsparias bakterijas, todėl susidomėjimas bakteriofagais ar jų produktais, kaip antibakterine priemone, ir vėl yra gerokai išaugęs (Dy et al., 2018; Principi et al., 2019).

Bakteriofagai naudojami medicinoje nuo viduriavimo ligų, kurias sukelia *E. coli*, *Shigella* ar *Vibrio* genties bakterijos, taip pat nuo žaizdų infekcijų, kurias sukelia fakultatyviniai odos patogenai, tokie kaip stafilokokai ir streptokokai (Principi et al., 2019). Gyvulininkystėje fagai naudojami kovojant su patogenais, tokiais kaip *Campylobacter*, *Escherichia* ir *Salmonella*, žuvininkystės ūkiuose – mažinant *Lactococcus* ir *Vibrio* patogenų poveikį (Easwaran ir Ahn, 2019). Maisto pramonėje bakteriofagai naudojami kaip priemonė pašalinti tokius patogenus kaip *Campylobacter* neapdorotame maiste ir *Listeria* šviežiame maiste bei sumažinti maistą gadinančių bakterijų poveikį (Moye et al., 2018). Pavyzdžiui, LISTEX P100 (Microeos; the Netherlands) ir ListShield (Intralytix; Baltimore, Maryland, USA) yra komerciškai aprobuoti preparatai, naudojami apsaugoti apdorotus maisto produktus nuo *Listeria monocytogenes*. Šių preparatų pagrindas yra fagas P100, jam suteiktas GRAS statusas (*angl.* generally recognized as safe), šiais preparatais yra dezinfekuojami vaisiai, šaldyti maisto produktai ar kitaip apdoroti ir potencialiai galintys turėti *Listeria* genties bakterijų produktai (Salmond ir Fineran, 2015). Bakteriofagų, kaip antimikrobinių priemonių, naudojimo privalumai ir trūkumai, palyginus su antibiotikais, pateikiami 2 lentelėje.

**2 lentelė.** Profilaktinio ir/arba gydomojo bakteriofagų ir antibiotikų naudojimo palyginimas (<http://www.phagetherapycenter.com>).

Bakteriofagai	Antibiotikai	Komentaras
Specifiškumas (paprastai bakteriofagai infekuoja tik tam tikras ląsteles-šeimininkes) – tokiu būdu išvengiama simbiotinių mikroorganizmų pusiausvyros suardymo, todėl mažėja antrinių infekcijų išsivystymo tikimybė.	Antibiotikai naikina tiek patogenines, tiek įprastas žarnyno mikrofloros bakterijas – tai suardo normalią mikroorganizmų pusiausvyrą ir gali sukelti sudėtingas antrines infekcijas.	Didelis bakteriofagų specifiškumas gali būti laikomas ir trūkumu, kadangi dar prieš pradedant fagų terapiją turi būti teisingai identifikuotos ligą sukėlusios bakterijos. Jei to padaryti nepavyksta, žymiai efektyvesni yra plataus veikimo spektro antibiotikai.
Koncentruotumas – bakteriofagų replikacija vyksta tik ląstelėse-šeimininkėse, todėl didžiausia fagų koncentracija yra ten, kur jų labiausiai reikia – bakterijų sukeltos infekcijos vietoje.	Antibiotikai yra nuolat metabolizuojami ir pašalinami iš organizmo, todėl nebūtinai koncentruojasi infekcijos vietoje.	Dėl eksponentinio fagų augimo infekcijos vietoje reikia suvartoti mažesnę šio preparato kiekį, norint pasiekti tą patį optimalų gydomąjį efektą (lyginant su antibiotikais).
Nėra pastebėtas joks rimtas šalutinis poveikis.	Kai kuriais atvejais daugiopas šalutinis poveikis, įskaitant virškinimo sistemos	Fagų terapijos metu gali būti juntamas nežymus šalutinis poveikis, atsirandantis į organizmą išsiskiriant



	sutrikimus, alergijas ir antrines infekcijas.	lizuotų bakterijų endotoksinams, tačiau toks pat efektas pastebėtas ir vartojant antibiotikus. Ilgesnį laiką vartojant fagų preparatus gali susiformuoti imunitetas prieš fagų paviršiaus antigenus ir tokiu būdu gali mažėti gydymo efektyvumas.
Tam tikriems fagams atsparios bakterijos išlieka jautrios kitiems panašias/giminingas ląsteles-šeimininkes infekuojantiems bakteriofagams.	Atsparumą antibiotikams įgyja ne tik konkrečios bakterijos, kurias norint sunaikinti vartojami antibiotikai, bet ir kitos bakterijų rūšys.	Dėl plataus antibiotikų veikimo spektro atsparumą antibiotikams įgijusios įvairios bakterijų rūšys gali perduoti savo genus patogeninėms bakterijoms, tokiu būdu prisidedamos prie patogeniškų, antibiotikams atsparių bakterijų atsiradimo.
Naujų fagų atranka yra palyginti greitas procesas, dažnai trunkantis dienas ar savaites.  Preparatai yra santykinai pigūs.	Naujų antibiotikų sukūrimas (pvz., skirtų kovoti prieš antibiotikams atsparumą įgijusias bakterijas) yra daug lėšų ir laiko reikalaujantis procesas, dažnai trunkantis ištisus metus ar net dešimtmečius.	Evoliuciniai tyrimai patvirtina idėją, kad kartu su bakterijų evoliucija, kurios metu jos įgyja atsparumą antibiotikams ar fagams, tuo pačiu metu vyksta ir bakteriofagų evoliucija. Todėl fagams visiškai atsparių bakterinių kamienų atsiradimas yra gana mažai tikėtinas.

Bakteriofagai yra nepaprastai svarbūs ne tik kaip potenciali antimikrobinė priemonė, bet ir daugeliu kitų aspektų. Visų pirma jie yra viena iš pagrindinių mikroorganizmų evoliucijos varomųjų jėgų (Klimenko et al., 2016). Horizontali genų pernaša skatina prokariotų (bakterijų) genomų evoliuciją, kurios metu fagai geba integruotis į šeimininko genomą, o jų požymių išraiška sukelia fenotipinius pokyčius (Touchon et al., 2017). Bakteriofagai yra ypač svarbūs bakterijų populiacijų ir medžiagų biogeocheminių ciklų reguliacijoje (Parmar et al., 2017), taip pat jūrų ir vandenynų maistinių medžiagų apykaitoje (Ankrah et al., 2013). Bakteriofagai taip pat turėjo lemiamą reikšmę šiuolaikinių biomokslų atsiradime ir vystymėsi, pavyzdžiui biotechnologijoje (Harada et al., 2018). Bakteriofagai ar jų pagrindu sukurti produktai turi didžiulį potencialą įvairiose nanobiotechnologijose, taip pat nanobiomedicinos srityse (Sunderland et al., 2017; Harada et al., 2018).

### 1.3.1. Bakteriofagų praktinis taikymas augalininkystėje

Ieškant naujų, alternatyvių priemonių kovoje prieš patogenines, didžiulius nuostolius augalininkystės pramonėje sukeliančias bakterijas, buvo išskirti ir apibūdinti bakteriofagai prieš *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea agglomerans*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas arboricola* ir kitas patogenines augalų bakterijas. (Jones et al., 2012). Atlikti tyrimai parodė, kad fagai išskirti prieš *Pectobacterium carotovorum* subsp *atrosepticum*, slopina šio patogeno augimą ir neleidžia sukelti bulvių juodligės (Jones et al., 2012). Bakteriofagai taip pat naudojami prieš *Ralstonia solanacearum*, kuri sukelia pomidorų lapų vytulį (Fujiwara et al., 2011). Taip pat žinoma, kad bakteriofagų naudojimas gali visiškai panaikinti *Xanthomonas pruni* sukeliama dėmėtligę persikų sodinukų lapams (Jones et al., 2012) ar ženkliai sumažinti *Xylella fastidiosa* vynuogėms sukeltos Pierce'o ligos požymius (Das et al., 2015).

Nepaisant sėkmingo bakteriofagų praktinio taikymo prieš patogenines augalų bakterijas pavyzdžių ir tai, kad šie bakterijas infekuojantys virusai yra aplinkai nekenksminga ir perspektyvi priemonė bakterinėms ligoms kontroliuoti, vis dar išlieka eilė faktorių, lemiančių bakteriofagų naudojimo efektyvumą. Fagai gali daugintis tik tada, kai yra bakterinės ląstelės viduje, o jų dauginimosi ciklui įtakos gali turėti besikeičianti temperatūra, pH pokytis, druskų koncentracija ar UV spinduliuotė (Fister et al., 2016). Dėl šios priežasties viena iš galimybių efektyviai panaudoti bakteriofagus yra fagų išlaikymas lapų paviršiuje, naudojant pakankamas jų koncentracijas ar įterpiant juos į apsauginius nešiklius, kurie apsaugotų fagus nuo neigiamo aplinkos poveikio, bet nepaveiktų pačių fagų infekcinio efektyvumo (Balogh et al., 2003). Kita galimybė – tai fagų patekimas į augalą per šaknis. Eksperimentų metu įrodyta, kad bakteriofagai geba prasiskverbti pro šaknis ir po to patekti į įvairias augalo dalis naudojantis augalo ksilemos ir floemos audiniais. Pavyzdžiui, siekiant išsiaiškinti *E. amylovora* specifinių bakteriofagų įsiskverbimo ir translokacijos galimybes obelų augaluose ir įvertinti, ar fagai gali būti naudojami kaip priemonė apsisaugoti nuo šios bakterijos sukeltos ligos – bakterinės degligės, buvo atliekamas realaus laiko PGR (qPCR). Tyrimo rezultatai parodė, kad fagai gali prasiskverbti pro šaknis ir patekti į visas augalo dalis bei juose išlikti gyvybingi nuo 7 iki 14 dienų ir taip sumažinti patogeninių bakterijų dauginimąsi (Koložsváriné Nagy et. al., 2015). Kita vertus, nepalankios dirvožemio sąlygos, tokios kaip žemas pH ar adsorbcija dirvožemio dalelėms, gali žymiai sumažinti fagų skaičių šaknies zonoje, todėl siekiant padidinti fagų

veikimo efektyvumą reikia šarminti dirvožemį (Sykes et al., 1981), taip pat palaikyti reikiamą dirvožemio drėgmės lygį ir struktūrą (Buttimer et al., 2017).

Apibendrinus literatūroje pateikiamus duomenis apie praktinio bakteriofagų ar jų pagrindu sukurtų produktų taikymo galimybes kovoje prieš patogenines augalų bakterijas, galime teigti, kad tai yra perspektyvi, viena iš alternatyvių biokontrolės priemonių. Kita vertus, siekiant įgyvendinti šiuos tikslus, visų pirma reikalingas detalus bakteriofagų charakterizavimas, o dabartinės žinios apie *Pantoea* bakteriofagus vis dar išlieka itin menkos. Dėl šios priežasties, šio darbo metu buvo atliekami naujai identifikuotų *Pantoea* bakteriofagų tyrimai.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Bakteriofagai

Darbo metu naudoti bakteriofagai:

vB\_PagS\_MED16 (MED16) (accession number MK095605): *Pantoea agglomerans* BSL izoliatą infekuojantis bakteriofagas išskirtas iš medlievos uogų dr. Lidijos Truncaitės.

vB\_PagS\_AAS23 (AAS23) (accession number MK095606): *Pantoea agglomerans* AUR izoliatą infekuojantis bakteriofagas išskirtas iš medlievos uogų dr. Lidijos Truncaitės.

vB\_PagS\_AAS21 (AAS21) (accession number MK770119): *Pantoea agglomerans* AUR izoliatą infekuojantis bakteriofagas išskirtas iš medlievos uogų dr. Lidijos Truncaitės.

vB\_PagM\_LIET2 (LIET2) (accession number MK388689): *Pantoea agglomerans* DDM izoliatą infekuojantis bakteriofagas išskirtas iš medlievos uogų dr. Lidijos Truncaitės.

Visi darbo metu naudotų bakteriofagų genomai yra anotuoti ir pakelbti NCBI GenBank duomenų bazėje.

