

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

***Pseudomonas putida* bakteriofaagide keskkonnast eraldamise meetodid**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhan Mattias Laipaik

Juhendaja

PhD Hedvig Tamman

TARTU 2024

Infoleht

***Pseudomonas putida* bakteriofaagide keskkonnast eraldamise meetodid**

Bakteriofaagide ehk baktereid nakatavate viiruste isoleerimiseks keskkonnaproovidest on välja töötatud mitmeid erinevaid meetodeid. Töö käigus rakendati neist kolme, milleks olid üleöö rikastus, lühike rikastus ja sadestamine, eesmärgiga täiendada Tartu Ülikooli Geneetika õppetooli *Pseudomonas putida* bakteriofaagide kollektsiooni. Võrreldi meetodite tõhusust ja peremeestüve, temperatuuri ja söötmelisandite mõju isolatsiooniprotsessile.

Lõpptulemustena isoleeriti edukalt mitu uut bakteriofaagiliiki. Lisaks täheldati töö käigus madalama inkubatsioonitemperatuuri positiivset mõju bakteriofaagide kasvule. Kahe kasutatud peremeestüve võrdlusel ilmnes, et tüvel, millel on eemaldatud *rloC* geen, on suurem resistentsus faagidele, kuid mõjutab erinevaid faagiperekondi erinevalt, võimaldades selektiivsemat bakteriofaagide isolatsiooni.

Märksõnad: bakteriofaagid, *Pseudomonas putida*, bakteriofaagide isoleerimine

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Methods of isolating environmental bacteriophages of *Pseudomonas putida*

A number of different methods have been developed to isolate bacteriophages, or viruses that infect bacteria, from environmental samples. During the work, three of them were applied, those being overnight enrichment, short enrichment, and precipitation, in order to complement the collection of *Pseudomonas putida* bacteriophages at the Department of Genetics, University of Tartu. The efficiency of the methods and the effect of host strain, temperature, and medium content during isolation, were compared.

As a result, several new bacteriophage species were successfully isolated. In addition, a positive effect of lower incubation temperature on bacteriophage growth was observed. Comparison of the two host strains used showed that the strain with a deleted *rloC* gene has a higher resistance to phages in general, but disproportionately affects different phage families, allowing for selection against genera that have been overrepresented in the collection thus far.

Keywords: bacteriophages, microbiology, *Pseudomonas putida*, bacteriophage isolation

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	3
Kasutatud lühendid	6
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1 Bakteriofaagid	8
1.1.1 Bakteriofaagide mitmekesisus	8
1.1.2 Bakteriofaagide temperatuuritaluvus	10
1.2 <i>Pseudomonas putida</i> faagid.....	11
1.2.1 Bakteriofaagide kolleksioon CEPEST	11
1.3 Bakteriofaagide isolatsioonitehnikad	13
2. Eksperimentaalosa	15
2.1 Töö eesmärgid	15
2.2 Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1 Kasutatud materjalid, tüved, praimerid	16
2.2.2 Isolatsioonimeetodid	16
2.2.3 Bakteriofaagide perekondade määramine	19
2.2.4 Faagi puhastamine.....	20
2.2.5 Faagi paljundamine	21
2.2.6 Faagitiitri määramine.	22
2.2.7 Faagi DNA eraldus.....	22
2.2.8 Faagide esmane kirjeldus	23
2.3 Tulemused	24
2.3.1 Üleöö rikastus oli kõige saagikam	24
2.3.2 $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüvega isoleeriti peamiselt G5 faage sõltumata meetodist	25
2.3.3 G5 faagide vältimiseks kasutati kahte meetodit.....	26
2.3.4 Isoleeritud faagide infektsiooniomadused	31
2.4 Arutelu.....	37
2.4.1 Üleöö rikastuse edukus võib tuleneda suuremast faagide kogusest.....	37
2.4.2 Madalam temperatuurieelistus võib olla seotud keskkonnaga.....	38
2.4.3 Peremeestüve valik on oluline osa protsessi optimeerimisest	39
2.4.4 Paljud faagid on mõjutatud söötme lisanditest	40
Kokkuvõte.....	41
Summary	42
Tänuõnad	43

Kirjanduse loetelu.....	44
Kasutatud veebiaadressid	48
Lisad	49
Lisa 1. Ülevaade kõigist testitud laikudest	49
Lisa 2. Täispikkuses tabel $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$ tüvega tehtud proovidest	52
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	54

Kasutatud lühendid

BASEL	<i>Escherichia coli</i> 't nakatavate keskkonnafaagide kollektsoon (<i>Bacteriophage Selection for your Laboratory</i>)
CEPEST	<i>Pseudomonas putida</i> 't nakatavate keskkonnafaagide kollektsoon (<i>Collection of Environmental Pseudomonas putida Phages from Estonia</i>)
cip	Tsiprofloksatsiin (<i>ciprofloxacin</i>)
dsDNA	kaheaheelaline DNA (<i>double strand DNA</i>)
dsRNA	kaheaheelaline RNA (<i>double strand RNA</i>)
EIKI	Keskkonnaproov „Eisma Kivi all“
KEKO	Keskkonnaproov „Kerna Kompost“
LB	lüsogeenne sööde (ingl. k. <i>Lysogeny Broth</i>)
PBS	fosfaadi puhver (ingl. k. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon (ingl. k. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFU	laike tekitav ühik, infektsiooniliste faagide hulk (<i>plaque-forming unit</i>)
SM	bakteriofaagide hoistuspuhver (ingl. k. <i>Suspension medium</i>)
ssDNA	üheaheelaline DNA (<i>single strand DNA</i>)
ssRNA	üheaheelaline RNA (<i>single strand RNA</i>)
TAE	Tris-atsetaat-EDTA puhver
TES	Tris-EDTA-SDS puhver
TOKA	Keskkonnaproov „Tõrva Känd“
TOKO	Keskkonnaproov „Tõrva Kompost“
TOMU	Keskkonnaproov „Tõrva Mutimuld“

Sissejuhatus

Bakteriofaagid, ehk baktereid nakatavad viirused, on üldlevinud igas keskkonnas üle maailma. Faagid on bakterite evolutsioonis väga olulisel kohal, suunates neid pidevale muutlikkusele ja uute kaitsesüsteemide tekkele igaveses võidurelvastumise tsüklis.

Kuigi üldiselt on biotehnoloogias ja meditsiinis olulisi bakteriliike nakatavaid faage isoleeritud võrdlemisi palju, siis üllataval kombel on biotehnoloogias olulist keskkonnabakterit *Pseudomonas putida* nakatavaid individuaalseid bakteriofaagiliike isoleeritud ja kategoriseeritud võrdlemisi vähe. Tulenevalt faagide tohutust mitmekesisusest on nende väheste liikide põhjal raske luua tervikpilti selle bakteri faagidest. Olukorda raskendab asjaolu, et *P. putida* faagide eraldamine keskkonnast on keerukas ja optimeerimata protsess.

Vaatamata nendele takistustele on loodud erinevate bakteriliikide jaoks mitmeid erinevaid bakteriofaagikollektsioone, mis sisaldavad kümneid erinevaid faage. Üht neist arendatakse ka Tartu Ülikoolis Geneetika õppetoolis, milleks on CEPEST (*Collection of Environmental Pseudomonas putida Phages from Estonia*) kollektsioon (Brauer *et al.*, 2024). Kuigi kogum on endas sisalduvate mudelorganism *P. putida* PaW85 spetsiifiliste bakteriofaagide poolest väga mahukas, vajab see veel täiendamist.

Eesmärgiga täiendada CEPEST faagikollektsiooni, mitmekesistades selles leiduvate faagide valimit, isoleeriti, testiti ja kirjeldati paljudest erinevatest keskkonnaproovidest võimalikult palju uudseid *P. putida* bakteriofaage. Töö käigus kasutati erinevaid isolatsioonimeetodeid, et tuvastada nende võimalikud eelised ja puudujäägid ning lihtsustada kollektsiooni täiendust ka tulevikus. Viimaks testiti ka töö käigus isoleeritud bakteriofaage erinevate isolatsioonikasutatavate parameetrite eelistuste osas.

1. Kirjanduse ülevaade

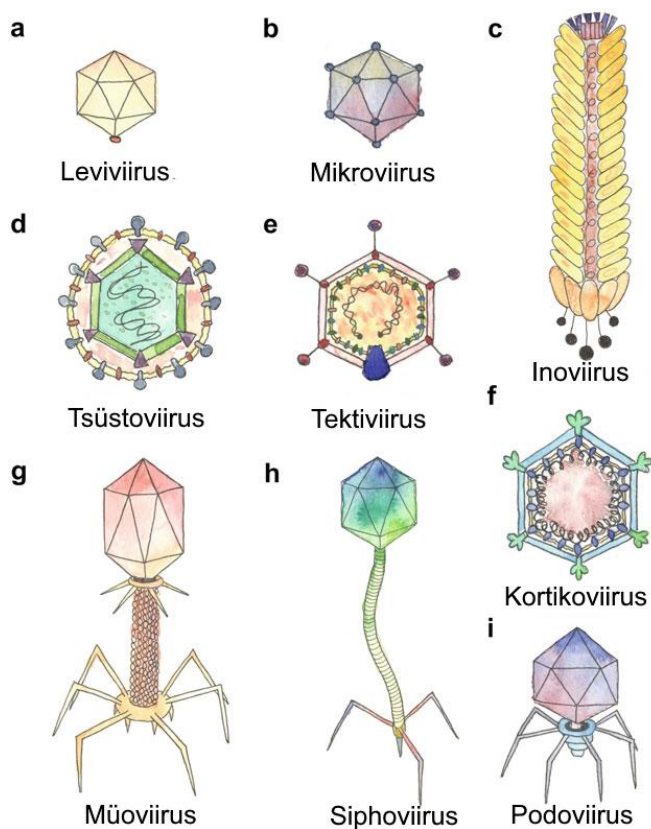
1.1 Bakteriofaagid

Eranditult prokariöote nakatavad viirused ehk bakteriofaagid (faagid) on keskkonnas ühed laialdasemalt levinud mikroorganismid. Hinnanguliseks bakteriofaagide hulgaks maailmas on 10^{31} virioni (Comeau *et al.*, 2008) ning need moodustavad teise kõige suurema osa kogu maailma biomassist prokariöotide järel (Suttle, 2005). Bakteriofaagid on ka prokariöotide mõistes ökoloogiliselt väga olulisel kohal, ületades nende arvukust ligi 15-kordselt ning tappes umbkaudselt 10 - 20% maailmavee bakteritest igapäevaselt (Suttle, 1994).