#### 2.1.2. Bakterijų kamienai

**3 lentelė.** Darbe naudoti bakterijų kamienai.

Kamienas	Naudojimo tikslas	Šaltinis
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedelienė
<i>Citrobacter freundii</i>	Šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedelienė
<i>Erwinia billingiae</i> 17872	Šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Erwinia carotovora</i> 8982	Šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedelienė

<i>Erwinia carotovora</i> 961-63	Šeiminių nustatymas	spekto	Prof. E. Sužiedelienė
<i>Erwinia piriflorinigra</i> 26166	Šeiminių nustatymas	spekto	DSMZ
<i>Escherichia coli</i> B <sup>E</sup>	Šeiminių nustatymas	spekto	Dr. L. W. Black
<i>Escherichia coli</i> BL21-	Šeiminių nustatymas	spekto	Novagen
<i>Escherichia coli</i> BW25113	Šeiminių nustatymas	spekto	Dr. P. Hyman
<i>Escherichia coli</i> B40	Šeiminių nustatymas	spekto	Dr. L. W. Black
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Šeiminių nustatymas	spekto	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> MG1655	Šeiminių nustatymas	spekto	Prof. E. Sužiedelienė
<i>Escherichia coli</i> MH1	Šeiminių nustatymas	spekto	Dr. K. N. Kreuzer
<i>Klebsiella</i> sp. KV-3	Šeiminių nustatymas	spekto	Šimoliūnas et al., 2013
<i>Pantoea agglomerans</i> ARC (gamtinis izoliatas)	Šeiminių nustatymas	spekto	Šimoliūnas et al., 2018
<i>Pantoea agglomerans</i> AUR (gamtinis izoliatas)	Šeiminių nustatymas, dauginimas, jautrumo fiziniams ir cheminiams veiksniams nustatymas, infekcinio efektyvumo ir adsorbcijos eksperimentai	spekto	Šimoliūnas et al., 2018
<i>Pantoea agglomerans</i> BSL (gamtinis izoliatas)	Šeiminių nustatymas, dauginimas, jautrumo fiziniams ir cheminiams veiksniams	spekto	Šimoliūnas et al., 2018

	nustatymas, infekcinio efektyvumo ir adsorbcijos eksperimentai	
<i>Pantoea agglomerans</i> DDM (gamtinis izoliatas)	Šeimininkų spektro nustatymas, dauginimas, jautrumo fiziniams ir cheminiams veiksniams nustatymas, infekcinio efektyvumo ir adsorbcijos eksperimentai	Šimoliūnas et al., 2018
<i>Pantoea agglomerans</i> MMG (gamtinis izoliatas)	Šeimininkų spektro nustatymas	Šimoliūnas et al., 2018
<i>Pantoea agglomerans</i> SER (gamtinis izoliatas)	Šeimininkų spektro nustatymas	Šimoliūnas et al., 2018
<i>Pantoea agglomerans</i> 3493	Šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Pantoea conspicua</i> 24241	Šeimininkų spektro nustatymas	DSMZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedelienė
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium 292	Šeimininkų spektro nustatymas	Prof. E. Sužiedelienė

### 2.1.3. Terpės ir tirpalai

#### Terpės

LB terpė: bakto-triptonas 10 g, bakto-mielių ekstraktas 5 g, NaCl 10 g, NaOH 1 N 0,2 mL, vanduo – iki 1 L.

Agarizuota LB terpė: bakto-triptonas 10 g, bakto-mielių ekstraktas 5 g, NaCl 10 g, agaras 12 g, NaOH 1 N 0,2 mL, vanduo – iki 1 L.

Minkštas LB agaras (0,5%): bakto-triptonas 0,75 g, bakto-mielių ekstraktas 0,37 g, NaCl 0,75 g, NaOH 1 N 0,15 mL, agaras 0,375 g, vanduo – iki 75 mL.

## **Tirpalai**

PB (praskiedimo buferis):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 7 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3 g, NaCl – 4 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2 g, vandens – iki 1 L.

Bakteriofagų dializės buferinis tirpalas I: 3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5).

Bakteriofagų dializės buferinis tirpalas II: 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5).

Bakteriofagų dializės buferinis tirpalas SM: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 8 mM  $\text{MgSO}_4$ .

TE buferis: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA.

### **2.1.4. Reagentai**

Darbe naudoti reagentai: agarozė, chloroformas, etanolis, etidžio bromidas, fenolis, natrio chloridas, cezio chloridas.

Naudoti Thermo Fisher Scientific restrikcijos endonukleazės: NdeI, DraI, Bsu15I, HhaI, Csp6I, MboI, EcoRII, EcoRV.

### **2.1.5. Prietaisai**

Darbo metu naudoti prietaisai: vandeninė purtyklė *OLS 200* (Grant), orinė purtyklė *KS 4000 ic control* (IKA), centrifuga *Centrifuge 5804 R* ir *Centrifuge 5424* (Eppendorf) bei ultracentrifuga *Beckman* (rotorius SW40), PGR cikleris *Mastercycler gradient* (Eppendorf), spektrofotometras *BioPhotometer* (Eppendorf), šildoma mėgintuvėlių purtyklė *Thermomixer compact* (Eppendorf), maišyklė *Mixer 5432* (Eppendorf), mikrobiologinis inkubatorius *BD115* (BINDER), elektroforezės srovės šaltinis *EV231* (Consort), laminarinis boksas *Biowizard Standard Std-130* (Kojair), mėgintuvėlių šildytuvas *Tb2 Thermoblock* (Biometra), UV transliuminatorius *UVT-28 ME* (Herolab), autoklavas (Raypa).

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Bakterinių ląstelių auginimas

Bakterinių ląstelių kultūros buvo auginamos LB terpėje 27 °C temperatūroje iki ląstelių suspensijos optinis tankis (OD<sub>600</sub>) pasiekia 0,5–0,6. Užaugusi bakterijų kultūra naudota bakteriofagų izoliavimui, dauginimui, titravimui, ląstelių šeimininkų spektro nustatymo, infekcinio efektyvumo, adsorbcijos eksperimentams.

### 2.2.2. Bakteriofagų dauginimas ir titro nustatymas

Bakteriofagai buvo dauginami ir titruojami taikant Adams ir kolegų pasiūlytą dvisluoksnio agarą metodiką (Adams et al., 1959) su tam tikromis modifikacijomis.

#### *Bakteriofagų dauginimas skystoje LB terpėje*

*Pantoea agglomerans* atitinkamos ląstelių kultūros kiekvienam bakteriofagai (BSL - MED16; AUR - AAS23, AAS21; DDM - LIET2) užsėjamos į 10 mL LB terpės ir auginama purtyklėje 27 °C temperatūroje, kol OD<sub>600</sub> pasiekia ~ 0,5. Tuomet bakterijų kultūra yra infekuojama vienos fago lizės zonos suspensijos turiniu (šviežia fagų lizės zona, suspenduota 10 µL LB terpės) ir toliau auginama iki pilnos lizės (kol kultūra tampa skaidri). Ši kultūra yra centrifuguojama 11000 × g 1 val. 10 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas ir nuosėdos užpilamos 1 mL PB, pridedama 1/10 dalis CHCl<sub>3</sub> ir 2 µL DNazės I (1 u/µL). Mišinys suspenduojamas ir inkubuojamas mažiausiai 30 min. 37 °C temperatūroje. Suspensija supilama į naują mėgintuvėlį ir centrifuguojama 2500 × g 8 min. Supernatantas, kuriame yra išdauginti fagai, nusiurbiamas ir laikomas 4 °C.

#### *Bakteriofagų dauginimas pusiau agarizuotoje LB terpėje (dvisluoksnio agarą metodu)*

Dvisluoksnio agarą metodu (Adams et al., 1959) dauginti *Pantoea agglomerans* izoliatus infekuojantis bakteriofagai: MED16, AAS23, AAS21, LIET2. Bakteriofagų titravimui naudoti atitinkamai *Pantoea agglomerans* BSL, AUR, DDM kamienai. Nuo lėkštelių nugrandomas viršutinis minkšto agarą sluoksnis ir užpilamas LB terpe ar PB buferiu (2 mL vienai lėkštelei). Gauta suspensija inkubuojama 2–3 val. 8 °C temperatūroje ir centrifuguojama 6000 × g 15 min., 4 °C temperatūroje. Supernatantas surenkamas, pakartotinai centrifuguojamas tomis pačiomis sąlygomis, filtruojamas per 0,45 µm membraninius filtrus ir laikomas 4 °C.



Bakteriofagų titrui nustatyti, į 3 mL 51 °C 0,3–0,5% minkštos agarizuotos LB terpės dedama 0,5 mL *Pantoea agglomerans* kultūros (užaugintos LB terpėje iki OD<sub>600</sub> ~0,6) ir 100 µL arba 200 µL skirtingų skiedimų fagų suspensijos. Viskas gerai išmaišoma ir paskleidžiama ant agarizuotos LB terpės paviršiaus Petri lėkštelėje. Lėkštelės inkubuojamos fago augimui optimalioje temperatūroje 18–20 val. Titrą apskaičiuojamas nustatčius fagų infekcinių centrų skaičių viršutiniame agarizuotame bakterijų sluoksnyje ir įvertinus praskiedimą.

### **2.2.3. Bakteriofagų gryninimas centrifuguojant cezio chlorido gradientu**

Bakteriofagai buvo gryninami naudojant cezio chlorido gradientą pagal Sambrook ir kitų metodiką (Sambrook et al., 2001) su modifikacijomis. Koncentruotų fagų suspensija užnešama ant paruošto tirpalo (su 0,9, 0,7 ir 0,5 g/mL cezio chlorido gradientu) viršutinio sluoksnio ultracentrifuginiuose mėgintuvėliuose ir centrifuguojama 2 val. 4 °C temperatūroje, 24000 × g greičiu (centrifuga „Beckman“, rotorius SW40). Tirpale fagų formuojama šviesą barstanti juosta surenkama švirkštu ir dializuojama buferiniuose tirpaluose su skirtinga druskų koncentracija 4 °C temperatūroje. Pradžioje 30 min. dializuojama buferyje I, vėliau du kartus – buferyje II. Galiausiai fagų suspensija dializuojama 2–18 val. SM buferyje. Po dializės įvertinamas išgrynintų fagų suspensijos titras ir bakteriofagai naudojami tolimesniems darbams.

### **2.2.4. Preparatų paruošimas TEM analizei**

Cezio chlorido gradientu išgrynintų bakteriofagų suspensija praskiedžiama iki ~10<sup>11</sup> PFU/ml koncentracijos ir užnešama po 5–10 µl pavyzdžio ant varinių arba nikelinių (Agar Scientific) tinklelių. Po 2–5 min. skystis nusauginamas filtriniu popieriumi, preparatai dažomi ant tinklelio užnešant 10 µl 2 % uranilo acetato (pH 4,5) tirpalo. Po 2–5 min. skystis nusauginamas filtriniu popieriumi ir paruošti preparatai stebimi transmisiniu elektroniniu mikroskopu. Transmisinė elektroninė mikroskopija (TEM) buvo atliekama Fizinių ir technologijos mokslų centre naudojant Tecnai G2 F20 X-TWIN transmisinį elektroninį mikroskopą.

### **2.2.5. Genominės DNR išskyrimas**

Bakteriofagų genominė DNR buvo skirta naudojant fenolio-chloroformo metodą. Atsižvelgiant į fago titrą, išdauginto fago suspensija praskiedžiama iki ~1·10<sup>11</sup> fagų/mL ir

paimama 200 µl fagų suspensijos. Tuomet imamas lygus tūris TE buferiu prisotinto fenolio (pH 8) ir viskas gerai sumaišoma. Centrifuguojama 7000 × g 5 min. ir viršutinė frakcija atsargiai nusiurbama į naują mėgintuvėlį. Į šią frakciją pridedamas lygus tūris fenolio ir chloroformo mišinio (1:1). Viskas gerai sumaišoma, centrifuguojama 7000 × g 5 min. ir viršutinė frakcija kuo švariau nusiurbama į naują mėgintuvėlį. Procedūra kartojama 2 kartus. Vėl nusiurbama viršutinė frakcija ir pridedamas lygus chloroformo tūris. Gerai išmaišoma ir centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Paskutinį kartą švariai nusiurbus į suspensiją įpilama 2,5 tūrio (500 µL) šalto etanolio ir 1/10 tūrio (20 µL) 5 M natrio chlorido, mišinys atsargiai spenduojamas ir paliekamas bent porai valandų šaltai (-20 °C), kad išsėstų DNR. Suspensija centrifuguojama 11000 × g 15 min. 4 °C temperatūroje, supernatantas nupilamas ir nuosėdos džiovinamos 5-10 min. Užpilama apie 50 µL vandens be nukleazių ir bent 30 min. inkubuojama purtyklėje (*Thermomixer compact* (Eppendorf)) 37 °C temperatūroje, kad nuosėdos ištirptų ir pasidarytų DNR suspensija.

### **2.2.6. Fagų genominės DNR restrikinė analizė**

Siekiant išsiaiškinti, ar DNR yra modifikuota ir kokios yra modifikacijos, dažniausiai naudojami restrikcijos endonukleazių fermentai, kurie atpažįsta konkrečią seką DNR grandinėje. Fagų genominės DNR buvo karpomos su 8-iais skirtingą jautrumą DNR metilnimui turinčiais fermentais: MboI, EcoRII, HhaI, Bsu15I, Csp6I, EcoRV, DraI, NdeI. Bendras reakcijos tūris – 10 µL: 4 µ restriktuojamos gDNR, 1,5 µL 10× specifinio restriktazės buferio, 1,5 µl reikiamos restriktazės ir 3 µl vandens be nukleazių. Mišinys inkubuojamas 2 val. 37 °C temperatūroje. Siekiant įvertinti restriktazių įtaką tiriamajai genominei DNR, atliekama restrikcijos mišinio elektroforezė agaroziniame gelyje.

### **2.2.7. Bakteriofagų ląstelių šeimininkų spektro nustatymas**

Bakteriofagų ląstelių šeimininkų spektras buvo nustatomas atliekant bakteriofagų titravimo arba lašinimo testus ant bakterijų kamienų, kurie pateikiami 3 lentelėje. Lašinimo testų metu 500 µl bakterijų kultūros (OD<sub>600</sub> ~ 0,5–0,6) buvo sumaišoma su 3 ml išlydytos pusiau skystos 0,3-0,5% agarizuotos LB terpės, mišinys gerai sumaišomas ir greitai paskleidžiamas Petri lėkštelėje ant joje esančios agarizuotos LB terpės. Ant susipolimerizavusio ir dalinai pradžiūvusio viršutinio agaro sluoksnio su pusiau skysta agarizuota LB terpe ir bakterijų kultūra

lašinama bakteriofagų suspensija. Lėkštelės inkubuojamos 12–16 val. optimaliomis fagų vystymosi sąlygomis.

### **2.2.8. Bakteriofagų infekcinio efektyvumo ir adsorbcijos eksperimentai**

Bakteriofagų infekcinio efektyvumo (*angl.* efficiency of plating) įvertinimas buvo atliekamas pagal Kalinienės ir kitų aprašytą metodiką (Kalinienė et al., 2010), titruojant bakteriofagų suspensiją su ląstelėmis šeimininkėmis ir inkubuojant lėkšteles skirtingose temperatūrose (4–50 °C) nuo 12 val. iki 4 parų. Suskaičiavus infekcinių centrų skaičių, taip pat įvertinus jų dydį bei morfologiją, nustatoma optimali fagų vystymosi temperatūra.

Bakteriofagų adsorbcijos prie ląstelės šeimininkės eksperimentai buvo atliekami pagal Kropinski aprašytą metodiką (Kropinski et al., 2009). Bakterinės ląstelės auginamos iki OD<sub>600</sub> pasiekia 0,5. Tada jos sumaišomos su bakteriofagų suspensija, kad MOI būtų 10 ir inkubuojamos purtyklėje (110 rpm) 27 °C temperatūroje iki 1 valandos. Tam tikrais laiko intervalais imama 100 μl mėginio. Mėginys įdedamas į ledą, tada centrifuguojamas 6000 × g 2 min. ir atliekami skiedimai LB terpėje. Adsorbcijos efektyvumas nustatomas atliekant bakteriofagų titravimą dvigubo agarų metodu.

### **2.2.9. Bakteriofagų atsparumo chloroformui ir inaktyvacijos temperatūros nustatymo eksperimentai**

Bakteriofagų atsparumo chloroformui nustatymas yra reikalingas dėl galimybės gryninimo metu naudoti chloroformą, kuris pašalina bakterines priemaišas bei jų laikymo chloroforme po gryninimo etapų. Atsparumo nustatymas buvo atliekamas naudojant fago suspensiją ir chloroformą santykiu (1:1). Mėginiai imami tam tikrais laiko intervalais ir centrifuguojami 4000 × g 4 min. Tuomet atliekami skiedimai naudojant LB terpę arba praskiedimo buferį (PB). Atsparumas nustatomas išlašinant atitinkamus fago skiedimus ant susipolimerizavusio ir dalinai pradžiūvusio viršutinio agarų sluoksnio su pusiau skysta agarizuota LB terpe ir bakterijų kultūra.

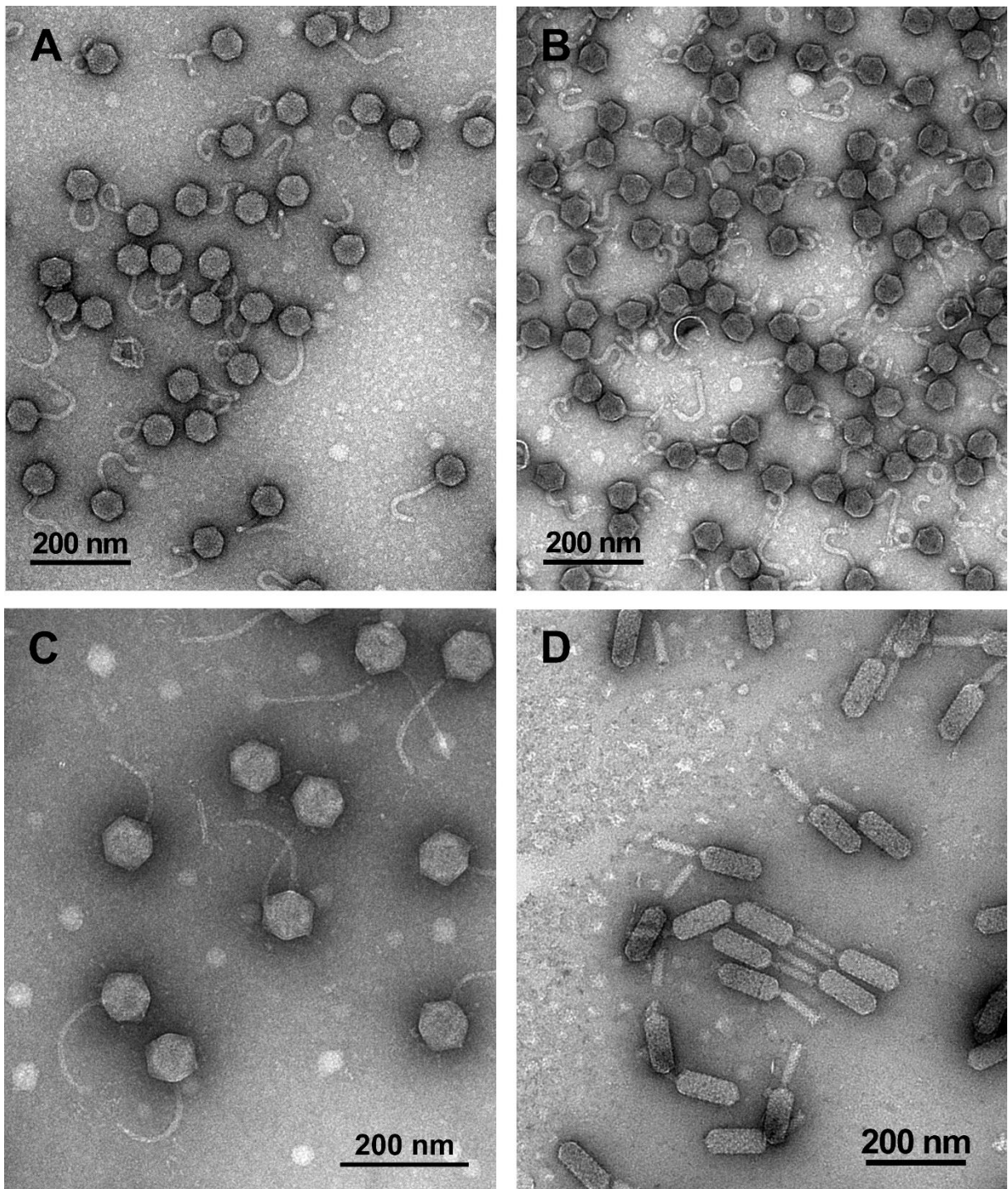
Inaktyvacijos temperatūra nustatoma praskiestą fago suspensiją  $\sim 1 \cdot 10^9$  fagų/mL laikant atitinkamoje temperatūroje (37 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C ir 70 °C) ir imant mėginius (po 20 μl) atitinkamais laiko momentais. Po mėginio paėmimo jis laikomas 5 min. lede ir atliekami skiedimai TE buferyje. Inaktyvacijos temperatūra nustatoma išlašinant atitinkamus fago skiedimus ant pradžiūvusio viršutinio agarų sluoksnio su pusiau skysta agarizuota LB terpe ir bakterijų kultūra.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Pastaruoju metu didėjantis bakterijų atsparumas antibiotikams verčia ieškoti naujų, alternatyvių priemonių problemos sprendimui. Vienas jų – bakteriofagų ar jų pagrindu sukurtų produktų panaudojimas (Moye et al., 2018). Vis dėlto, nepaisant to, kad *Pantoea* genties bakterijos yra žinomos ne tik kaip itin svarbūs augalų epifitai ar endofitai, bet ir gali būti susijusios su įvairiomis vabzdžių, žmonių, taip pat augalų ligomis, informacijos kiekis apie jas infekuojančius bakteriofagus vis dar išlieka itin ribotas (Adriaenssens et al., 2011; Šimoliūnienė et al., 2020). Siekiant bent iš dalies pakeisti esamą situaciją ir įgyti mokslinių žinių, kurios ne tik galėtų būti naudingos ateityje siekiant praktiškai taikyti bakteriofagus ar jų produktus kaip biokontrolės priemonę, bet ir apskritai suteikti mokslinės informacijos apie šiuos iki šiol mažai tirtus bakterijų virusus, šio darbo tikslas buvo charakterizuoti naujus *Pantoea* genties bakterijas infekuojančių bakteriofagus. Tikslui pasiekti buvo atlikti fagų morfologijos, fiziologijos, šeimininkų spektro tyrimai, taip pat įvertintas jautrumas chloroformui, nustatytas adsorbcijos efektyvumas, inaktyvacijos temperatūra bei atlikta fagų genomines DNR restrikcinė analizė.

#### 3.1. Bakteriofagų morfologija

Vienas esminių kriterijų siekiant charakterizuoti ir klasifikuoti uodeguotuosius bakteriofagus (eilė *Caudovirales*) – jų morfologinė analizė, o būtent uodegėlės tipas leidžia priskirti šiuos bakterijų virusus atitinkamai šeimai (Nobrega et al., 2018). Dėl šios priežasties, šio darbo metu charakterizuojant fagus MED16, AAS23, LIET2 ir AAS21 pirmiausia buvo atlikta fagų virionų TEM analizė, jos metu nustatyti fagų virionų morfologiniai parametrai (4 pav.).



**4 pav.** Bakteriofagų virionų TEM nuotraukos: A – AAS23; B – MED16; C – AAS21; D – LIET2.

TEM analizės metu buvo nustatyta, kad bakteriofagai AAS23 (4 pav. A), MED16 (4 pav. B) ir AAS21 (4 pav. C) priklauso *Siphoviridae* šeimai, o LIET2 (4 pav. D) priklauso *Myoviridae* šeimai. MED16 bakteriofago (4 pav. B) galvutės skersmuo yra  $64 \pm 3,2$  nm, o lanksti nesusitraukianti uodegėlė yra  $145 \pm 9,8$  nm ilgio. AAS23 bakteriofago (4 pav. A) galvutės skersmuo yra  $66,7 \pm 3,1$  nm, o lanksti nesusitraukianti uodegėlė yra  $146 \pm 8,9$  nm ilgio. TEM analizė parodė, kad šie du fagai morfologiškai yra labai panašūs. Bakteriofago AAS21 (4 pav.

C) galvutės skersmuo yra  $88,6 \pm 4,1$  nm, lanksti nesusitraukianti uodegėlė yra  $193,2 \pm 6,1$  nm ilgio. Bakteriofago LIET2 (4 pav. D) galvutės ilgis yra  $114,9 \pm 9,6$  nm, plotis  $44,6 \pm 5,4$  nm, o nelanksti, susitraukianti uodegėlė yra  $87,8 \pm 9,2$  nm ilgio.

Remiantis TEM analizės (taip pat ir genomo sekoskaitos) rezultatais, buvo nustatyta, kad bakteriofagas AAS21 šiuo metu yra didžiausias žinomas ir mokslinėje spaudoje paskelbtas *Pantoea* bakterijas infekuojantis sifovirusas (Šimoliūnienė et al., 2020). Tuo tarpu bakteriofagas LIET2 morfologiniu požiūriu yra įdomus tuo, kad turi daugeliui bakteriofagų mažiau būdingą, iššęsto ikosaedro formos galvutę (dažniausiai miovirusai turi taisyklingo ikosaedro formos galvutę), o iššęsto ikosaedro formos galvutės būdingos, pavyzdžiui, „T4 tipo virusams“ (Lavigne et al., 2009).

### **3.2. Bakteriofagų fiziologija**

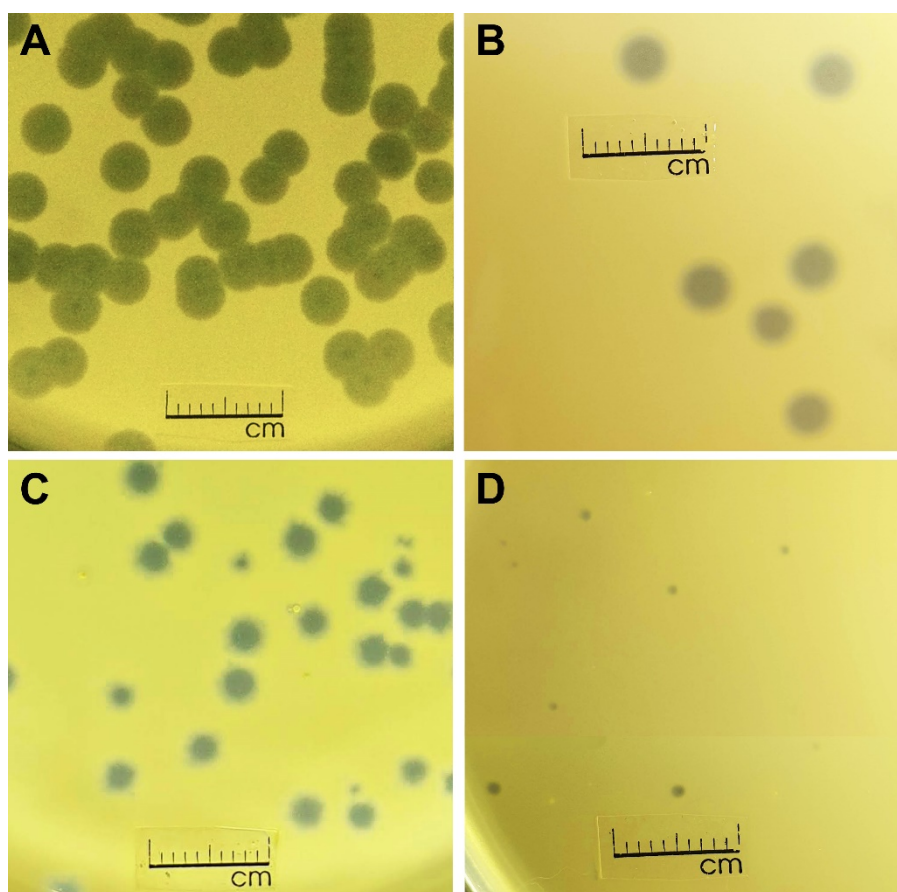
Charakterizuojant bakteriofagus taip pat svarbu žinoti jų fiziologiją: infekcinį efektyvumą, infekcinių centrų struktūrą, šeimininkų spektrą ir adsorbcijos galimybes. Tirdami bakteriofagų fiziologiją sužinome apie jų galimybes panaudojimui įvairiose srityse. Tai gali būti vienas iš svarbių aspektų, leidžiančių panaudoti ne vieną bakteriofagą, o kurti fagų kokteilius, pavyzdžiui, prieš bakterijų sukeltas augalų ligas ar kovojant su maiste esančiais patogenais.