1.1.1 Bakteriofaagide mitmekesisus

Bakteriofaagide elutsüklid jagunevad kaheks – lüütilised ehk virulentsed ja lüsogeensed ehk mõõdukad. Lüütilised bakteriofaagid järgivad tüüpilist viiruse elutsükli, mispuhul faag seondub peremeesorganismi retseptoriga ja viiruse genoom sisestatakse rakku, misjärel bakteri ainevahetus suunatakse ümber viirust tootma ning viimase etapina lüüsitakse peremeesorganism, vabastades keskkonda värskelt sünteesitud virionid. Lüsogeensed bakteriofaagid on seevastu veidi paindlikuma elutsükliga, olles võimelised peremeesbakteri lüüsimise asemel integreeruma bakteri genoomi profaagina ja paljunema bakteri pooldumisel, kuid lülituma hiljem ümber lüütilisele eluviisile või sünteesides pidevalt uusi virione bakterit tapmata (Howard-Varona *et al.*, 2017).

Morfoloogiliselt jagunevad bakteriofaagid valgulise kapsiidi kuju ning saba olemasolu järgi. Kapsiid võib bakteriofaagidel olla hulktahukaline, filamendikujuline või pleomorfne, kusjuures ka nende jaotuste vahel on suur varieeruvus (Joonis 1). Siiski on valdav enamus, hinnanguliselt 96% faagidest hulktahukalise kapsiidi ja sabaga (Ackermann, 2007), kuid ka nende seas on võimalik eristada eraldiseisvaid morfotüüpe nii saba kui ka kapsiidi ehituse poolest.



Joonis 1. Bakteriofaagide erinevad morfoloogiad. (Sanz-Gaitero *et al.*, 2019), kohandatud eestikeelseks, anoteeritud morfoloogiliste fenotüüpide nimetustega.

Genoomi poolest pole bakteriofaagidel ühtset kindlat struktuuri või ülesehitust, mida järgitakse. Kuna üldjuhul on sabaga bakteriofaagide genoom kaheaheelalise DNA (dsDNA) põhine, on enamik kategoriseeritud bakteriofaagidest dsDNA põhised, kuid teiste bakteriofaagide seas võib leida ka üheaheelalise DNA (ssDNA) ja ühe- või kaheaheelalise RNA (ssRNA või dsRNA) genoomiga faage (Ackermann, 2001).

Viiruste ning laiendusena ka bakteriofaagide klassifitseerimine liikideks ja perekondadeks on juba algusest peale olnud keeruline viiruste laia varieeruvuse ning kiire muutlikkuse tõttu. Eesmärgiga luua ühtne süsteem viiruste taksonoomia jaoks loodi aastal 1966 rahvusvaheline viiruste taksonoomia komitee (*International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*), mis on viroloogia valdkonnas keskseks asutuseks – kehtestab reeglid viiruste klassifikatsiooniks ja haldab viiruste taksonoomiliste reeglite ja hetkel tunnustatud taksonoomilise puu andmebaasi (Lefkowitz *et al.*, 2018).

Kuigi varasemalt oli bakteriofaagide taksonoomiline jaotus suuresti üles ehitatud morfoloogia ja geneetilise struktuuri põhjal, on süsteem lähiminevikus seoses sekveneerimise arengu ja kättesaadavuse laienemisega muutunud just genoomijärjestusepõhiseks. Sellega seonduvalt on muutunud ka arvestataval määral faagide klassifitseerimise süsteem ise. Kusjuures alles hiljuti,

2022. aastal, kaotati ICTV süsteemist näiteks ära üldlevinud sugukonnad *Podoviridae*, *Siphoviridae* ja *Myoviridae* oma polüfüleetilise olemuse tõttu ning seeläbi kaotati ka selts *Caudovirales*, mis eelmainitud sugukondi sisaldas (Turner *et al.*, 2023). Otsus tuleneski sugukondades olevate liikide geneetilisest analüüsist, mille käigus leiti, et tegelikult pole paljudel neist otsesest seost, vaatamata sarnasele morfoloogiale (Aiewsakun *et al.*, 2018). Kuigi terminid podoviirus, siphoviirus ja müoviirus on eelnevast süsteemist jäänud alles morfoloogiliste terminitena, ei ole neil enam 2024. aasta seisuga taksonoomilist tähendust. Seltsi *Caudovirales* eesmärki täidab nüüd klass *Caudoviricetes*, mis sisaldab kõiki dsDNA genoomiga, ikosaeedrilise kapsiidiga sabaga faage (Turner *et al.*, 2023).

1.1.2 Bakteriofaagide temperatuuritaluvus

Varasemad uuringud on näidanud, et kolivormseid baktereid nakatavate faagide infektsioonilisus on tugevalt seotud temperatuuriga (Seeley & Primrose, 1980). Nimelt jaotatakse kolifaage temperatuuritaluvuse poolest kolmeks: madala (<30 °C juures nakatavad), keskmise (15–42 °C juures nakatavad) ja kõrge (>25 °C juures nakatavad) temperatuuritaluvusega faagideks (Seeley & Primrose, 1980). Seeley ja Primrose (1980) tulemuste kohaselt sõltub faagide adsorptsioon väliskeskkonna temperatuurist niivõrd olulisel määral, et väljaspool oma spetsiifilist temperatuurinišši ei suuda mitmed bakteriofaagiliigid oma peremeest enam üldse nakatada. Sama uuringu tulemused viitavad ka korrelatsioonile uuritud bakteriofaagide temperatuuritaluvuse ja nende elukeskkonna vahel. Kuigi keskmist temperatuurivahemikku eelistavaid bakteriofaage oli igas proovis, leiti, et jõevees esines lisaks keskmise temperatuuritaluvusega faagidele peamiselt madalat temperatuuri eelistavaid faage ning väljaheiteproovides peamiselt kõrgel temperatuuril nakatavaid faage (Seeley & Primrose, 1980).

Näitena sarnasest fenomenist teiste bakterivormide seas on võimalik tuua Tartu Ülikooli geneetika õppetooli CEPEST (*Collection of Environmental Pseudomonas putida Phages from Estonia*) kollektiooni faagide temperatuuritaluvuse katsetetes, mille käigus uuriti erinevate *P. putida* spetsiifiliste bakteriofaagiperekondade võimekust nakatada peremeestüve temperatuuridel 15–37 °C (Brauer *et al.*, 2024). Leiti, et enamus faagidest kaotavad nakatamisvõime juba 22 °C juures (Brauer *et al.*, 2024). Ainult mõne faagiperekondade temperatuurioptimum paistis olevat hoopis vahemikus 22–30 °C, vaatamata sellele, et CEPEST kollektiooni bakteriofaagid eraldati temperatuuril 20 °C (Brauer *et al.*, 2024).

1.2 *Pseudomonas putida* faagid

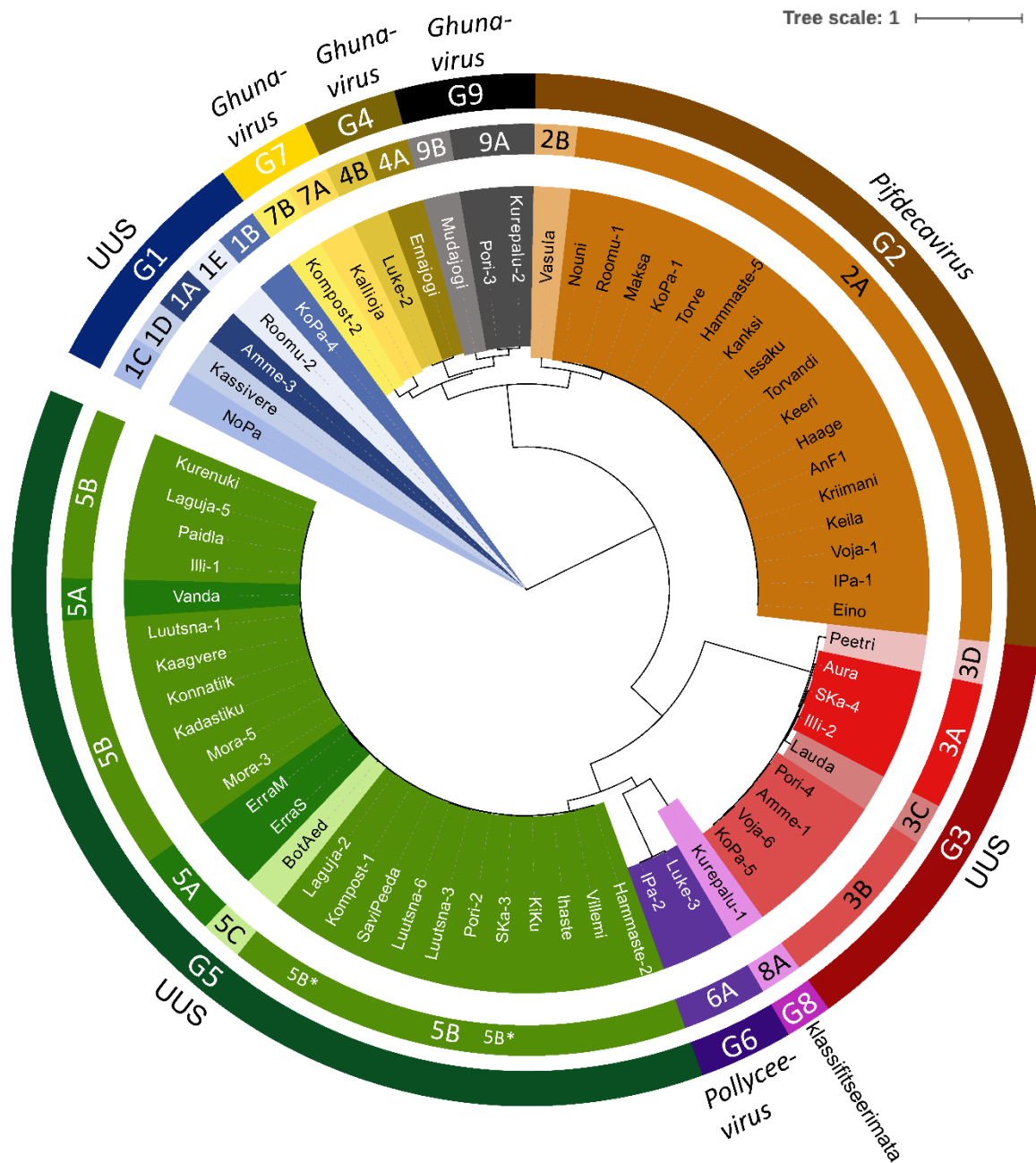
P. putida levinud laboritüve KT2440 (isogeenne tüvele PaW85) nakatavaid bakteriofaage on praeguseks eraldatud ja kirjeldatud võrdlemisi vähe. Näiteks Ngiam kolleegidega (2022), kes uurisid *Escherichia coli* K12 ja *Pseudomonas putida* KT2440 plasmiidipõhist faagiresistentsust, eraldasid ja kategoriseerisid kokku kaheksa erinevat faagiliiki, millest neli olid KT2440 spetsiifilised (artiklis nimetatud kui A8, A9, A10, A11). Ngiam *et al.* (2022) kirjelduse kohaselt on kõik nende eraldatud *P. putida* spetsiifilised faagid podoviiruse morfoloogiaga (Joonis 1). Vaatamata sarnasele morfoloogiale, pärinesid *P. putida* spetsiifilised faagid kolmest erinevast perekonnast ning kaks neist kuulusid isoleerimise hetkel täiesti kategoriseerimata perekonda. Kolm isoleeritud faagi neljast olid lüütilise elutsükliga, kuid faag A8 puhul eeldati, et tegu võib olla mõõduka faagiga (Ngiam *et al.*, 2022).