#### **3.2.1. Infekcinis efektyvumas**

Kiekvienas bakteriofagas turi savo optimalią augimo temperatūrą, taip pat jam būdingą temperatūrinį augimo intervalą. Šių fiziologinių charakteristikų nustatymas yra svarbus ne tik gilinant mokslines žinias apie bakteriofagus, bet ir siekiant panaudoti bakteriofagus ar jų produktus praktiniais tikslais, pavyzdžiui kaip biokontrolės priemonę. Remiantis literatūros duomenimis, nustatyta, kad fagų infekciniam efektyvumui yra svarbi ne tik ląstelių auginimo temperatūra po infekcijos bakteriofagais, bet ir prieš bakteriofagų infekciją (Sanders ir Klenhammer, 1984; Tokman et al., 2016).

Šio darbo metu buvo tiriamas bakteriofagų infekcinis efektyvumas temperatūros ribose nuo  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  iki  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nustatyta, kad MED16 ir LIET2 formuoja infekcinius centrus esant  $4\text{--}36\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrai, tačiau fago MED16 optimali vystymosi temperatūra yra  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tuo tarpu LIET2 –  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bakteriofagai AAS23 ir AAS21 formuoja infekcinius centrus esant  $4\text{--}32\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrai, abiejų fagų optimali vystymosi temperatūra yra  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

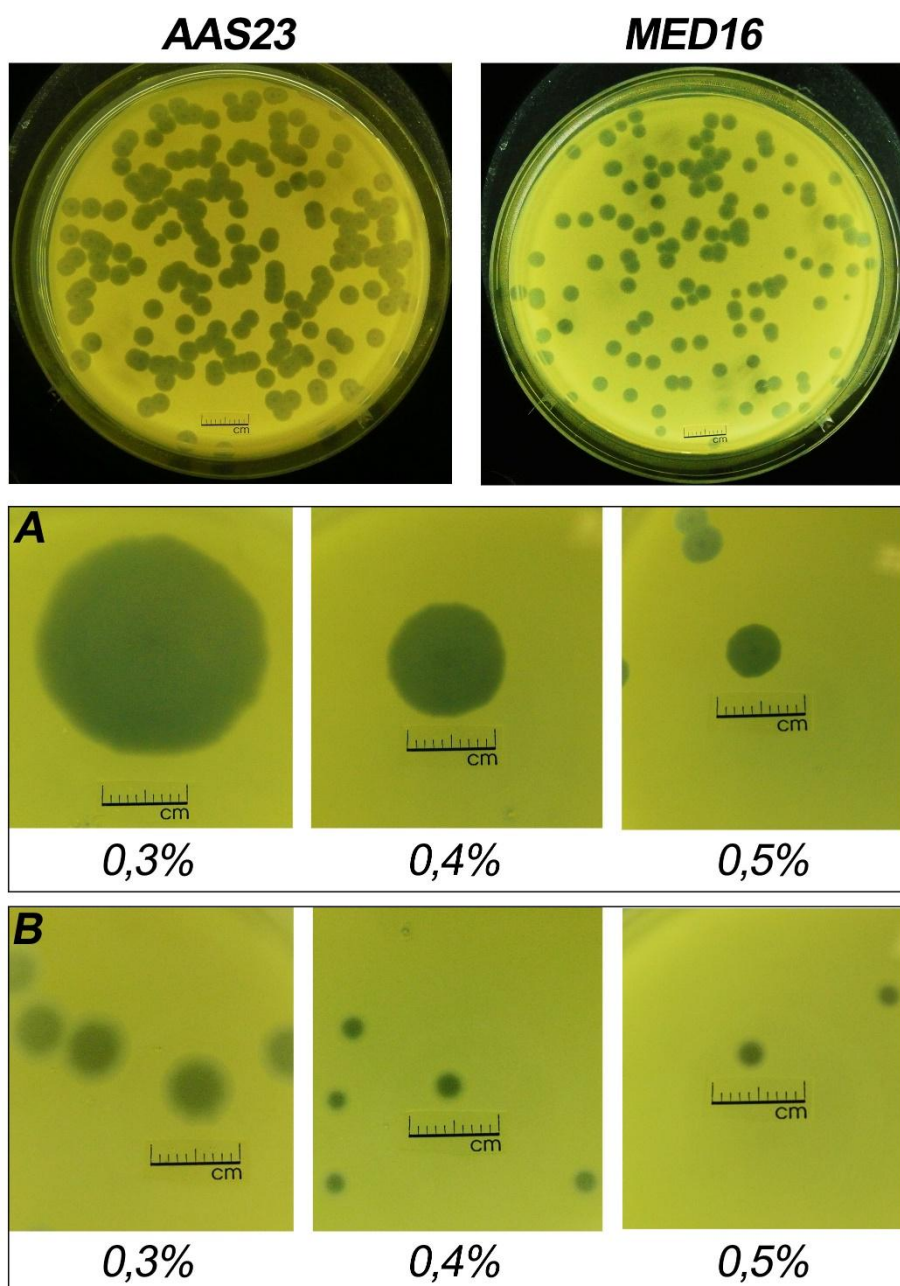
Norint nustatyti infekcinių centrų morfologiją fagai buvo titruojami naudojant standartinį 0,5 % viršutinio agaro sluoksnį ir inkubuojami 24 valandas optimaliose jų vystymosi temperatūrose: MED16 – 30 °C, o AAS23, LIET2 ir AAS21 – 22 °C. Nustatyta, kad bakteriofagų MED16 formuojamiems infekciniams centrams (5 pav. B) būdinga nedidelė skaidri centrinė dalis (iki 0,3 mm skersmens), apsupta aiškiai įžiūrimos neskaidrios zonos, kurios skersmuo siekia iki 2,5 mm. Bakteriofagai AAS23 taip pat formuoja infekcinius centrus (5 pav. A) su nedidele skaidria centrine dalimi (iki 0,4 mm skersmens), ji taip pat apsupta aiškiai įžiūrimos neskaidrios zonos, tačiau jos skersmuo siekia net iki iki 3,5 mm. Tuo tarpu bakteriofagų AAS21 (5 pav. C) ir LIET2 (5 pav. D) formuojami infekciniai centrai skaidrūs, neturintys neskaidrių juos supančių zonų, o jų diametrai siekia atitinkamai 2,8 mm ir 0,65 mm. Bakteriofagų formuojamų infekcinių centrų nuotraukos pateikiamos 5 paveiksle.



**5 pav.** Bakteriofagų infekcinių centrų struktūra: A – AAS23; B – MED16; C – AAS21; D – LIET2).

Siekiant nustatyti bakteriofagų formuojamų infekcinių centrų morfologijos priklausomybę ne tik nuo temperatūros, bet ir viršutinio agaro koncentracijos, buvo atlikti

eksperimentai, kurių metu naudotos skirtingos agarų koncentracijos (0,5%, 0,4% ir 0,3%). Eksperimentai atlikti su neskaidrias periferines zonas formuojančiais bakteriofagais AAS23 ir MED16, darbų rezultatai pateikiami 6 paveiksle.



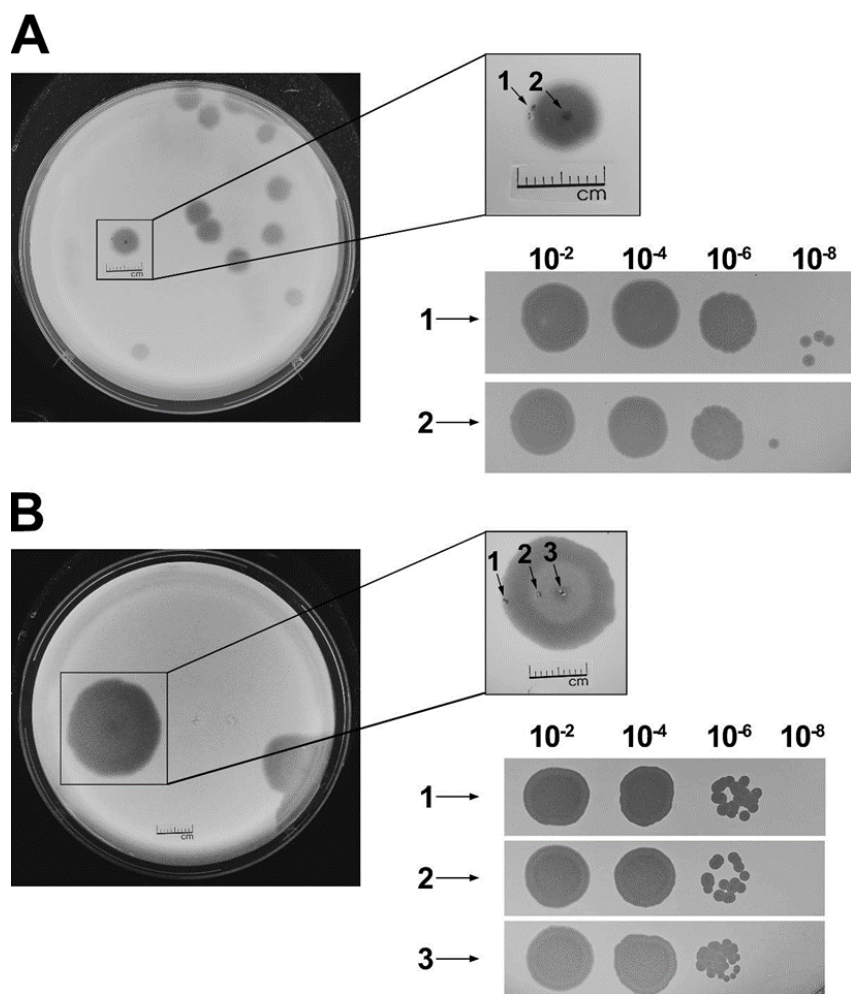
**6 pav.** Bakteriofagų AAS23 ir MED16 formuojamų infekcinių centrų priklausomybė nuo viršutinio agarų koncentracijos: A – AAS23; B – MED16; Nuotraukos viršutinėje dalyje pateikiami bakteriofagų formuojami infekciniai centrai esant standartinei (0,5 %) viršutinio agarų koncentracijai.

Nustatyta, kad bakteriofagų AAS23 ir MED16 formuojamų infekcinių centrų skaidrių zonų dydžiui viršutinė agarų koncentracija įtakos neturėjo, tačiau neskaidrios periferinės zonos



diametras mažinant viršutinio agaro koncentraciją ženkliai didėja. Sumažinus viršutinio agaro koncentraciją iki 0,3%, neskaidrios periferinės zonos diametras MED16 atveju siekia iki 6,4 mm, o AAS23 atveju – net iki 2,83 cm (6 pav.).

Remiantis literatūros duomenimis, bakteriofagų infekcinių centrų periferinės neskaidrios zonos susidaro dėl bakteriofagų koduojamų hidrolizinių fermentų, apibendrintai vadinamų depolimerazėmis, kadangi jie gali skaidyti bakterijų formuojamas polimerines medžiagas (Pires et al., 2016). Šios medžiagos gali būti randamos bakterijų ląstelių paviršiuje (polisacharidai) arba jas gamina bakterijos formuodamos biofilmus. Taigi bakteriofagai, kurie turi depolimerazinį aktyvumą, palengvina savo prieigą prie šeimininko receptorių, todėl, kaip biokontrolės įrankiai, turi pranašumą lyginant su bakteriofagais, neturinčiais depolimerazinio aktyvumo (Chan ir Abedon, 2014; Pires et al., 2016). Įdomu tai, kad bakteriofagų formuojamų neskaidrių periferinių zonų susidarymas gali būti siejamas tiek su pačių bakteriofagų, tiek tik su jų koduojamų depolimeraziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų aptikimu šiose zonose, kadangi fermentai yra mažos dalelės, galinčios lengvai difunduoti pusiau kietoje terpėje, ko negali padaryti fagų virionai (Pires et al., 2016; Abedon 2018; Šimoliūnas et al., 2018).



**7 pav.** Bakteriofagų formuojamų infekcinių centrų analizė: A – MED16; B – AAS23. Eksperimentams naudota 0,3% viršutinio agaro koncentracija. Fagų mėginių paėmimo vietas pažymėtos rodyklėmis. Siekiant nustatyti surinktuose mėginiuose esančių infektyvių virionų kiekį, buvo atliekami lašinimo eksperimentai, kurių rezultatai pateikiami dešinėje pusėje esančiose nuotraukose.