Lisaks on eraldatud *P. putida* KT2440 tüve nakatav faag, mis isoleeriti *P. putida* tüvega S12 (Jaryenneh *et al.*, 2023). Nimelt suudab faag MiCath nakatada ka KT2440 ainult 10 korda nõrgemalt kui isoleerimiseks kasutatud tüve *P. putida* S12 (Jaryenneh *et al.*, 2023). Morfoloogiliselt on MiCath müoviirus (Joonis 1) ning eluvormilt lüütilise elutsükliga (Jaryenneh *et al.*, 2023). Fülogeneetilise analüüsi käigus selgus, et MiCath, sarnaselt kahele eelmainitud Ngiam *et al* eraldatud faagile (Ngiam *et al.*, 2022), kuulub samuti seni kategoriseerimata faagide perekonda. Eriti huvitav on see, et MiCath on kõigist teistest senimaani sekveneeritud faagidest geneetiliselt väga erinev, sarnanedes enim *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* (Domingo-Calap *et al.*, 2022) bakterit nakatava faagiga, millega MiCath jagab 74.9% identsusega vaid 2% kogugenoomist (Jaryenneh *et al.*, 2023).

1.2.1 Bakteriofaagide kollektsioon CEPEST

CEPEST kollektsioon on Tartu Ülikooli geneetika õppetooli bakteriofaagikollektsioon, mis sisaldab Eesti keskkonnaproovidest eraldatud *P. putida* PaW85 spetsiifilisi bakteriofaage 22 erinevast liigist ja 9 perekonnast (Brauer *et al.*, 2024). Kollektsioon on märkimisväärne, kuna teadaolevalt on tegu kõige suurema *P. putida* bakteriofaagide kollektsiooniga. Kui eelnevalt oli eraldatud vaid üksikuid faage, mis on võimelised *P. putida* PaW85 või KT2440 tüve nakatama, siis CEPEST kollektsioon sisaldab 67 erinevat faagiisolaati (Brauer *et al.*, 2024). Sarnaseid kollektsioone on koostatud ka teistest laborites laialdaselt kasutatavaid bakteriliike nakatavatest faagidest, näiteks *E. coli* spetsiifiliste faagide kogum BASEL, mis sisaldab 68 erinevat liiki (Maffei *et al.*, 2021), 40-liigiline kollektsioon *Staphylococcus* perekonna bakterite

spetsiifilistest faagidest (Alsaadi *et al.*, 2024) või kollektsioon *Salmonella* faagidest, mis sisaldab 10 erinevat *Salmonella* perekonna bakterite spetsiifilist faagiliiki (Bryan *et al.*, 2023).



Joonis 2. CEPEST kollektsiooni faagide fülogeneetiline puu (Brauer *et al.*, 2024). Kohandatud eestikeelseks.

Sarnaselt Ngiam *et al.* (2022) uuringule, kasutati CEPEST kollektsiooni jaoks faagide eraldamisel keskkonnaproove, mida rikastati üleöö peremeesbakteriga (vt. 1.3). Erinevalt eelmainitud uuringust, inkubeeriti aga proove 30 °C asemel temperatuuril 20 °C, põhjusega, et kuigi 30 °C on *P. putida* kasvu jaoks optimaalne temperatuur, ei olnud Brauer *et al.* (2024) tulemustel enam keskkonnafaagidest võimelised sellel temperatuuril baktereid nakatama.

CEPEST kollektiooni bakteriofaagid on kõik segmenteerumata dsDNA genoomiga. Nad on liigitatud 9 erinevasse perekonda või gruppi (G1–G9) VIRIDIC liigitussüsteemi alusel (Brauer *et al.*, 2024; Moraru *et al.*, 2020). Perekondadesse kuuluvate liikide hulk on aga erinev: mõne perekonna grupi faage on eraldatud ebaoproportsionaalselt palju, eriti näiteks perekondadest G2 ja G5, teisi aga selgelt vähem (G7, G8 ja G9) (Brauer *et al.*, 2024).

Kõik CEPEST faagid on sabaga ja ikosaeedrilise kapsiidiga. Huvitaval kombel on valdav enamus kollektiooni bakteriofaagidest podoviiruse morfoloogiaga (Joonis 1), sarnaselt Ngiam *et al.* (2022) poolt leitud faagidele, eranditega vaid G1 ja G3 perekondades, mis analoogselt MiCath faagile on müoviiruse morfoloogiaga (Brauer *et al.*, 2024; Jaryenneh *et al.*, 2023).

1.3 Bakteriofaagide isolatsioonitehnikad

Keskkonnaproovidest bakteriofaagide isoleerimiseks pole ühtset tehnikat, tulenevalt proovide suurest varieeruvusest ja erinevate meetodite tugevustest ja nõrkustest. Üldjuhul järgivad kõik meetodid aga sarnast ülesehitust, kus kõigepealt viiakse prooviga läbi mingisugune töötlus, mis suurendab faagide kogust või kontsentratsiooni proovis.

Kõige laialdasemalt on levinud rikastusel põhinevad isolatsioonimeetodid. Ideeliselt põhinevad rikastusmeetodid faagide loomulikult paljunemistsükli, mispuhul keskkonnaproovile lisatakse suures koguses peremeesbakterit ning seejärel proovi inkubeeritakse, et faagid koos bakteritega proovis paljuneda saaksid. See meetod on kasutuses olnud vähemalt aastast 1966 (Lee & Boezi, 1966) ning tänapäeval on väga paljud bakteriofaagikollektsioonid, kaasa arvatud CEPEST kollektioon (Brauer *et al.*, 2024) üles ehitatud just selle meetodiga.

Rikastuspõhiste meetoditega on ka palju alternatiive. Üheks viimasel ajal väga paljulubavaks osutunud isolatsioonimeetodiks on olnud ZnCl₂-põhine sadestamismeetod, mille täpset protokollid dokumenteeriti esmaselt alles aastal 2015 (Czajkowski *et al.*, 2016). Meetodi eripäraks on see, et erinevalt rikastuspõhistest meetoditest, ei ole selle meetodiga vajalik faagide paljundamine, vaid selle asemel faagid sadestatakse ZnCl₂ lisamisega, mis võimaldab neid kontsentreerida tsentrifuugimise teel (Czajkowski *et al.*, 2016). Sadestamismeetodi üheks väljatoodud eeliseks on selle relatiivne kvantitatiivsus, andes parema ülevaate proovis olevast faagide kogusest, kuna puudub vaheetapp, kus faagide kogus eksponentsiaalselt tõuseb. Bakteriofaagide koguse muutumatus proovis võib hõlbustada ka väiksema nakatavusega bakteriofaagide eraldamist, kuna kiiremini paljunevate faagiliikide üle kasvamise võimalus on

väiksem. Sadestamismeetodit kasutati peamise isolatsioonimeetodina näiteks 68-liigilise BASEL faagikollektsiooni loomisel (Maffei *et al.*, 2021).

Bakteriofaagide olemasolu tuvastamiseks töödeldud proovides on mitmeid erinevaid meetodeid nende visualiseerimiseks, kuid keskkonnaproovidest üksikute liikide eraldamiseks on kõige laialdasemalt levinud laiguanalüüs. Põhimõtte poolest kujutab laiguanalüüs endast töödeldud faage sisaldava proovi kandmist üle topeltkihiga agarplaadile, mille söötmekihile valatakse peremeestüve ja faagiproovi sisaldav pehmeagari kiht, mis läbi muutuvad faagid nähtavaks moodustades selgeid faagilaike läbipaistmatus bakterimurus (Hyman, 2019). Seeläbi on võimalik kindlaks teha faagide olemasolu proovis ning eraldada üksikuid bakteriofaagiliike.

Laiguanalüüsil on omad puudujäägid, millest peamiseks on selle kallutatus lüütiliste faagide eraldamise suunas. Kuna mõõdukad faagid ei tapa alati peremeesbaktereid, ei pruugi tassidel need faagid laiike tekitada ning seetõttu võivad need jääda märkamatuks. Lisaks on suure faagikogusega keskkonnaproovidega võimalus, et isolatsioonitassidel domineerivad tugevama infektsioonilisusega faagide liigid, mis võivad varjutada nõrgema nakatavusega faagide ilmnemise.

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Eelmainitud CEPEST kollektsooni (käesolev töö peatükk 1.2.1) kuulub palju erinevaid bakteriofaage, kuid siiski pole kollektsoon veel terviklik ning esineb mitmeid puudujääke. Kuigi kollektsoonis on liike palju, on need üldjoontes väga sarnased, olles kõik segmenteerumata dsDNA genoomiga ja lüütilise elutsükliga. Lisaks on mõned perekonnad (näiteks G2 ja G5) tugevalt ülesindatud võrreldes teistega. CEPEST faagid isoleeriti rikastusel põhineva meetodiga temperatuuril 20 °C.