Siekiant nustatyti, ar mūsų tiriamų bakteriofagų formuojamų infekcinių centrų periferinėse zonose gali būti aptinkami ir infektyvūs bakteriofagai, buvo atlikti eksperimentai, kurių metu buvo imami mėginiai iš skirtingų infekcinių centrų zonų ir tiriamas juose potencialiai esančių infektyvių bakteriofagų kiekis. Šių eksperimentų nuotraukos pateikiamos 7 paveiksle. Nustatyta, kad tiek MED16 (7 pav. A), tiek AAS23 (7pav. B) atveju, bakteriofagų formuojamų infekcinių centrų periferinėse dalyse yra aptinkami infektyvūs bakteriofagai. Dar daugiau, jų kiekis centrinėse ir periferinėse dalyse iš esmės nesiskyrė, todėl tai yra įdomus objektas tolimesniems eksperimentams, kurių metu būtų galima tirti šių fagų kinetines ir depolimerazinio aktyvumo savybes.

### 3.2.3. Šeimininkų spektras

Šeimininkų spektras yra viena iš esminių savybių siekiant nustatyti, prieš kokias bakterijų rūšis ar kamienus gali būti naudojami mūsų pasirinkti bakteriofagai. Viena vertus, fagų terapijoje itin paklausūs platų infekuojamų ląstelių-šeimininkų spektrą turintys bakteriofagai (galimybė pritaikyti fagus kovoje prieš daugelį potencialiai žalingų bakterijų) (Ross et al., 2016). Kita vertus, kai kuriais atvejais fagų specifiškumas taip pat yra itin svarbus. Pavyzdžiui, platų šeimininkų spektrą infekuojantys bakteriofagai, tikėtina, gali infekuoti ir nepatogenines normalios žmogaus žarnyno mikrofloros bakterijas (jei taikant fagų terapiją fagai bus administruojami į virškinamąjį traktą), o tai savo ruožtu gali susilpninti veiksmingą fago susitelkimą prie tikslinių bakterijų (Łusiak-Szelachowska et al., 2017; Kasman ir Porter, 2019; Sausset et al., 2020).

Šio darbo metu atliekant bakteriofagų šeimininkų spektro nustatymą visų pirma buvo vykdomi lašavimo testai, o nustačius, kad bakterijų kamienas yra imlus tiriamajam bakteriofagui, toliau buvo atliekami ir titravimo testai. Iš viso patikrinti 24 bakterijų kamienai įskaitant aštuonis *Pantoea* kamienus (šeši gamtiniai izoliatai ir du kamienai iš DSMZ kolekcijos) ir tris *Erwinia* kamienus. Visas bakteriofagų šeimininkų spektro nustatymui naudotų bakterijų kamienų sąrašas ir imlumas fagams pateikiamas 4 lentelėje.

**4 lentelė.** Bakteriofagų ląstelių-šeimininkų spektro nustatymui naudoti bakterijų kamienai ir jų imlumas fagams.

Kamienas	Bakteriofagas			
	MED16	AAS23	LIET2	AAS21
<i>Pantoea agglomerans</i> (gamtiniai izoliatai)				
MMG	-	-	-	-
SER	-	-	-	+
AUR	-	+	-	+
ARC	-	-	-	-
BSL	+	-	+	+
DDM	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> (laboratoriniai kamienai)				
BL21-	-	-	-	-

B40	-	-	-	-
BE	-	-	-	-
MG1655	-	-	-	-
BW25113	-	-	-	-
DH10B	-	-	-	-
MH1	-	-	-	-
Kiti kamienai				
<i>Klebsiella</i> sp. KV-3	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium 292	-	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> 8982	-	-	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> 961-63	-	-	-	-
DSMZ kolekcijos kamienai				
<i>Pantoea agglomerans</i> 3493	-	-	-	+
<i>Pantoea conspicua</i> 24241	-	-	-	-
<i>Erwinia piriflorinigrans</i> 26166	-	-	-	-
<i>Erwinia billingiae</i> 17872	-	-	-	-

+ kamienas yra jautrus fago infekcijai

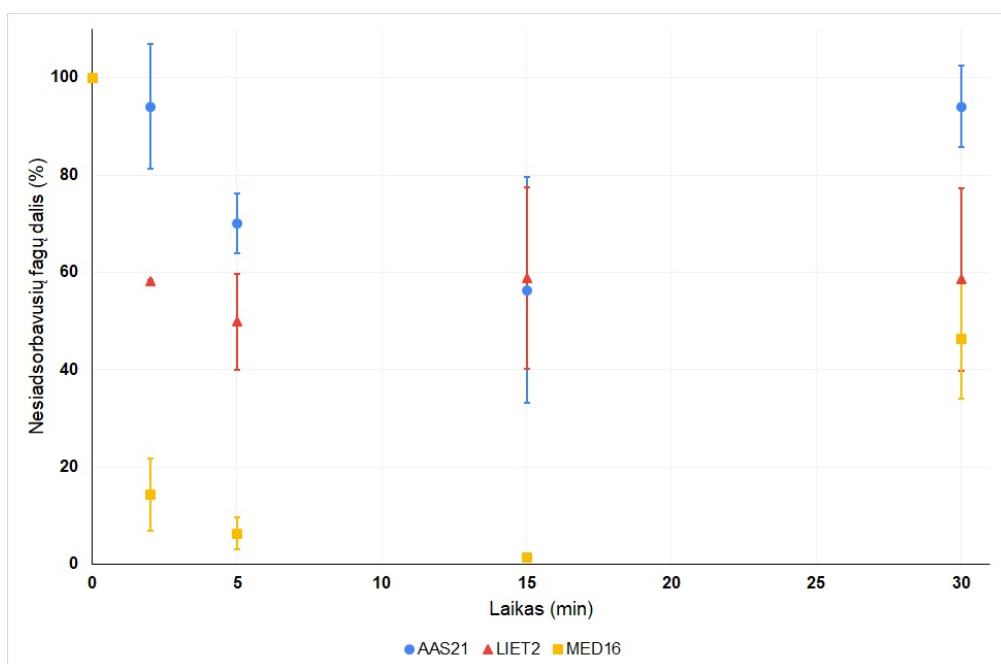
- kamienas nejautrus fago infekcijai

Nustatyta, kad *Pantoea agglomerans* izoliatas BSL yra jautrus fagui MED16, o *Pantoea agglomerans* izoliatas AUR yra jautrus fagui AAS23. MED16 ir AAS23 fagai infekuoja tik tuos izoliatas, iš kurių buvo išskirti. Nustatyta, kad *Pantoea agglomerans* izoliatui DDM ir BSL yra jautrus LIET2, o *Pantoea agglomerans* izoliatui AUR, BSL ir SER yra jautrus AAS21, taip pat DSMZ 3493 (*P. agglomerans*) kamienas yra jautrus AAS21 fago infekcijai. Fagai LIET2 ir AAS21 geba infekuoti ne tik izoliatas, iš kurių yra išskirti (LIET2 iš DDM, AAS21 iš AUR), bet ir kitus, turimus laboratorijos kolekcijoje. Nei vienas iš tirtų bakteriofagų neinfekuoja *Erwinia* genties bakterijų.

Bakteriofagų ląstelių-šeimininkių nustatymo tyrimai rodo, kad iš šio darbo metu tirtų bakteriofagų didžiausią spektrą turi fagas AAS21, jis infekuoja keturis skirtingus *Pantoea agglomerans* bakterijų kamienus, įskaitant vieną kamieną iš DSMZ kolekcijos. Likusieji bakteriofagai infekuoja tik po vieną (fagai MED16 ir AAS23) arba du (fagas LIET2) *Pantoea agglomerans* izoliatus. Turint omenyje, kad visi šiame darbe minimi *Pantoea agglomerans* izoliatai buvo išskirti iš gamtinės aplinkos, iš kurios izoliuoti ir patys bakteriofagai (Šimoliūnas et al., 2018), galime teigti, kad šio darbo rezultatai ne tik rodo siaurą tirtų bakteriofagų ląstelių-šeimininkių spektrą bet ir leidžia manyti, kad daugeliu atvejų fagai efektyviau infekuoja ląsteles, kurios aptinkamos jų natūralioje aplinkoje.

### 3.2.4. Adsorbcijos efektyvumas

Bakteriofagų adsorbcija ant ląstelių-šeimininkių paviršiaus yra pirminis ir vienas iš esminių infekcijos proceso etapų, galinčių turėti įtakos ne tik sėkmingam fago pasidauginimui, bet ir galinčių lemti bakteriofagų specifiškumą (Silva et al., 2016). Fagų adsorbcija laikoma efektyvia, kai per pirmas 10 minučių laisvų fagų kiekis suspensijoje nuo 100 proc. pasiekia beveik 0 proc. – tai vadinama pirmosios eilės kinetika (Kropinski, 2009). Šio darbo metu buvo atlikti adsorbcijos bandymai su bakteriofagais AAS21, LIET2 ir MED16, gauti rezultatai pateikiami žemiau esančiame grafike (8 pav.).



**8 pav.** Bakteriofagų adsorbcijos ant ląstelių-šeimininkių paviršiaus, grafikas. Eksperimentuose naudoti *Pantoea agglomerans* izoliatai: AUR (fago AAS21 atveju), DDM (fago LIET2 atveju)

ir BSL (fago MED16 atveju). Grafike pavaizduota kiekvienos tirtos minutės (2 min., 5 min., 15 min. ir 30 min.) neatsiadsorbavusių fagų (vidurkio) dalis procentais bei standartinis nuokrypis.

Nustatyta, kad tirtomis sąlygomis bakteriofagų AAS21 ir LIET2 adsorbcija vyko neefektyviai (praėjus 15 min. nuo eksperimento pradžios ~ 60 % fagų vis dar išlieka nesiadsorbavę). Toks didelis nesiadsorbavusių fagų skaičius gali būti aiškinamas tuo, kad, šių fagų efektyviai adsorbcijai vykti, tikėtina, reikalingi papildomi veiksniai, pavyzdžiui, padidinta divalenčių jonų ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) koncentracija (Cvirkaitė-Krupovič et al., 2010) arba pakeistos aplinkos sąlygos, pavyzdžiui, intensyvesnė/mažiau intensyvi aeracija, aukštesnė/žemesnė temperatūra. Tuo tarpu bakteriofago MED16 atveju adsorbcija vyko efektyviai – praėjus 5 min. nuo eksperimento pradžios ~ 93 % visų fagų adsorbuojasi ant ląstelių-šeimininkų paviršiaus. Grafike stebimas bakteriofagų skaičiaus padidėjimas praėjus 30 min. nuo eksperimento pradžios, tikėtina, yra susijęs su naujų fagų palikuonių susiformavimu ir išėjimu iš ląstelės.

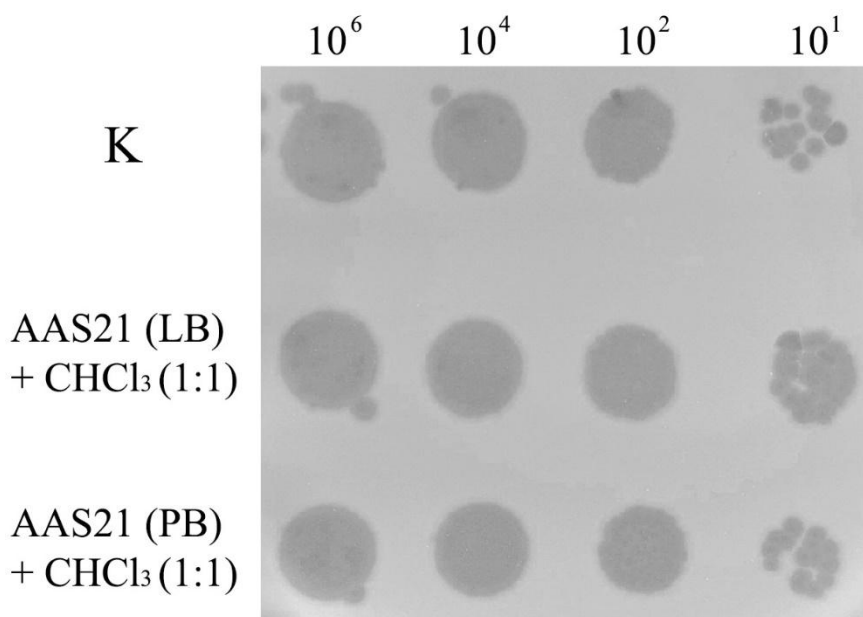
### **3.3. Jautrumas fiziniams ir cheminiams veiksniams**

Norint įvertinti bakteriofagų praktinio taikymo galimybes, svarbu žinoti jų atsparumą įvairiems fiziniams ir cheminiams veiksniams, pavyzdžiui, UV, aukštai/žemai temperatūrai, pH, etanolui, chloroformui (Hyman, 2019). Bakteriofagų jautrumo chloroformui tyrimai atliekami dėl to, kad bakteriofagų išskyrimo bei gryninimo etapuose chloroformas yra naudojamas ne tik siekiant sukelti priešlaikinę ląstelių lizę ir taip padidinant fagų titrą, bet ir siekiant užkirsti kelią fagų mėginių užteršimui (Akindolire ir Ateba, 2019). Tuo tarpu bakteriofagų inaktyvacijos temperatūros nustatymas, yra ypač svarbus tiek siekiant nustatyti praktinio šių virusų taikymo galimybes (siekiant panaudoti bakteriofagus kaip bakterijų sukeltamų ligų prevencijos ar gydymo priemonę atsižvelgiant į klimato sąlygas), tiek priešingai: panaudojant temperatūrą kaip galimą kontrolės priemonę efektyviam ir veiksmingam nepageidaujamų bakteriofagų pašalinimui/inaktyvavimui, pavyzdžiui, pieno pramonėje (Guglielmotti et al., 2011).

#### **3.3.1. Jautrumo chloroformui nustatymas**

Darbo metu buvo nustatinėjamas bakteriofagų jautrumas chloroformui, naudojant 50% galutinę chloroformo koncentraciją. Mėginiai buvo imami atitinkamais laiko intervalais nuo fagų suspensijos ir chloroformo sumaišymo pradžios, t.y. po 5 min., 10 min., 30 min. ir 60 min

(2.2.9. skyrius). Atlikus lašinimo testus, lėkštutės buvo laikomos 22 °C temperatūroje ir rezultatas įvertintas po 24 valandų.

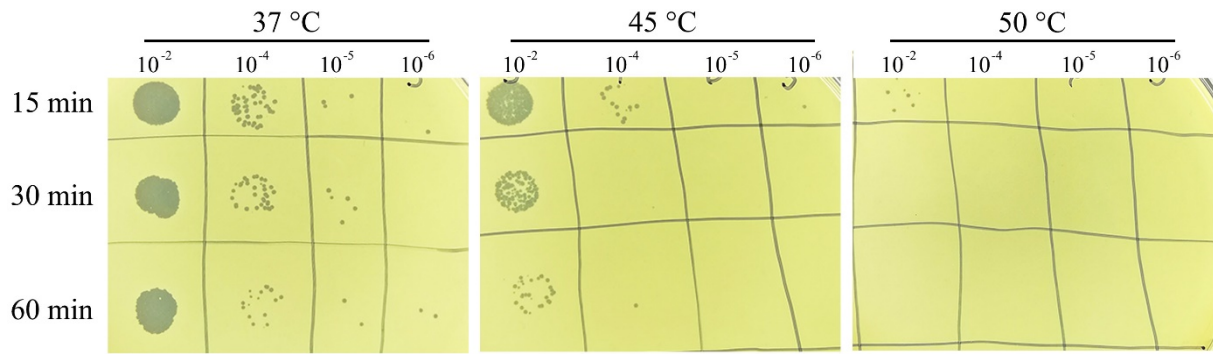


**9 pav.** Bakteriofago AAS21 jautrumo chloroformui eksperimento pavyzdys. Lašinimo testas atliktas praėjus 60 min. nuo eksperimento pradžios. Eksperimentai alikti naudojant *P. agglomerans* izoliatą AUR.

Eksperimento duomenys parodė, kad infektyvių bakteriofagų kiekis inkubuojant fagų suspensiją 60 min. LB terpėje arba PB buferyje ir esant 50% galutinei chloroformo koncentracijai, nepakinta, palyginus su kontrole (9 pav.). Taigi, apibendrinus šiuos rezultatus galima teigti, kad fagai MED16, AAS23, LIET2 ir AAS21 yra nejautrūs chloroformui, todėl šis cheminis veiksnys gali būti naudojamas fagų išskyrimo ir gryninimo procedūrose.

### 3.3.2. Inaktyvacijos temperatūros nustatymas

Nustatant inaktyvacijos temperatūrą fagų suspensija TE buferyje buvo inkubuojama 15, 30 ir 60 minučių 37 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C ir 70 °C temperatūrose. Atlikus lašinimo testus nustatyta, kad bakteriofago LIET2 inaktyvacija stebima praėjus 60 minučių nuo inkubacijos 60 °C temperatūroje. Bakteriofagas AAS23 nebegali infekuoti savo ląstelių šeimininkų praėjus 30 minučių nuo inkubacijos 60 °C temperatūroje. Fago MED16 inaktyvacija stebima praėjus 60 minučių nuo inkubacijos 55 °C temperatūroje, o bakteriofagas AAS21 nebegali infekuoti ląstelių šeimininkų praėjus 15 minučių nuo inkubacijos 50 °C temperatūroje. Pastarojo fago inaktyvacijos eksperimentų nuotraukos pateikiamos 10 paveiksle.



**10 pav.** Bakteriofago AAS21 inaktyvacijos temperatūros nustatymas. Eksperimentai atlikti naudojant *P. agglomerans* izoliatą AUR.

Apibendrinant fagų inaktyvacijos rezultatus, galima teigti, kad atspariausi aukštos temperatūros poveikiui yra fagai LIET2 ir AAS23, todėl juos sunaikinti natūraliomis sąlygomis nebūtų itin paprasta (bent jau atsižvelgiant į temperatūrą). Taip pat nustatyta, kad žemiausią inaktyvacijos temperatūrą turi fagas AAS21, tai reiškia, kad šis fagas yra labiausiai veikiamas aukštos temperatūros ir jo inaktyvacija natūraliomis sąlygomis būtų paprastesnė nei kitų tirtų fagų. Visgi, siekiant bakteriofagus panaudoti terapiniu tikslu prieš patogenus ir atsižvelgiant į mūsų geografinio regiono klimatinės sąlygas, visi tirti bakteriofagai potencialiai galėtų būti panaudoti kaip biokontrolės priemonė.

#### 3.4. Restrikcijos profilių ir genomines DNR modifikacijų nustatymas

Bakterijos, norėdamos apsaugoti nuo virusų, išvystė daugybę sudėtingų aktyvios gynybos mechanizmų, kuriuos galima bendrai vadinti prokariotine „imunine sistema“ (Doron et al., 2018). Viena iš tokių gynybos strategijų – restrikcijos-modifikacijos (RM) sistemos, kurios nukreiptos į specifines invazinių fagų genomų sekas. Kita vertus, evoliucijos eigoje bakteriofagai taip pat išvystė skirtingas strategijas, padedančias išvengti bakterijų restrikcijos-modifikacijos sistemų. Vienas dažniausių apsaugojimo būdų yra restrikcijos endonukleazių kirpimo vietų pakeitimas taškinių mutacijų pagalba (Vasu ir Nagaraja, 2013), kiti virusai genomuose koduoja metiltransferazes, kurios modifikuoja genome esančius nukleotidus ir taip apsaugo viruso genomą nuo šeimininko restrikcijos fermentų – tai vadinama genomu modifikavimu (Weigle ir Raleigh, 2016; Flodman et al., 2019).

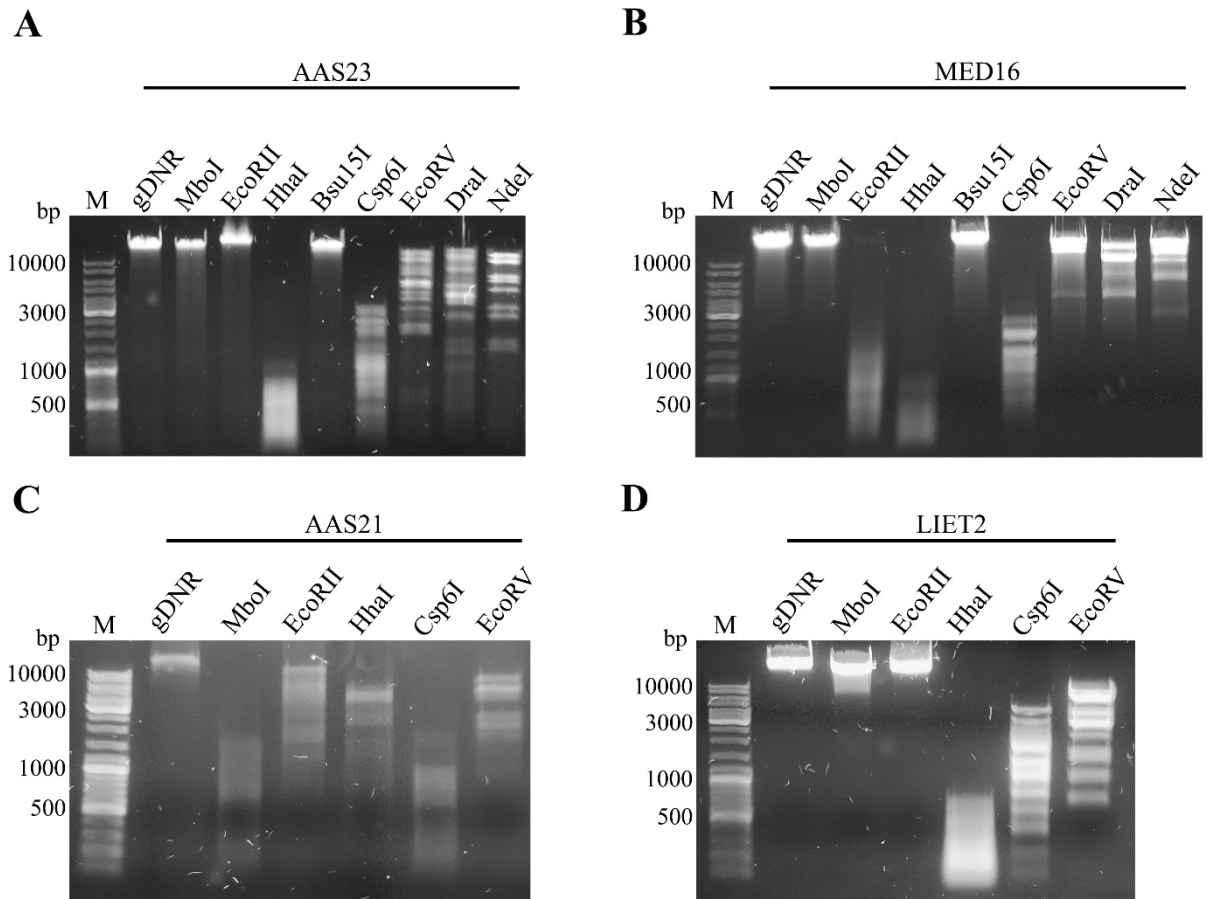
Norint įsitikinti, ar tiriamuose bakteriofaguose stebimos DNR modifikacijos ir kokios jos gali būti konkrečių fagų genomuose, buvo atliekama virusų genomines DNR restrikcinė analizė su specifinėmis restrikcijos endonukleazėmis, kurios yra jautrios metilinimui bei



glikoziliniui (2.2.6. skyrius). Pirmiausia, naudojant fenolio-chloroformo metodą, buvo išskirta bakteriofagų genominė DNR ir atlikta išgrynintos genominės DNR restrikcinė analizė parinkus tokias restrikcijos endonukleazes, kad visų jų kerpamos sekos motyvas būtų bakteriofago genominėje DNR. Taip pat buvo parenkamos skirtingą jautrumą metiliniui turinčios REazės: MboI (jautri Dam metiliniui), EcoRII (jautri Dcm metiliniui), HhaI (jautri CpG metiliniui), Bsu15I (jautri Dam/CpG metiliniui), Csp6I, DraI, NdeI ir EcoRV (nejautrios nei Dcm, nei CpG, nei Dam metiliniui, tačiau Csp6I yra jautri 5-hmC glikoziliniui). Bakteriofagų restrikcijos profilių nuotraukos pateikiamos 11 paveiksle.

Kaip matyti iš 11 paveikslo, fagų AAS23 (A dalis), MED16 (B dalis) bei LIET2 (D dalis) genomuose citozinų nukleobazės (C) yra potencialiai metilinamos arba hidroksimetilinamos. Tą parodo restrikciniai EcoRII ir Bsu15I REazių profiliai, kadangi jos yra jautrios DNR metiliniui, tačiau kerpa nemodifikuotą DNR, o kaip matyti restrikcinės analizės 11 pav. A, B bei D dalyse gDNR nėra sukarpoma. Taip pat iš restrikcinės analizės galima spręsti, kad šių fagų genomuose taip pat potencialiai metilinama ir adenino nukleobazė (A) – tą parodo MboI REazės restrikcinis profilis 11 pav. A, B ir D dalyse, kur matyti, kad naudojant šį fermentą gDNR taip pat nėra sukarpoma.

Atlikus restrikcinę analizę nustatyta, kad visų tiriamųjų fagų genominės DNR nėra hipermodifikuotos. Tą galima pasakyti sprendžiant pagal Csp6I REazės restrikcinius profilius, kadangi šis fermentas yra jautrus glikoziliniui, bet nejautrus metiliniui ar hidroksimetiliniui, o kadangi iš 11 pav. matyti, jog visų tirtų fagų atvejų ši REazė gDNR hidrolizuoja, todėl darome išvadą, kad fagų genominės DNR hipermodifikacijomis nepasižymi. Bakteriofago AAS21 atveju, atlikus restrikcinę analizę, potencialių modifikacijų genominėje DNR nenustatyta.



**11 pav.** (A) Fago AAS23 genomines DNR restrikcinė analizė; (B) fago MED16 genomines DNR restrikcinė analizė; (C) fago AAS21 genomines DNR restrikcinė analizė; (D) fago LIET2 genomines DNR restrikcinė analizė. M takelis – GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific).