Käesoleva töö eesmärk oli CEPEST kollektsooni täiustamine vähem esindatud faagiliikidega ning seejuures ka võimaluste uurimine, kuidas tulevikus rohkem haruldasi faage eraldada. Seega sätestati eesmärkideks:

1. Kolme erineva faagieraldusmeetodi ning isoleerimistemperatuuri kasutamine, et eraldada võimalikult palju erinevaid *P. putida* PaW85 nakatavaid bakteriofaage.
2. Eelmainitud kolme meetodi ja isoleerimistemperatuuri võrdlemine, et optimeerida *P. putida* faagide eraldamise meetodikat.
3. Isoleeritud bakteriofaagide klassifitseerimine ja esialgne kirjeldamine.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud materjalid, tüved, praimerid

Baktereid kasvatati vedelas LB täissöötmes (ingl. k. *lysogeny broth*) (10 g/l trüpton, 5 g/l pärmiekstrakt, 10 g/l NaCl) aereerides kultuure loksutil, LB pehmeagar söötmes (0,3% agar) või LB tardsöötmele (1,5% agar). Töös kasutati metsiktüüpi *P. putida* PaW85 tüve ja kahte *P. putida* PaW85 laboritüve derivaati: $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ (Tabel 1). Baktereid kasvatati temperatuuril 20 °C (kui ei ole märgitud teisiti). Faagilahjendused tehti SM puhvril (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris pH 7.5, 0.01% želatiin). Tardsöötmed faagide isoleerimisel, tiitri määramisel ja testimisel sisaldasid faagide lüütilise tsükli indutseerimiseks antibiootikumi tsiprofloksatsiin (cip, 0,03 µg/ml, kui ei ole mainitud teisiti).

Faagide isoleerimiseks kasutati kolme erinevat isolatsioonimeetodit. Ühe meetodi jaoks oli veeproovide puhul 50 ml uuritavat vett, mullaproovide puhul ligikaudu 16 ml mulda, mille maht viidi 50 ml-ni, segades mulda rikastusmeetodite puhul 0,5 x LB (5 g/l trüpton, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l pärmiekstrakt) vedelsöötmelega või sadestamise puhul PBS (ingl. k. *phosphate buffered saline*) puhvriga (pH 7.4, 37 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄).

Tabel 1. Töös kasutatud *Pseudomonas putida* tüved.

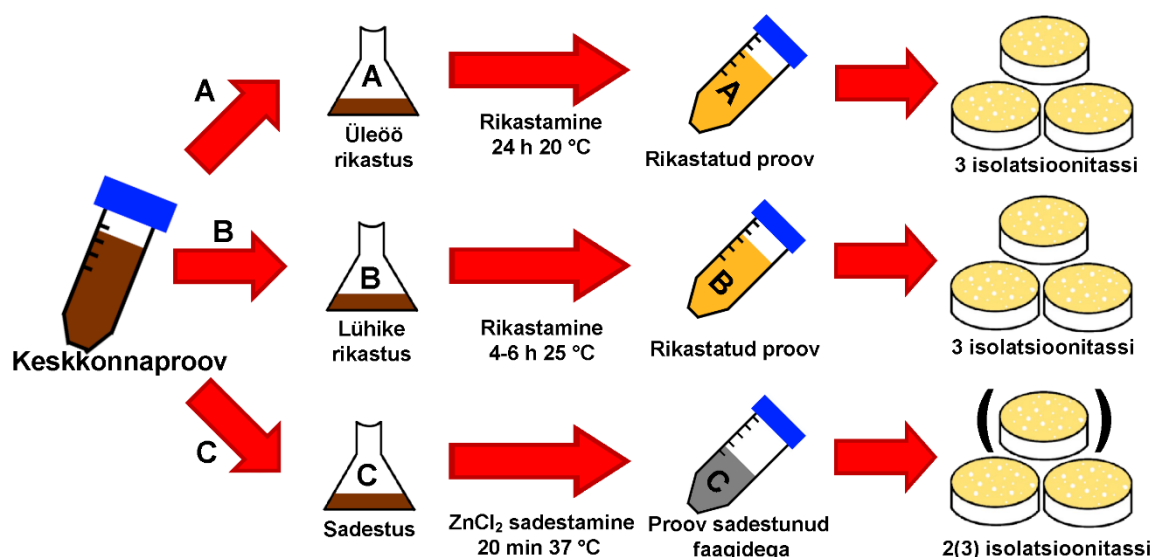
Tüve nimi	Tüve kirjeldus	Allikas
PaW85	<i>Pseudomonas putida</i> metsiktüvi, isogeenne tüvega KT2440 (Regenhardt <i>et al.</i> , 2002)	(Rosendahl <i>et al.</i> , 2020)
$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	PaW85 tüve derivaat, millest on eemaldatud 13 toksiin-antitoksiin süsteemi (Rosendahl <i>et al.</i> , 2020) ja 4 krüptilist profaagi	(Brauer <i>et al.</i> , 2024)
$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüve derivaat, millest on lisaks eemaldatud Gabija (PP_3680-3681), RloC (PP_3692) ja Wadjet (PP_3698-3694) –võimalikud faagikaitse süsteemid (Cheng <i>et al.</i> , 2023; Davidov & Kaufmann, 2008; Deep <i>et al.</i> , 2022)	Andres Ainelo ja Sirli Rosendahl

2.2.2 Isolatsioonimeetodid

Kõikidest keskkonnaproovidest faagide eraldamiseks kasutati kolme meetodit (Joonis 3). Kokku uuriti töös 11 erinevat keskkonnaproovi, sealhulgas kahe vee- ja üheksa mullaproovi (Tabel 2). Peremeesbakterina kasutati *P. putida* PaW85 derivaattüvesid $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ või $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$.

Tabel 2. Töös uuritud keskkonnaproovid, nende töötlemisel kasutatud *P. putida* tüved.

Proovi nimi	Proovi kirjeldus	Kasutatud tüvi
Tõrva Kompost (TOKO)	Muld kompostihunnikust	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$
Tõrva Tiik	Mudane tiigivesi	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$
Tõrva Õhne	Mudane jõevesi	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$
Tõrva Känd (TOKA)	Muld kõduneva kännu juurte ümbrusest	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$
Eisma Kivi all (EIKI)	Muld kivi alt	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$
Kerna Kompost (KEKO)	Muld kompostihunnikust	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$
Rita Aed Vana Kompost	Muld kompostihunnikust	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$
Tõrva Mutimuld (TOMU)	Muld mutimullahunnikust	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$
Eisma Teetruup	Mudane muld teetruubist	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$
Saaremaa kraaviperv	Mudane muld kraavipervest	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$
Kivimüüri Lillede muld	Muld lillepeenrast	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$



Joonis 3. Lihtsustatud ülevaade kasutatud isolatsioonimeetoditest. Üks keskkonnaproov jaotati laiali kolme meetodi peale. A: proovi rikastamine üleöö 20 °C, B: rikastus, kuid temperatuuril 25 °C 4–6 h, C: faagide kontsentreerimine ZnCl₂. Faagilahusest (A ja B) või lahustatud faagisademest (C) valati isolatsioonitassid.

2.2.2.1 Üleöö rikastus

Üleöö rikastusmeetodi (Joonis 3A) jaoks lisati 50 ml veeproovile või lahustatud mullaproovile 2,5 ml 10-kordset LB vedelsöödet, 1 ml peremeesbakteri eksponentsiaalses kasvufaasis peremeesbakteri ($OD_{580} \approx 1$) ning cip-i (lõppkontsentratsioon 0,01 µg/ml). Segu inkubeeriti 200–250 ml koonilises kolvis aereerides 120 RPM (GFL 3017 *Orbital Shaker*) temperatuuril 20 °C

üleöö. Järgmisel päeval tsentrifugeeriti 50 mL segust rakud ja mittelahustuv fraktsioon põhja (2370 g juures *Hettich Universal 320R* tsentrifuugiga 15 min).

Lahustuv osa filtreeriti läbi 0,45 µm süstlafiltri, et eemaldada järelejäänud mullaosakesed ja vähendada ülekandunud bakterite osakaalu proovis. Pärast seda valati proovist topeltagariga tassid. Tasse valmistati kolm. Selleks segati kokku 12 ml filtraati, 75 µl 1 M CaCl₂ (lõppkontsentratsioon 5 mM), 600 µl eksponentsiaalses kasvufaasis peremeesbakteri vedelikultuuri (OD₅₈₀≈1) ja 3 ml 1,5% LB-agar söödet (lõppkontsentratsioon 0,3%) Segu valati kolmele cip-i sisaldavale LB tardsöötme tassile. Tasse inkubeeriti üleöö kas 20 °C või üks tass 15 °C, teine 20 °C ja kolmas 25 °C.

2.2.2.2 Lühike rikastus

Lühikese rikastuse (Joonis 3B) jaoks rakendati üleöö rikastusele sarnast töökäiku (peatükk 2.2.2.1), kuid uuritavale proovile lisati 100 µl peremeesbakteri üleöö bakterikultuuri, 2,5 ml 10-kordset LB vedelsöödet ja cip-i (lõppkontsentratsioon 0,01 µg/ml).

Kõige suuremaks erinevuseks eelkirjeldatud meetodiga oli see, et üleöö rikastamise asemel rikastati proovi ~5 tundi temperatuuril 25 °C (et kiirendada bakterite jagunemistsükli ja tagada kiirem rikastus). Peale rikastamist tsentrifugeeriti proovi *Sorval RC5* tsentrifuugiga 7000 g 15 min ning supernatant filtreeriti läbi 0,45 µm süstlafiltri.

Edasine protsess sarnanes üleöö rikastusele. 12 ml filtraadist valati kolm topeltagariga tassi cip-i sisaldavale LB agarsöötmele), mida inkubeeriti üleöö kas ainult 20 °C või üks tass 15 °C, teine 20 °C ja kolmas 25 °C.