Taigi, restrikcinės analizės metu nustatyta, kad bakteriofagų AAS23, MED16 bei LIET2 genomines DNR yra modifikuotos, o AAS21 genomine DNR – nemodifikuota. Taikant šį metodą galima bent potencialiai įvertinti bakteriofagų genomuose esančių DNR nukleotidų modifikacijų pobūdį. Taip pat, tirtų bakteriofagų gDNR metilinimas rodo, kad fagai tokiu būdu yra apsaugoję savo genomus nuo bakterijų restrikcijos-modifikacijos sistemų.

Apibendrinus gautus rezultatus galime teigti, kad šio darbo metu buvo atlikta *Pantoea* genties bakterijas infekuojančių bakteriofagų MED16, AAS23, LIET2 ir AAS21 morfologinė ir fiziologinė analizė, taip pat jautrumo aplinkos veiksniams tyrimai bei restrikcijos profilių ir genomines DNR modifikacijų nustatymas. Ateityje numatoma atlikti detalesnius fagų koduojamų fermentų, taip pat pačių bakteriofagų praktinio taikymo, kaip biokontrolės priemonių, galimybių tyrimus.

## IŠVADOS

1. Bakteriofagai MED16, AAS23 ir AAS21 yra sifovirusai, turintys taisyklingo ikosaedro formos galvutę ir lanksčią nesusitraukiančią uodegėlę, bakteriofagas LIET2 yra miovirusas, turintys ištęsto ikosaedro formos galvutę ir nelanksčią, susitraukiančią uodegėlę.
2. Bakteriofagai MED16, AAS23, AAS21 ir LIET2 yra žemoje temperatūroje prisitaikę vystytis virusai. Bakteriofagų MED16 ir AAS23 formuojami infekciniai centrai sudaryti iš skaidrios centrinės ir neskaidrios periferinės dalies, kas rodo šių virusų potencialų depolimerazinį aktyvumą.
3. Bakteriofagai MED16, AAS23, LIET2 ir AAS21 yra skirtingą ląstelių-šeimininkų spektrą turintys virusai. MED16 ir AAS23 infekuoja po vieną *P. agglomerans* izoliatą (atitinkamai BSL ir AUR), LIET2 – du (BSL ir DDM), o AAS21 – keturis (SER, AUR, BSL ir DSMZ 3493).
4. Bakteriofagai MED16, AAS23, LIET2 ir AAS21 yra nejautrūs chloroformui. Bakteriofagas AAS21 yra jautriausias aukštai temperatūrai, o LIET2 – mažiausiai jautrus.
5. Bakteriofagų AAS23, MED16 bei LIET2 genominės DNR yra modifikuotos (potencialiai metilintos), o AAS21 genominė DNR – nmodifikuota.

## REZULTATŲ SKLAIDA

### MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Magistriniame darbe pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. Šimoliūnienė M, Truncaitė L, **Petrauskaitė E**, Zajančauskaitė A, Meškys R, Skapas M, Kaupinis A, Valius M, Šimoliūnas E. *Pantoea agglomerans*-infecting bacteriophage vB\_PagS\_AAS21: a cold-adapted virus representing a novel genus within the family *Siphoviridae*. *Viruses*, 12(4), 479.

### KONFERENCIJOS

Magistriniame darbe pateikta medžiaga pristatyta šiose konferencijose:

1. **Petrauskaitė E.**, Šimoliūnienė M., Truncaitė L., Zajančauskaitė A., Skapas M., Meškys R., Šimoliūnas E. “Molecular characterization of four broad-temperature range myoviruses infecting *Pantoea* sp.”, 15th International Conference of Life Sciences - The COINS 2020, Vilnius, Lietuva, 2020 (stendinis pranešimas).

2. Šimoliūnienė M., **Petrauskaitė E.**, Šimoliūnas E., Zajančauskaitė A., Skapas M., Meškys R., Truncaitė L. “Investigation of plaque formation of novel siphoviruses infecting *Pantoea* spp.”, FEBS3+ conference, Riga, Latvia, 2019 (stendinis pranešimas).

3. Šimoliūnienė M., **Petrauskaitė E.**, Šimoliūnas E., Zajančauskaitė A., Skapas M., Meškys R., Truncaitė L. “Bacteriophage vB\_PagS\_AAS23: a new *Pantoea* spp. infecting representative within the family *Siphoviridae*.”, The COINS 2019 (14th International Conference of Life Sciences), Vilnius, Lietuva, 2019 (stendinis pranešimas).

4. **Petrauskaitė E.**, Šimoliūnienė M., Truncaitė L., Skapas M., Meškys R., Šimoliūnas E. “*Pantoea* sp. infecting phage vB\_PagS\_MED16 – a putative representative of a new genus within the family *Siphoviridae*.”, The COINS 2019 (14th International Conference of Life Sciences), Vilnius, Lietuva, 2019 (stendinis pranešimas).

### LMT FINANSUOTOS STUDENTŲ MOKSLINĖS PRAKTIKOS

1. Įvykdytas Lietuvos mokslo tarybos studentų mokslinės vasaros praktikos projektas Nr. 09.3.3-LMT-K-712-15-0274 „Naujų bakteriofagų, infekuojančių *Pantoea* genties bakterijas, charakterizavimas“, 2019 m. liepa-rugpjūtis. Projektas pristatytas GMC organizuotame seminare.

2. Įvykdytas Lietuvos mokslo tarybos studentų mokslinės praktikos laisvu nuo studijų metu projektas Nr. 09.3.3-LMT-K-712-16-0087 „*Pantoea* genties bakterijas infekuojančių bakteriofagų identifikavimas ir charakterizavimas“, 2019 m. spalio 11 d. - 2020 m. balandžio 30 d.

## PADĖKA

Dėkoju Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus vedėjui dr. Rolandui Meškiui už suteiktą galimybę atlikti baigiamąjį darbą jo vadovaujamoje laboratorijoje.

Noriu padėkoti savo darbo vadovui **dr. Eugenijui Šimoliūnui** už nuolatinę pagalbą ir patarimus atliekant eksperimentus, už perduotas žinias ir nuolatinį skatinimą tobulėti, sužinoti kuo daugiau ir plačiau, už palaikymą ir pasitikėjimą visu magistrantūros studijų laikotarpiu.

Ačiū Monikai Šimoliūnienei, už rūpestį ir kantrybę mokant pritaikyti naujas metodikas atliekant laboratorinius eksperimentus, už palaikymą, supratimą, už pagalbą ir patarimus ruošiantis konferencijoms, įvairiems atsiskaitymams ir dažnai skiriant savo darbo laiką man. Ačiū.

Ačiū skyriaus darbuotojoms Aurelijai, Lidijai už pagalbą ir patarimus, Nijolei už terpių ir eksperimentams naudojamų priemonių paruošimą. Dėkoju visiems skyriaus darbuotojams ir studentams už kolektyviškumą, draugišką ir motyvuojančią atmosferą.

Taip pat noriu padėkoti ir savo šeimos nariams už tikėjimą manimi ir palaikymą visus studijų metus, o ypač rašant baigiamąjį darbą. Ačiū, kad visad esate šalia manęs.

## SANTRAUKA

### *Pantoea* genties bakterijas infekuojančių bakteriofagų charakterizavimas

Nepaisant to, kad *Pantoea* genties bakterijos yra vienos gausiausių bakterijų filosofijoje ir yra žinomos ne tik kaip itin svarbūs epifitai ar endofitai, bet ir gali būti susijusios su įvairiomis vabzdžių, gyvūnų ar augalų ligomis, šias bakterijas infekuojantys bakteriofagai iki šiol tirti itin menkai. Siekiant bent iš dalies pakeisti esamą situaciją, šio darbo metu buvo atliekama *Pantoea* genties bakterijas infekuojančių bakteriofagų vB\_PagS\_MED16 (MED16), vB\_PagS\_AAS23 (AAS23), vB\_PagS\_AAS21 (AAS21) ir vB\_PagM\_LIET2 (LIET2) tyrimai. Nustatyta, kad bakteriofagai MED16, AAS23 ir AAS21 yra sifovirusai, turintys taisyklingo ikosaedro formos galvutę ir lanksčią nesusitraukiančią uodegėlę, bakteriofagas LIET2 yra miovirusas, turintis išstęsto ikosaedro formos galvutę ir nelanksčią, susitraukiančią uodegėlę. Bakteriofagai MED16, AAS23, AAS21 ir LIET2 yra žemoje temperatūroje prisitaikę vystytis virusai. Bakteriofagų MED16 ir AAS23 formuojami infekciniai centrai sudaryti iš skaidrios centrinės ir neskaidrios periferinės dalies, kas rodo šių virusų potencialų depolimerazinį aktyvumą. Bakteriofagai MED16, AAS23, LIET2 ir AAS21 yra skirtingą ląstelių-šeimininkų spektrą turintys virusai. MED16 ir AAS23 infekuoja po vieną *P. agglomerans* izoliatą (atitinkamai BSL ir AUR), LIET2 – du (BSL ir DDM), o AAS21 – keturis (SER, AUR, BSL ir DSMZ 3493). Bakteriofagai MED16, AAS23, LIET2 ir AAS21 yra nejautrūs chloroformui. Bakteriofagas AAS21 yra jautriausias aukštai temperatūrai, o LIET2 – mažiausiai jautrus. Bakteriofagų AAS23, MED16 bei LIET2 genominės DNR yra modifikuotos (potencialiai metilintos), o AAS21 genominė DNR – nemodifikuota.

## SUMMARY

### Characterization of *Pantoea* spp. infecting bacteriophages

Bacteria of the genus *Pantoea* are among the most abundant in the phyllosphere and are known not only as vital epiphytes or endophytes but also as potentially being involved in various insect, animal or plant diseases. Bacteriophages infecting these bacteria have so far been extremely poorly studied. In order to at least partially change the situation, studies of *Pantoea* infecting bacteriophages vB\_PagS\_MED16 (MED16), vB\_PagS\_AAS23 (AAS23), vB\_PagS\_AAS21 (AAS21) and vB\_PagM\_LIET2 (LIET2) were performed. The study revealed that bacteriophages MED16, AAS23, and AAS21 are siphoviruses with a regular icosahedral head and a flexible non-contractile tail, whereas bacteriophage LIET2 is a myovirus with an elongated icosahedral head and a rigid, contractile tail. It was found that bacteriophages MED16, AAS23, AAS21, and LIET2 are viruses adapted to develop at low temperatures. The research showed that plaques formed by bacteriophages MED16 and AAS23 consist of a transparent center and opaque halo (peripheral) zone, indicating the potential depolymerase activity. Bacteriophages MED16, AAS23, LIET2 and AAS21 are viruses with a quite different host range: MED16 and AAS23 infecting one *P. agglomerans* isolate (BSL and AUR, respectively), LIET2 - two (BSL and DDM), and AAS21 - four (SER, AUR, BSL, and DSMZ 3493). Bacteriophages MED16, AAS23, LIET2 and AAS21 are not sensitive to chloroform. Bacteriophage AAS21 is the most sensitive to high temperature and LIET2 is the least sensitive. The genomic DNAs of bacteriophages AAS23, MED16 and LIET2 are modified (potentially methylated) and the genomic DNA of AAS21 is unmodified.



## LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Abedon, S. T. (2018). Detection of Bacteriophages: Phage Plaques. *Bacteriophages*, 1–32. doi:10.1007/978-3-319-40598-8\_16-1.
2. Abuladze T et al., (2008). Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* Oct74(20):6230-8. doi: 10.1128/AEM.01465-08. p.6237.
3. Ackermann HW. (2009). Phage classification and characterization. *Methods Mol Biol.*; 501:127-40.
4. Adams MH. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers, Inc., New York-London: p. 527.
5. Ayşe Büyükcam, Özlem Tuncer, Deniz Gür, Banu Sancak, Mehmet Ceyhan, Ali B. Cengiz, Ateş Kara (2018). Clinical and microbiological characteristics of *Pantoea agglomerans* infection in children. *Journal of Infection and Public Health*, Volume 11, Issue 3, 304-309.
6. Adriaenssens E.M., Ceysens P.J., Dunon V., Ackermann H.W., Van Vaerenbergh J., Maes M., De Proft M., Lavigne R. (2011). Bacteriophages LIME-light and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, belonging to the “phiKMV-like viruses” *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3443–3450. doi: 10.1128/AEM.00128-11.
7. Ankrah NY, May AL, Middleton JL, et al. (2014). Phage infection of an environmentally relevant marine bacterium alters host metabolism and lysate composition. *ISME J.* 8(5):1089-1100. doi:10.1038/ismej.2013.216
8. Arens, D.K., Brady TS, Carter JL, Pape JA, Robinson DM, Russell KA, Staley LA, Stettler JM, Tateoka OB, Townsend MH et al. (2018). Characterization of two related *Erwinia myovirus*s that are distant relatives of the ØKZ-like Jumbo phages. *PLoS One* 13, e0200202.
9. Ateba, C.N.; Akindolire, M.A. (2019). Isolation and Characterisation of Bacteriophages with Lytic Activity Against Virulent *Escherichia coli* O157:H7: Potential Bio-Control Agents. Preprints, 2019010132 (doi: 10.20944/preprints201901.0132.v1).
10. Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., & Jackson, L. E. (2003). Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 87, 949–954.