2.2.2.3 Sadestamine

Sadestamismeetodi (Joonis 3C) puhul puudus rikastamise etapp täielikult. Mullaproovi puhul segati muld PBS puhvril *end-to-end* segajaga temperatuuril 4 °C üleöö, et mullas olevad faagid liiguksid vedelfaasi. Muld tsentrifugeeriti põhja kasutades *Sorval RC5* tsentrifuugi 7000 g juures 12 min. Supernatant filtreeriti läbi 0,45 µm süstlafiltri. Filtraadile lisati 2 M ZnCl₂ lahust, lõppkontsentratsiooniga 40 mM. Suure bakteriofaagide koguses korral ilmus ZnCl₂ lisamisel koheselt valge sade. Lahust inkubeeriti 20 min temperatuuril 37 °C, seejärel tsentrifugeeriti sade põhja *Sorval RC5* tsentrifuugiga (7000 g, 15 min) ja eemaldati vedelik. Põhja jäänud sade suspendeeriti õrnalt 1 ml SM puhvril ja loksutati 15–60 min 20 °C (160 RPM), et bakteriofaagid uuesti vedelfaasi lahustuksid. Seejärel kanti lahust uude 1,5 ml Eppendorfi tuubi. Sade tsentrifugeeriti põhja lauatsentrifuugiga (*Eppendorf MiniSpin*) 13400 RPM 3 min, supernatanti kasutati topeltagariga tasside valamiseks.

Valati kaks või kolm tassi. Selleks lisati supernatandile CaCl₂ (lõppkontsentratsioon 5 mM), 600 µl ergutatud üleöö peremeesbakteri kultuuri (võeti tassi kohta 100 µl üleöö kultuuri, bakterid tsentrifugeeriti põhja lauatsentrifuugil, vana sööde eemaldati, asendati 600 µl värske söötmega ja suspendeeriti) ja maht viidi LB pehmeagar söötmega (0,3% agar) 10 või 15 ml-ni. Ühe tassi kohta valati 5 ml segu cip-i sisaldavale LB tardsöötme tassile. Tasse inkubeeriti üleöö kas ainult 20 °C või üks tass temperatuuril 15 °C, teine 20 °C ja kolmas 25 °C.

Iga keskkonnaprooviga tehti paralleelselt läbi kõik kolm uuritavat meetodit (Joonis 3).

Kui järgneval päeval esinesid tassidel faagilaigud, võeti need üles 1000 µl pipeti otsikuga, mille ots oli ära lõigatud (et laiendada otsiku ava). Laigud suspendeeriti 100 µl SM puhvril.

2.2.3 Bakteriofaagide perekondade määramine

Eraldatud faagilaike testiti perekonnakuuluvuse osas kasutades PCR (*Polymerase Chain Reaction*) meetodit ja perekonnaspetsiifilisi praimereid (Tabel 3). Ühe proovi lõppmahuks oli 20 µl, mis sisaldas 1 x PCR puhvrit (*DreamTaq Green Buffer 10x*); 0,2 mM dNTP segu; 10 pmol mõlemat praimerit; 1 ühik DNA Taq polümeraasi (*DreamTaq DNA polymerase*). Iga proovi kohta kasutati 2 µl testitavat faagilahust.

PCR programm koosnes enamasti 25, mis sisaldas etappe:

1. Denaturatsioon – 96 °C 30 sekundit
 2. Praimeri seondumine – 55 °C 30 sekundit
 3. DNA süntees – 72 °C 30–40 sekundit.
25. tsüklile järgnes 2 minutiline lisasüntees temperatuuril 72 °C, et lõpetada pooleliolevate ahelate süntees.

Bakteriofaagide perekondade testimist alustati enamasti G5 perekonnast, et lihtsustada järgnevate testide ettevalmistamist, saades lahti võimalikult paljudest vähem huvipakkuvatest faagidest. Edasine testide järjekord otsustati laikude suuruse ja võimalusel eralduse inkubatsioonitemperatuuri järgi, võttes arvesse erinevate perekondade tüüpilisi laigusuurusi ja temperatuurieelistusi. Iga perekonna testimisel tehti ka positiivne kontrollproov eelnevalt isoleeritud bakteriofaagiga.

Peale PCR programmi lõppu kanti 10 µl proovi 1% agarosogeelile, mis valmistati lisades agarosiooni (0,01 g/ml) ja etiidiumbromiidi (0,2 µg/ml) 1-kordsele TAE (Tris-atsetaat-EDTA)

puhvri, mis omakorda valmistati lahjendades 50-kordset TAE puhvrit (2 M Tris-alus, 1 M etaanhape, 0,05 M EDTA pH 8,0) veega. Geelektroforees viidi läbi 130 V juures 12 min. Et hinnata DNA fragmentide suurust lisati proovide kõrvale geelile DNA markerit *ZipRuler Express DNA Ladder 1, ready-to-use (Thermo Scientific)*. DNA visualiseeriti UV valguses. Positiivse tulemuse korral oli bakteriofaagi perekonda kuuluvus kinnitatud, negatiivse tulemuse korral jätkati uute praimeritega testimist.

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid bakteriofaagide perekondade määramiseks.

Praimeri nimi	Järjestus	Otstarve
G1-orf17-L	GGAAGAAGGGAACAGAGGCT	G1 perekonnaspetsiifiline praimer
G1-orf17-R	GCCAATCTGTCTGCTCCATG	G1 perekonnaspetsiifiline praimer
G2(F1)-orf33-L	CCCTGAAGAAGCTCGCAATGG	G2 perekonnaspetsiifiline praimer
G2(F1)-orf33-R	TCTTCCCCGTCGATCTCTTG	G2 perekonnaspetsiifiline praimer
Aura-orf24-I-L	GTCGCGGTTGTTGTACTTGT	G3 perekonnaspetsiifiline praimer
Aura-orf24-I-R	CTGATCACCAAAGACGACGG	G3 perekonnaspetsiifiline praimer
G4-orf41-L	TGATGATCGACCGACCAGAG	G4 perekonnaspetsiifiline praimer
G4-orf41-R	GACGTTGATCTCGAAGGCAC	G4 perekonnaspetsiifiline praimer
G5(Konna)-orf46-L	AGATAGAGGATGACGACCCG	G5 perekonnaspetsiifiline praimer
G5(Konna)-orf46-R	GTACCCGGTGAACATCTCGT	G5 perekonnaspetsiifiline praimer
G6(Luke3)-orf44-L	GACCTGACCAACGGAACAAC	G6 perekonnaspetsiifiline praimer
G6(Luke3)-orf44-R	GGACGACGTATTCCCGGATA	G6 perekonnaspetsiifiline praimer
G7-orf43-L	CACCATGCAGATCCTCATCA	G7 perekonnaspetsiifiline praimer
G7-orf43-R	GGACTTGACTCATGAAGCCG	G7 perekonnaspetsiifiline praimer
G8-orf38-L	GAACGCTTGCCTGAAATCCA	G8 perekonnaspetsiifiline praimer
G8-orf38-R	GATGTGTACGACCATGCTGC	G8 perekonnaspetsiifiline praimer
G9A-orf40-L	TTGGTCGTGGCGTTTACTTC	G9A perekonnaspetsiifiline praimer
G9A-orf40-R	CGTCACTTGTCGCTTCATGT	G9A perekonnaspetsiifiline praimer
G9B-orf36-L	TCCCTGTTCCCGAAAGACTC	G9B perekonnaspetsiifiline praimer
G9B-orf36-R	ACAATTTGCAGAACGGTCCC	G9B perekonnaspetsiifiline praimer
G10 (PuKo-2)-L	GTCACCACTATCGCACCAAC	G10 perekonnaspetsiifiline praimer
G10 (PuKo-2)-R	ACGAGGAAGTCACAGGTCTG	G10 perekonnaspetsiifiline praimer

2.2.4 Faagi puhastamine

Kuigi bakteriofaagide perekonda on võimalik määrata PCR teel ka ilma puhastamise etapita (kuna ülesvõetud laigus on suure tõenäosusega ülekaalukalt ühte faagiliiki), on bakteriofaagi säilituskultuuri tegemiseks ning DNA eraldamiseks vajalik faagiproovi edasine puhastus, et

vältida võimalikke sekundaarseid üksikfaage, mis võisid olla proovi sattunud. Selle tarvis viidi läbi iga huvipakkuva prooviga kolm järjestikust puhastuskülvi.

Puhastuskülvi jaoks kasutati topeltagariga tasse, kus alumiseks kihiks oli cip-i sisaldav LB tardsööde (20 ml), pealmiseks kihiks 200 µl *P. putida* Δ13TAΔ4φ tüve eksponentsiaalse faasi rakke (OD₅₈₀≈1) ja 10 mM CaCl₂ sisaldav LB softagari segu (5 ml). Enne ülemise kihi tardumist kasteti steriilse puutiku ots puhastatava bakteriofaagi proovi segusse ning tõmmati korduvalt läbi agarikihi. Seejärel tõmmati uue steriilse puutikuga uuesti läbi agarikihi, läbides tõmmete alguses eelmist külvijälge. Protsessi korrati ka kolmanda puutikuga, et ajada faagisegu laiali nii, et saaks eristada üksiklaike. Tasse inkubeeriti üleöö algusel isolatsioonitemperatuuril. Seejärel võeti uus üksiklaik üles 100 µl SM puhvril. Protsessi korrati veel kaks korda.

2.2.5 Faagi paljundamine

Eesmärgiga suurendada faagilahuse kogust (edasisteks katseteks ja DNA eralduseks), valati paljundustassid. Et saavutada maksimaalne faagitiiter lahuses, viidi enamasti protsess läbi mitmes etapis. Kõigepealt valmistati faagilahus ühele tassile. Selleks segati CaCl₂ (lõppkontsentratsioon 10 mM), 200 µl eksponentsiaalses faasis Δ13TAΔ4φ tüve vedelkultuuri (OD₅₈₀≈1) ja 5 ml 0,3% LB agari segu. Segusse lisati 50 µl puhastatud faagilaigusegu ja valati cip-i sisaldavale LB tardsöötmel ning inkubeeriti üleöö isolatsioonitemperatuuril. Järgmisel päeval kraabiti külviaasaga kokku faagi sisaldav peamine agari kiht 50 ml Falconi tuubi, lisati 700 µl SM puhvrit ja 100 µl kloroformi, agaritükid lagundati väiksemateks kasutades *Minicentrifuge-vortex* masinat (*Biosan Microspin FV-2400*), segati orbitaalsegajal 20 min–1 h maksimaalsetel pööretel (*IKA MS3 Basic*), seejärel tsentrifugeeriti agar toru põhja 15 min 2370 g tsentrifugeerimisega *Hettich Universal 320R*. Supernatant filtreeriti 0,22 µm poorisuurusega süstlafiltriga. Määrati faagitiiter (peatükk 2.2.6) CaCl₂ (10 mM) ja cip-i sisaldavatel topeltagariga tassidel, mida inkubeeriti temperatuuril 20 °C.

Kui faagitiiter oli teada, optimeeriti igasse tassi lisatava faagilahuse kogust. Võimalikult suure tiitri jaoks oli vaja, et bakterid suudaksid võimalikult palju paljuneda, enne kui bakteriofaagid neid lüüsisid, seega püüti visuaalselt saada tasse, kus faagilaigud olid vaid vaevu eristatavad ja iga laigu vahel vaid õrn bakterite kasvukiht. Optimaalse lahuse koguse hindamiseks kasutati laborisiseselt välja töötatud subjektiivset hinnangut sõltuvalt paljundatava faagilaigu suuruselt (Tabel 4). Tasse tehti suurema lõppmahu saamiseks tihti rohkem kui üks, enamasti kolm.

Tabel 4. Laborisisene reeglistik, mille kohaselt lauslüüsitassidele faagilüsaati lisati.

Faagilaigu suurus (mm)	PFU/plaat
5	1000–2000
2	20 000–25 000
1–1,5	50 000–150 000
<1	500 000

2.2.6 Faagitiitri määramine.

Faagitiitri määramiseks või faagitaluvuse testimiseks valati topeltagariga tassid. Selleks valati cip-i sisaldavale LB tardsöötme tassile 5 ml LB pehmeagari segu kiht, kuhu oli lisatud CaCl₂ (lõppkontsentratsioon 10 mM) ja 200 µl eksponentsiaalses faasis Δ13TAΔ4φ bakterikultuuri (OD₅₈₀≈1). Faagilahustest tehti kümnekordsete lahjenduste read SM puhvriga, enamasti vahemikus 10⁻²–10⁻⁸, lisades 10 µl lahust 90 µl SM puhvrile ja segades, korrates protsessi eelneva lahjendusega. Bakterimurule külvati 1,5 µl iga lahjendust, tilkadel lasti imbuda agarkihti ning inkubeeriti temperatuuril 15 °C või 20 °C üleöö.

Järgmisel päeval vaadeldi moodustunud faagilaikude hulka ja arvutati faagilahuse tiiter PFU/ml s.o. infektsiooniliste faagide hulk (*plaque forming unit*) ühes milliliitris.

2.2.7 Faagi DNA eraldus

Iga uuritava bakteriofaagi kohta võeti kokku 2 x 1 ml eelnevalt valmistatud faagilüsaati. Mõlemale faagilahusele lisati 4 µl RNAasi (10 mg/ml *Thermo Scientific*), 2 µl DNAasi I (1 U/µl *Thermo Scientific*) ning inkubeeriti toatemperatuuril (22 °C) 1 h, et lagundada faagipartikliväline DNA ja RNA.

Lahuses olevate bakteriofaagide sadestamiseks lisati igale segule 20 µl 2 M ZnCl₂ ning inkubeeriti 10 min 37 °C. Kasutades lauatsentrifuugi (*Eppendorf MiniSpin*, 1 min 13400 RPM) eraldati sadestatud faagid lahusest. Eemaldati supernatant, sade võeti üles 200 µl TES puhvril (0,1 M Tris-HCl (pH 8,2), 0,1 M EDTA, 0,3% SDS) ja proovid tõsteti kokku. Bakteriofaagide kapsiidide lagundamiseks lisati 4 µl proteinaas K (*Thermo Scientific*, ~20 mg/ml), inkubeeriti temperatuuril 60 °C 1 h. Reaktsiooni peatamiseks ja valgujääkide sadestamiseks lisati 40 µl kaaliumatsetaati ja tuubi hoiti jäävannis 15 min. Sadestatud kapsiidijäägid tsentrifugeeriti põhja 1 min 10000g temperatuuril 4 °C ning lüsaat eraldati sademest. Faagigenoomide sadestamiseks lisati lüsaadile võrdses mahus (440µl) isopropanooli (99,9%) ning hoiti jääl 5 minutit.

Lahusest välja sadenenud DNA tseentrifuugiti põhja lauatsentrifuugil 8 min 13400 RPM (*Eppendorf MiniSpin*). DNA sadet pesti kaks korda 200 µl 80% etanooliga, pestud DNA sade kuivatati etanooli jääkidest ja võeti üles 60 µl vees.

DNA olemasolu kontrollimiseks võeti 4 µl DNA lahust, mida segati 2 µl värviga (*New England Biolabs Gel Loading Dye, Purple 6X*) ning viidi läbi geelelektroforees (0,2 µg/ml etiidiumbromiidi sisaldav 1% TAE agarosogeel, 12 min 130V) DNA visualiseeriti UV valguses.

Peale genoomipuhastuse efektiivsuse kontrolli puhastati saadud faagi DNA proov kasutades *Zymo Research DNA clean and concentrator-5* komplekti järgides tootja protokoll. DNA elueeriti komplekti kolonnilt 60 µl veega.

2.2.8 Faagide esmane kirjeldus

Isoleeritud faagidega testiti faagide temperatuuri- ja söötmeelistust ning sõltuvust peremeestüvest.

Valati topeltagariga tassid nagu faagitiitri määramisel (peatükk 2.2.6), kuid varieeriti LB tardsöötme c/p sisaldust (0 või 0,03 µg/ml), LB pehmeagari CaCl₂ sisaldust (lõppkontsentratsioon pehmeagari kihis 0 või 10 mM) ja kasutatud eksponentsiaalses faasis (OD₅₈₀≈1) peremeesbakteri tüvesid (olenevalt katsest PaW85, Δ13TAΔ4φ või Δ13TAΔ4φΔGaRloWa).

Faagidest tehti 10-kordsete lahjenduste read vahemikus 10⁻²–10⁻⁷, tassidele kanti 2 µl tilgad. Tasse inkubeeriti üleöö temperatuuril 15 °C, 20 °C, 22 °C, 25 °C, 30 °C või 37 °C.

2.3 Tulemused

2.3.1 Üleöö rikastus oli kõige saagikam

CEPEST kollekttsioonis on perekonnaklastrid G5 ja G2 üleesindatud ((Brauer *et al.*, 2024) ja käeoleva töö peatükk 1.2.1), seega rakendati kollekttsiooni laiendamiseks vähem esindatud faagiliikidega erinevaid faagiisolatsiooni meetodeid. Esimesed 5 keskkonnaproovi testiti läbi *P. putida* tüvega $\Delta 13TA\Delta 4\phi$. Iga individuaalse keskkonnaprooviga tehti läbi kolm erinevat isolatsioonimeetodit (peatükk 2.2.2). Tasse inkubeeriti pärast proovi töötlemist üleöö temperatuuril 20 °C.

Kokku testiti eelmainitud meetodikaga kahte veeproovi ning kolme mullaproovi (Tabel 2). Kuigi veeproovide puhul oli algse proovi osakaal suurem (ühe proovi kohta testiti 150 ml vett, mulda 50 ml, lahustatud veega 150 ml-ni), ei suudetud kummaski veeproovist ühtegi faagi isoleerida, kuna ühtegi faagilaiku tassidele ei tekkinud, olenemata meetodist (Tabel 5).

Tabel 5. Ülevaade $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüvega töödeldud proovidest, nende saagikusest ning mitte-G5 bakteriofaagide osakaalust testitud laikude seas sõltuvalt meetodist.

Proov	Proovi tüüp	Meetod	Laike/tass	Testitud laigud	Mitte-G5	% Mitte-G5
Tõrva Kompost (TOKO)	muld	üleöö rik.	lauslüüs	0	0	
		lühike rik.	100	10	3	30%
		sadestus	20	10	0	0%
Tõrva Tiik	vesi	üleöö rik.	0			
		lühike rik.	0			
		sadestus	0			
Tõrva Õhne	vesi	üleöö rik.	0			
		lühike rik.	0			
		sadestus	0			
Tõrva Känd (TOKA)	muld	üleöö rik.	lauslüüs	0	0	
		lühike rik.	20	14	1	7%
		sadestus	100	10	0	0%
Eisma Kivi All (EIKI)	muld	üleöö rik.	10	10	10	100%
		lühike rik.	0			
		sadestus	0			
KOKKU				54	14	

Kuigi proovid olid eelnevalt läbi segatud ning seetõttu tõenäoliselt homogeense bakteriofaagide jaotusega, olid bakteriofaagilaikude kogused sama prooviga kasutatud isolatsioonimeetodite lõikes väga erinevad. Läbivalt oli kõige rohkem faagilaike tassidel, mis olid valatud pärast üleöö rikastuse meetodiga isolatsiooni. Mõnede proovide puhul oli algne faagide tase proovis niivõrd suur, et kõik bakterid üleöö rikastamise meetodi järgselt valatud tassidel olid järgmiseks päevaks täielikult lüüsunud, muutes seeläbi üksikute bakteriofaagilaikude eraldamise

võimatuks (näide isolatsioonitassidest kasutades $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ toodud Joonis 4). On tähelepanuväärne, et teiste meetoditega ei esinenud isolatsioonitassidel kunagi lauslüüsi.



Joonis 4. TOKO proovi isolatsioonitassid erinevatel meetoditel. Kujutatud vasakult paremale: lühike rikastus (~100 laiku), sadestamine (20 laiku), üleöö rikastus (lauslüüs).

Lühikese rikastuse ning sadestamismeetodiga isoleerimisel tekkis faagilaike tassidel üldjuhul vähem. Kuigi eeldatavalt oleks võinud kõige vähem laike olla sadestamistassidel (kuna rikastamisetapp selle meetodiga puudub), ei olnud see alati nii. $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüvega testitud viie proovi seas ilmnis laike sadestamis- ning lühikese rikastuse meetodil ainult kahe prooviga, kusjuures ühel juhul oli laike suurusjärgu võrra rohkem sadestamismeetodil, teisel juhul lühikese rikastuse meetodil (Tabel 5).