11. Buttimer C, McAuliffe O, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, Coffey A. (2017). Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Front Microbiol.*8:34. doi:10.3389/fmicb.2017.00034.
12. Cai, L., Ma, R., Chen, H. et al. (2019) A newly isolated roseophage represents a distinct member of Siphoviridae family. *Viol J* **16**, 128. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1241-6>.
13. Chan, B., & Abedon, S. (2014). Bacteriophages and their Enzymes in Biofilm Control. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 85–99. doi:10.2174/1381612820666140905112311.
14. Coutinho TA, Venter SN. (2009). *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Mol Plant Pathol.*10(3):325-335. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00542.x.
15. Cvirkaitė-Krupovič, V., Krupovič, M., Daugelavičius, R., & Bamford, D. H. (2010). Calcium ion-dependent entry of the membrane-containing bacteriophage PM2 into its *Pseudoalteromonas* host. *Virology*, 405(1), 120–128.
16. Das M., Bhowmick T. S., Ahern S. J., Young R., Gonzalez C. F. (2015). Control of pierce's disease by phage. *PLoS ONE* 10:e0128902 10.1371/journal.pone.0128902
17. Dion, M.B., Oechslin, F. & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol* 18, 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>.
18. Dy, R. L., Rigano, L. A., & Fineran, P. C. (2018). Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture. *Biochemical Society Transactions*, BST20180178. doi:10.1042/bst20180178.
19. Doron S, Melamed S, Ofir G, et al. (2018). Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science.*359(6379):eaar4120. doi:10.1126/science.aar4120.
20. Dutkiewicz, J.; Mackiewicz, B.; Lemieszek, M.; Golec, M.; Milanowski, J. (2015). *Pantoea agglomerans* – A mysterious bacterium of evil and good. Part I. Deleterious effects: Dust-borne endotoxins and allergens – Focus on cotton dust. *Ann. Agric. Environ. Med.* 22, 576–588, doi:10.5604/12321966.1185757.
21. Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Lemieszek MK, et al. (2016). *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part II--Deleterious effects: Dust-borne endotoxins and allergens--focus on grain dust, other agricultural dusts and wood dust. *Ann Agric Environ Med.* 23(1):6-29. doi:10.5604/12321966.1196848.

22. Easwaran, M., & Ahn, J. (2019). Application of Bacteriophages in Organic Farm Animal Production. *Safety and Practice for Organic Food*, 365–375. doi:10.1016/b978-0-12
23. Ellis, S.D., Boehm, M.J., and Coplin, D. (2008). OSU Extension Factsheet - Introduction to Plant Disease Series PP401.06 entitled “Bacterial Diseases of Plants”. (Available online at: <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/index.html>).
24. Evans, T.J.; Crow, M.A.; Williamson, N.R.; Orme, W.; Thomson, N.R.; Komitopoulou, E.; Salmond, G.P.C. (2010). Characterization of a broad-host-range flagellum-dependent phage that mediates high-efficiency generalized transduction in, and between, *Serratia* and *Pantoea*. *Microbiology*, 156, 240–247.
25. Fernández, L.; Gutiérrez, D.; Rodríguez, A.; García, P. (2018). Application of bacteriophages in the agro-food sector: A long way toward approval. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 8, 296.
26. Fister, S., Robben, C., Witte, A. K., Schoder, D., Wagner, M., & Rossmann, P. (2016). Influence of Environmental Factors on Phage–Bacteria Interaction and on the Efficacy and Infectivity of Phage P100. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01152.
27. Flodman K, Tsai R, Xu MY, Corrêa IR Jr, Copelas A, Lee Y-J, Xu M-Q, Weigle P and Xu S-y (2019). Type II Restriction of Bacteriophage DNA With 5hmdU-Derived Base Modifications. *Front. Microbiol.* 10:584. doi: 10.3389/fmicb.2019.00584.
28. Fokine A, Rossmann MG. (2014). Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*.4(1):e28281. doi:10.4161/bact.28281.
29. Fujiwara A, Fujisawa M, Hamasaki R, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.*77(12):4155-4162. doi:10.1128/AEM.02847-10.
30. Granato, E. T., Meiller-Legrand, T. A., & Foster, K. R. (2019). The Evolution and Ecology of Bacterial Warfare. *Current Biology*, 29(11), R521–R537. doi:10.1016/j.cub.2019.04.024.
31. Guglielmotti DM, Mercanti DJ, Reinheimer JA, Quiberoni Adel L. (2012). Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front Microbiol.*; 2:282. Published 2012 Jan 11. doi:10.3389/fmicb.2011.00282.

32. Harada LK, Silva EC, Campos WF, et al. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol Res.*; 212-213:38-58. doi:10.1016/j.micres.2018.04.007.
33. Helen E. White and Elena V. Orlova (2019). Bacteriophages: Their Structural Organisation and Function, *Bacteriophages - Perspectives and Future*, Renos Savva, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.85484.
34. Hyman P. (2019). Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals (Basel)*. 12(1):35. doi:10.3390/ph12010035.
35. ICTVOnline.org [internetinė svetainė] 2020. [žiūrėta 2020-04-09] <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
36. Yu, P., Mathieu, J., Li, M., Dai, Z., and Alvarez, P. J. (2016). Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple-host approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 808–815. doi: 10.1128/AEM.02382-15.
37. Jones JB, Vallad GE, Iriarte FB, et al. (2012). Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*.2(4):208-214. doi:10.4161/bact.23857.
38. Juliano Bertozzi Silva, Zachary Storms, Dominic Sauvageau. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 363, Issue 4, February 2016, fnw002, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>.
39. K.A. Bhat, S.D. Masood, N.A. Bhat, M. Ashraf Bhat, S.M. Razvi, M.R. Mir, Sabina Akhtar, N. Wani and M. Habib, (2010). Current Status of Post Harvest Soft Rot in Vegetables: A Review. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9: 200-208. DOI: 10.3923/ajps.2010.200.208
40. Kaliniene L, Klausas V, Truncaite L (2010). Low-temperature T4-like coliphages vB\_EcoM-VR5, vB\_EcoM-VR7 and vB\_EcoM-VR20. *Arch Virol* 155:871–880.
41. Kara Rogers and Robert J. Kadner (2019), Bacteria, *Encyclopædia Britannica*.
42. Kasman LM, Porter LD. (2020). Bacteriophages. [Updated 2019 Aug 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>.
43. King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., & Carstens, E. B. (Eds.). (2011). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9). Elsevier
44. Klimenko AI, Matushkin YG, Kolchanov NA, Lashin SA. (2016). Bacteriophages affect evolution of bacterial communities in spatially distributed habitats: a simulation study [published correction appears in *BMC Microbiol.* 2016;16(1):67]. *BMC*

- Microbiol.*16 Suppl 1(Suppl 1):10. Published 2016 Jan 27. doi:10.1186/s12866-015-0620-4
45. Kolozsváriné Nagy, J., Schwarczinger, I., Künstler, A. et al. (2015). Penetration and translocation of *Erwinia amylovora*-specific bacteriophages in apple - a possibility of enhanced control of fire blight. *Eur J Plant Pathol* 142, 815–827 <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0654-3>.
  46. Kropinski AM (2009). Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells. *Methods Mol Biol* 501:151–155.
  47. Lagonenko, A.L.; Sadovskaya, O.; Valentovich, L.N.; Evtushenkov, A.N. (2015). Characterization of a new Vil-like *Erwinia amylovora* bacteriophage phiEa2809. *FEMS Microbiol. Lett.*, 362, fnv031.
  48. Lavigne R, Darius P, Summer EJ, et al. (2009). Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiol.*9:224. Published 2009 Oct 26. doi:10.1186/1471-2180-9-224.
  49. Łusiak-Szelachowska M, Weber-Dąbrowska B, Jończyk-Matysiak E, Wojciechowska R, Górski A. (2017). Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. *Gut Pathog.*9:44. Published 2017 Aug 10. doi:10.1186/s13099-017-0196-7.
  50. Maciejewska, B., Olszak, T. & Drulis-Kawa, Z. (2018). Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application?. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 2563–2581 <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8811-1>.
  51. Moye ZD, Woolston J, Sulakvelidze A. (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses.* 10(4):205. doi:10.3390/v10040205.
  52. Moradi Amirabad, Y., Khodakaramian, G. (2017). Isolation and characterization of *Erwinia piriflorinigrans* causal agent flower necrosis of red poppy. *Australasian Plant Pathol.* 46, 611–616. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0513-0>
  53. Nobrega, F.L., Vlot, M., de Jonge, P.A. et al. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol* 16, 760–773. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0070-8>.
  54. Panditrao M, Panditrao M. (2018). *Pantoea dispersa*: Is it the Next Emerging "Monster" in our Intensive Care Units? A Case Report and Review of Literature. *Anesth Essays Res.*12(4):963–966. doi:10.4103/aer.AER\_147\_18.

55. Parmar KM, Gaikwad SL, Dhakephalkar PK, Kothari R, Singh RP. (2017). Intriguing Interaction of Bacteriophage-Host Association: An Understanding in the Era of Omics. *Front Microbiol.* 2017;8:559. doi:10.3389/fmicb.2017.00559.
56. Pires, D.P., Oliveira, H., Melo, L.D.R. et al. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 2141–2151. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>.
57. Principi N, Silvestri E. and Esposito S. (2019). Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Front. Pharmacol.* 10:513. doi: 10.3389/fphar.2019.00513
58. Ross A, Ward S, Hyman P. (2016). More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages. *Front Microbiol.* 2016;7:1352. doi:10.3389/fmicb.2016.01352.
59. Salmond, G., Fineran, P. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* 13, 777–786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>
60. Sambrook J, Russell D (eds) (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, pp430–433.
61. Sanders M. E., Klaenhammer T. R. (1984). Phage resistance in a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: temperature-dependent phage development and host-controlled phage replication. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 979–985.
62. Sausset, R., Petit, M.A., Gaboriau-Routhiau, V. et al. (2020). New insights into intestinal phages. *Mucosal Immunol* 13, 205–215. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0250-5>.
63. Seeley, N.D.; Primrose, S.B. (1980). The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. *J. Gen. Virol.*, 46, 87–95, doi:10.1099/0022-1317-46-1-87
64. Sharma R, Pielstick BA, Bell KA, Nieman TB, Stubbs OA, Yeates EL, Baltrus DA and Grose JH (2019). A Novel, Highly Related Jumbo Family of Bacteriophages That Were Isolated Against *Erwinia*. *Front. Microbiol.* 10:1533. doi: 10.3389/fmicb.2019.01533.
65. Sykes I. K., Lanning S., Williams S. T. (1981). The effect of pH on soil actinophage. *Microbiology* 122 271–280. 10.1099/00221287-122-2-271
66. Sunderland KS, Yang M, Mao C. (2017). Phage-Enabled Nanomedicine: From Probes to Therapeutics in Precision Medicine. *Angew Chem Int Ed Engl.*56(8):1964-1992. doi:10.1002/anie.201606181
67. Sundin GW, Castiblanco LF, Yuan X, Zeng Q, Yang CH. (2016). Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in

- Bacterial Molecular Plant Pathology. *Mol Plant Pathol.*17(9):1506–1518. doi:10.1111/mpp.12436.
68. Svircev, A.; Roach, D.; Castle, A. (2018). Framing the Future with Bacteriophages in Agriculture. *Viruses*, 10, 218.
  69. Šimoliūnas E, Šimoliūnienė M, Kaliniene L, et al. (2018). Pantoea Bacteriophage vB\_PagS\_Vid5: A Low-Temperature Siphovirus That Harbors a Cluster of Genes Involved in the Biosynthesis of Archaeosine. *Viruses*.10 (11):583. doi:10.3390/v10110583.
  70. Šimoliūnienė, M.; Truncaitė, L.; Petrauskaitė, E.; Zajančauskaitė, A.; Meškys, R.; Skapas, M.; Kaupinis, A.; Valius, M.; Šimoliūnas, E. (2020). Pantoea agglomerans-Infecting Bacteriophage vB\_PagS\_AAS21: A Cold-Adapted Virus Representing a Novel Genus within the Family Siphoviridae. *Viruses* 2020, 12, 479.
  71. Tokman JI, Kent DJ, Wiedmann M, Denes T. (2016). Temperature Significantly Affects the Plaquing and Adsorption Efficiencies of Listeria Phages. *Front Microbiol.*7:631. doi:10.3389/fmicb.2016.00631.
  72. Touchon M, Moura de Sousa JA, Rocha EP. (2017). Embracing the enemy: the diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*. 38:66-73. DOI: 10.1016/j.mib.2017.04.010.
  73. Thompson, Daniel W. Casjens, Sherwood R. Sharma, Ruchira Grose, Julianne H. (2019). Genomic comparison of 60 completely sequenced bacteriophages that infect *Erwinia* and/or *Pantoea* bacteria. *Virology*, Volume 535, 59-73.
  74. Vasu K, Nagaraja V. (2013). Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev.*77(1):53-72. doi:10.1128/MMBR.00044-12.
  75. Veessler, D., & Cambillau, C. (2011). A Common Evolutionary Origin for Tailed-Bacteriophage Functional Modules and Bacterial Machineries. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(3), 423–433. doi:10.1128/mmbr.00014-11.
  76. Xu, J., Chen, M., He, L., Zhang, S., Ding, T., Yao, H., et al. (2016). Isolation and characterization of a T4-like phage with a relatively wide host range within *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* 56, 405–421. doi: 10.1002/jobm.201500440.
  77. Walterson, A.M.; Stavrinides, J. (2015). *Pantoea*: Insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39, 968–984.
  78. Weigle P, Raleigh EA. (2016). Biosynthesis and function of modified bases in bacteria and their viruses. *Chem Rev.*116(20):12655–12687.