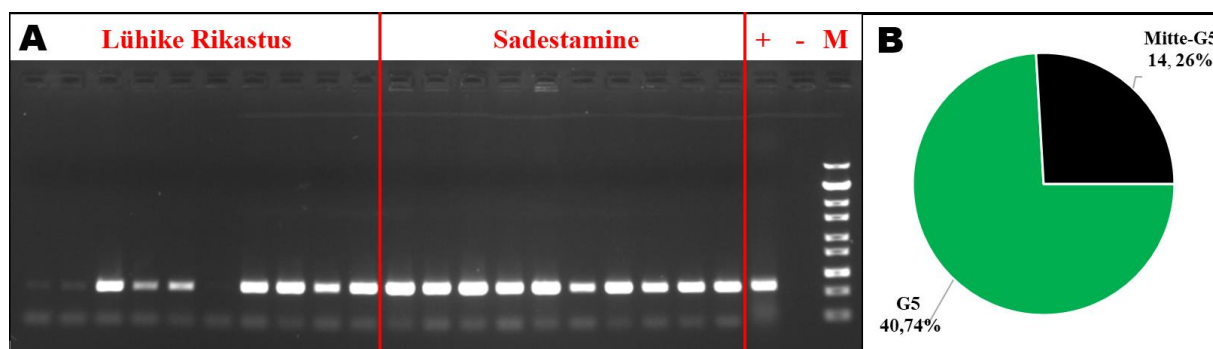
Kuna isolatsioonitassidel oli mõnikord laike üle saja, ei olnud võimalik kõiki tassidel olevaid faagilaike testida. Üldjuhul erinesid tassidel ilmnenuid laigud nii laigu läbimõõdu kui ka hädususe poolest. Seetõttu valiti iga meetodi kohta kuni 10 erinevat faagilaiku, mis olid üksteisest fenotüübiliselt võimalikult erinevad, et suurendada tõenäosust erinevate faagide isoleerimiseks ja vähendada duplikaatide valimise riski.

2.3.2 $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüvega isoleeriti peamiselt G5 faage sõltumata meetodist

Kuigi tassidelt eraldatud bakteriofaagid olid vaatluse järel välimuse järgi võimalikult mitmekesised, oli testitud faagide seast suur enamus CEPEST kollektsiooni G5 perekonnast. Kõigi $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüvega testitud keskkonnaproovide peale kokku testiti PCR meetodiga 54 erinevat faagilaiku, kuid ainuüksi 14 neist osutusid mõne haruldasema perekonna liikmeks. Näiteks Tõrva Komposti proovist valitud faagidest 20-st testitud proovist vaid kolm ei kuulunud PCR tulemuste järgi G5 perekonda (Joonis 5) ning hilisemate analüüside järel selgus,

et vähemalt kaks neist olid ka sama liigi esindajad. See tähendab, et 74% testitud bakteriofaagidest olid G5 perekonna esindajad, mis kajastus ka üldistes PCR tulemustes (Joonis 5). Lõplikult isoleeriti ja kategoriseeriti esmase lähenemisega viis erinevat faagi.

Seejuures tuleb siiski silmas pidada, et 10 eelmainitud mitte-G5 faagilaikudest eraldati samast keskkonnaproovist (Eisma Kivi All, EIKI) ning üldjuhul kattusid nende laikude fenotüübid (väga hägune, 0,5–1 mm). Võib eeldada, et tegu oli suuresti sama liigi esindajatega, kuid kuna duplikaatsuse kahtlustel viidi läbi puhastus, DNA eraldus ja sekveneerimine vaid kahe bakteriofaagilaiguga kümnest, mis kõige enam fenotüübiliselt erinesid (kuigi laikude läbimõõt oli sarnaselt 1 mm, erinesid laigud eraldamisel märgatavalt laigu hägususe poolest: esimene faagilaik oli umbmääraste äärtega ja hägune ning teine selge ning defineeritud piiriga). On tähelepanuväärne, et kaks testitud laiku osutusid tõepoolest erinevateks liikideks, EIKI1 ja EIKI2 (Lisa 1).



Joonis 5. G5 faagide osakaal isolatsioonil $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ peremeestüvega. A: PCR tulemused kasutades G5 perekonna spetsiifilisi praimereid TOKO proovist eraldatud faagidest kahe meetodiga. „+“ tähisega on tähistatud positiivne kontroll, „-“ tähisega negatiivne kontroll, „M“ tähisega marker (*GeneRuler Express DNA Ladder 1*). B: ülevaade kõigist $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüvega eraldatud ja PCR meetodiga testitud faagide kuuluvusest G5 perekonda (roheline) ja mitte-G5 perekonda (must).

2.3.3 G5 faagide vältimiseks kasutati kahte meetodit

Eelnevate katsete tulemustest ilmnes, et üheks suuremaks probleemiks keskkonnaproovide eraldamisel oli ka CEPEST kogumikus ülesindatud bakteriofaagide üleküllus proovides. Kuigi laike oli tassidel tihti väga palju, ei ole enamasti visuaalselt võimalik bakteriofaagiperekondi eristada ning seetõttu sattus nende ilmse arvukuse tõttu paratamatult valimisse rohkem „soovimatuid“, ehk juba varasemalt arvukate esindajatega perekondasse kuuluvaid faage.

Eesmärgiga selekteerida tõhusamalt juba enne laikude eraldamise etappi välja haruldasemaid bakteriofaage, rakendati järgmise kuue prooviga mitmeid uusi võtteid. Lisaks meetodite täiendamisele mindi ka keskkonnaproovide valimisel üle täielikult mullaproovidele, jättes

kõrvale veeproovid. Seni kogutud andmete põhjal paistis, et veeproovide puhul on laikude saagikus madalam kui mulla- ja kompostiproovidel.

2.3.3.1 Kasutati erinevaid isolatsioonitemperatuure et suurendada valimit

Eelnevatest uuringutest on selgunud, et bakteriofaagidel on perekonniti üsna ranged temperatuurivahemikud, milles nad peremeesbaktereid nakatada suudavad (käesoleva töö peatükk 1.1.2). CEPEST kollektiooni bakteriofaagiperekondade temperatuuritaluvuse uuringust joonistub välja, et paljud tagaotsitavad haruldasemad perekonnad (G6, G7, G9) eelistavad nakatamisel madalamaid temperatuure, kui 20 °C ning on ka perekondi (G1, G8), mis tuleksid tugevamalt esile vastupidi kõrgemal temperatuuril (Brauer *et al.*, 2024). Lisaks langeb üldjuhul G5 perekonna faagide nakatavus temperatuuril 25 °C.

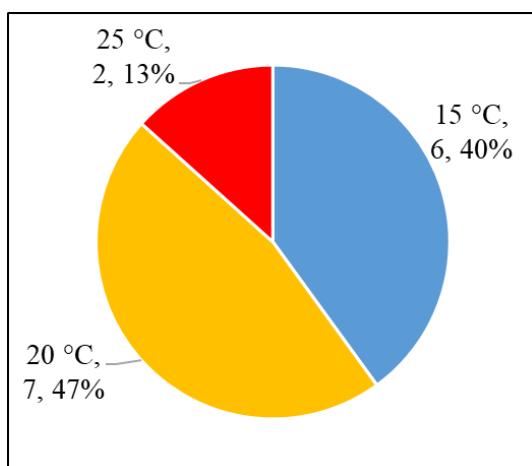
Võttes arvesse neid teadmisi, laiendati isolatsioonitasside inkubeerimise temperatuuri. Varasema 20 °C asemel lisati juurde ka inkubatsioonid 15 °C ja 25 °C, et suurendada madalat või kõrgemat temperatuuri eelistavate faagide tuvastamise võimalust. Iga meetodi kohta valati kolm tassi, mida inkubeeriti üleöö erinevatel temperatuuridel. Antud meetodikaga testitud 6 proovi on esindatud ühtses tabelis (Lisa 2). Kuuest proovist suudeti laiike tuvastada vaid nelja puhul, mille tulemused on ülevaatlikult esitatud tabelis 6.

Tabel 6. Ülevaade $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ tüvega töödeldud mullaproovidest, milles faage tuvastati (neli proovi kuuest), nende saagikusest ning mitte-G5 bakteriofaagide osakaalust testitud laikude seas sõltuvalt meetodist ja inkubatsioonitemperatuurist.

Proov	Meetod, ink. temp (°C)	Laike/tass	Testitud laigud	Mitte-G5	% Mitte-G5
Kerna Kompost (KEKO)	üleöö rik. 15	100	10	10	100%
	üleöö rik. 20	50	10	10	100%
	üleöö rik. 25	0			
	lühike rik.15	0			
	lühike rik. 20	0			
	lühike rik. 25	0			
	sadestus 15	0			
	sadestus 20	0			
	sadestus 25	0			
Tõrva Mutimuld (TOMU)	üleöö rik. 15	4	2	2	100%
	üleöö rik. 20	3	2	2	100%
	üleöö rik. 25	0			
	lühike rik.15	1	1	1	100%
	lühike rik. 20				
	lühike rik. 25	0			
	sadestus 15	6	6	6	100%
	sadestus 20	3	3	3	100%
	sadestus 25	0			

Proov	Meetod, ink. temp (°C)	Laike/tass	Testitud laigud	Mitte-G5	% Mitte-G5
Eisma Teetruup	üleöö rik. 15	1	1	1	100%
	üleöö rik. 20	2	2	2	100%
	üleöö rik. 25	5	3	3	100%
	lühike rik.15	0			
	lühike rik. 20	4	4	4	100%
	lühike rik. 25	0			
	sadestus 15	3	3	3	100%
	sadestus 20	19	10	10	100%
	sadestus 25	0			
Kivimüür Lillede Muld	üleöö rik. 15	0			
	üleöö rik. 20	20	5	5	100%
	üleöö rik. 25	20	5	5	100%
	lühike rik.15	0			
	lühike rik. 20	0			
	lühike rik. 25	0			
	sadestus 15	0			
	sadestus 20	0			
	sadestus 25	0			
		Kokku	67	67	

Erineva inkubatsioonitemperatuuriga testitud proovidest selgus, et faagilaike ei ilmnenud kõikidel temperatuuridel võrdselt. Temperatuuride 20 °C inkubeeritud tassidel esinesid faagilaigud kõige sagedamini ja suhteliselt sageli 15 °C. Temperatuuril 25 °C inkubeeritud tassidel tuvastati faagilaike vaid kahest proovist (Tabel 6). Tulemustest ilmneb faagide madala temperatuuri eelistamine (Joonis 6).



Joonis 6. Faagilaike sisaldavate isolatsioonitasside inkubatsioonitemperatuuride jaotus. Kollasega on tähistatud laike ilmutanud isolatsioonitasside osakaal, mis inkubeeriti 20 °C juures, sinisega on 15 °C juures inkubeeritud tassid ning punasega 25 °C inkubeeritud tassid.

2.3.3.2 $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ tüvega välditi G5, aga vähendati üldist faagide kogust

Lisaks erinevatel temperatuuridel tasside inkubeerimisele, võeti ka kogu protsessi jaoks kasutusele uus *P. putida* tüvi, kuna kasutades $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüvest tekitatud tüve $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$, oli võimalik tõhusalt vähendada G5 bakteriofaagide osakaalu. See on tingitud asjaolust, et nii töö käigus tehtud katsete (Tabel 7) kui ka J. Jagomägi avaldamata andmete kohaselt suurendab RloC valgu eemaldamine peremeesbakteri resistentsust faagide vastu, kusjuures see mõju avaldub perekonniti asümmeetriliselt. Saadud andmed viitavad sellele, et kuigi *rloC* geeni eemaldamine mõjub kõigile perekondadele negatiivselt, vähendades nakatavust umbes 10 kordselt, on G5 perekonda kuuluvad faagid RloC kadumisele eriti tundlikud, vähendades nakatavust 100–1000 kordselt (Tabel 7).

Tabel 7. Erinevate perekondade bakteriofaagide suurim kümnendlahjendus, millega oli võimalik laike tuvastada.

Faag	Grupp	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$
ErraM	5A	-5	-3
Vända	5A	-6	-5
Laguja 2	5B	-5	-3
Luutsna 3	5B	-5	-3
Ihaste	5B	-6	-4
BotAed	5C	-6	-4
S-Ka3	5C	-6	-3
Kallioja	7A	-1	-1
Kompost 2	7B	-6	-5
TOKO1	7C	-4	-5
Kurepalu 2	9A	-4	-3
Mudajõgi	9B	-6	-6
Puko2	10A	-6	-5

Toetudes nendele tulemustele, otsustati edasistes katsetes kasutada rikastuste käigus ning isolatsioonitassidel peremeestüvena $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ tüve eesmärgiga vähendada G5 faagide osakaalu uuritavates faagides. Lisaks puuduvad tüves veel kaks ennustatavat kaitsesüsteemi (Gabija (Cheng *et al.*, 2023) ja Wadjet (Deep *et al.*, 2022), A. Ainelu avaldamata andmed), seega potentsiaalselt võimaldab tüvi eraldada ka faage, mille eest varem kasutatud bakteritüvi oli kaitstud.

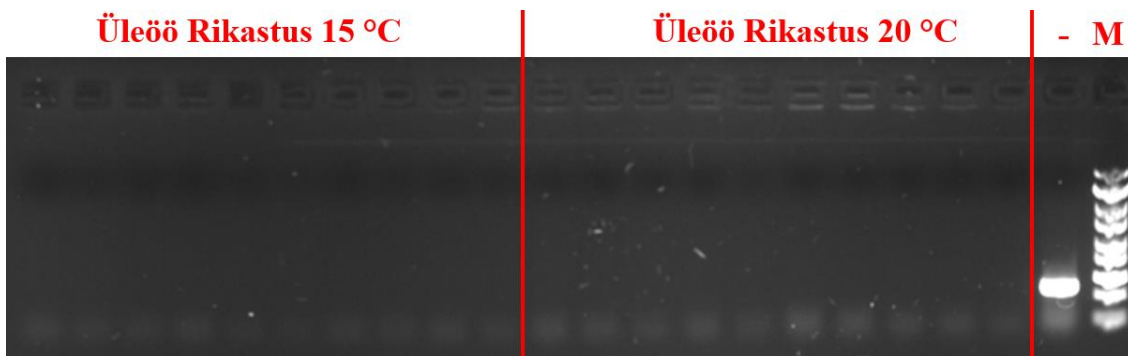
Võrreldes $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüvega tehtud tassidega, oli uue tüvega isolatsioonikatsetes laike vähem (ühe erandiga, milleks oli Kerna Komposti proov, millega oli üleöö rikastuse tassidel endiselt 50–100 laiku, Tabel 6). Kahe prooviga ei olnud võimalik ühegi meetodiga ühtegi laiku tuvastada (Lisa 2). Jätkuvalt oli kõige rohkem laike üleöö rikastuse tassidel, kuid seekord ei olnud ühelgi juhul inkubatsioonitassidel kõik bakterid lüüsunud, sõltumata meetodist ja tasside

inkubatsioonitemperatuurist (näide isolatsioonitassidest kasutades $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ tüve toodud Joonis 7).



Joonis 7. $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ tüve isolatsioonitassid temperatuuril 15 °C. Üldine näide isolatsioonitassidest (Tõrva mutimuld – TOMU proov), mis on valmistatud kasutades $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ tüve. Vasakult paremale on kasutatud eraldusmeetodiks lühike rikastus (6 laiku), sadestamine (1 laik, pole pildil nähtav), üleöö rikastus (4 laiku). Kõik kujutatud isolatsioonitassid on inkubeeritud temperatuuril 15 °C.

Vaatamata laikude üldise koguse vähenemisele, oli uute meetodite rakendamine siiski haruldasemate faagiperekondade eraldamiseks pigem kasulik. Eraldatud laikude testimisel PCR meetodiga selgus, et mitte ükski eraldatud bakteriofaagidest ei olnud G5 perekonnast (toodud näide KEKO proovist, Joonis 8, vaata ka Lisa 1).



Joonis 8. Kerna Kompost (KEKO) proovist eraldatud bakteriofaagide G5 faagide osakaal. PCR tulemused kasutades G5 perekonna spetsiifilisi primereid. „+“ tähisega on tähistatud positiivne kontroll, „M“ tähisega marker (*Generuler DNA ladder 1*)

Kokku testiti 67 erinevat $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ tüvega isoleeritud laiku, millest mitte ükski ei kuulunud G5 perekonda (Tabel 6). Lõplikult isoleeriti $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ tüvega viis faagi. Tulemustest selgus, et eelmainitud tüvega on võimalik vähendada G5 faagide osakaalu.

2.3.4 Isoleeritud faagide infektsiooniomadused

Kõikide proovide peale kokku isoleeriti 10 erinevat bakteriofaagi (Tabel 8). Kuigi üldjuhul üritati kõigi lõplikult eraldatud bakteriofaagidega viia läbi ka DNA eraldus, ei olnud see igal korral edukas.

Pärast sekveneerimist ilmnes, et siiski oli eraldatud ka mõned duplikaatsed faagid. Esimesest proovist (Tõrva Kompost (TOKO)) eraldati kaks eeldatavasti erinevat bakteriofaagi, kuid sekveneerimise käigus ilmnes, et tegu oli sama faagiga. Proovist Kerna Kompost (KEKO) eraldatud faagid KEKO1 ja KEKO20-2 osutusid samuti samaks bakteriofaagiks, küll aga isoleeriti samast proovist veel üks faag, KEKO2, mis ei sarnanenud kummalegi eelmainitud liigile, kuid mille liigiline kuuluvus jäi määramata, kuna faagi genoomse DNA sekveneerimine ei õnnestunud.

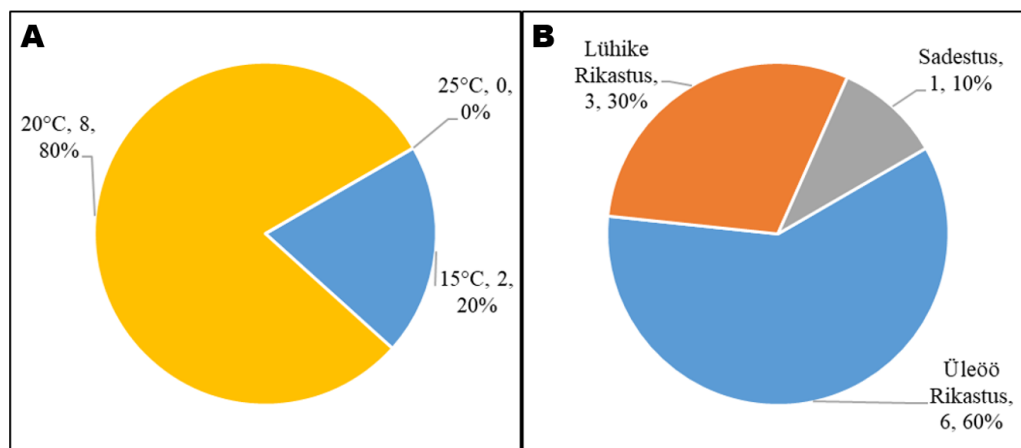
Duplikaatseid liike eraldati mõnel juhul ka mitmest erinevast proovist. Näiteks osutus keskkonnaproovist Tõrva Mutimuld (TOMU) isoleeritud faagid TOMU4 ja TOMU2 identseks, kuid lisaks olid need faagid identsed ka varasemalt proovist Eisma Kivi All (EIKI) eraldatud faagiga EIKI2 (Tabel 8).

Tabel 8. Kõigi proovide peale isoleeritud (st tehtud puhaskultuur) bakteriofaagid. „?“ tähistusega faagide puhul pole lõplikult perekonda kuuluvust kindlaks tehtud. Võrdusmärgiga on tähistatud duplikaadid varasematest faagidest. Tüvi $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ on lühendatud tähiseks „ $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$ “

Faagi Nimi	Grupp	Proov	Isolatsioonitüvi	Meetod / Ink. Temp
TOKO1	G7C	Tõrva Kompost	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	Lühike rik. / 20 °C
TOKO2 = TOKO1	G7C	Tõrva Kompost	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	Lühike rik. / 20 °C
TOKA	G9A	Tõrva Känd	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	Lühike rik. / 20 °C
EIKI1	G6A?	Eisma Kivi All	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	Üleöö rik. / 20 °C
EIKI2	G6A	Eisma Kivi All	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	Üleöö rik. / 20 °C
KEKO1	G7B	Kerna Kompost	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	Üleöö rik. / 20 °C
KEKO 20-2 = KEKO1	G7B	Kerna Kompost	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	Üleöö rik. / 20 °C
KEKO2	?	Kerna Kompost	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	Üleöö rik. / 20 °C
TOMU4 = EIKI2	G6A	Tõrva Mutimuld	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	Sadestamine / 15 °C
TOMU2 = TOMU 4	G6A	Tõrva Mutimuld	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	Üleöö rik. / 15 °C

Valdav enamus, neli viiendikku, lõplikult eraldatud bakteriofaagidest pärinesid isolatsioonitassidelt, mida inkubeeriti 20 °C juures. 20% faagidest eraldati temperatuuril 15 °C, kuid mitte ühtegi uut faagi ei suudetud eraldada temperatuurilt 25 °C (Joonis 9). Tähtis on välja tuua, et temperatuuril 20 °C inkubeeriti enam proove kui teistel temperatuuridel ja arvatavasti seetõttu on sellelt inkubatsioonitemperatuurilt saadud faagide osakaal ka kõige suurem. Enamus

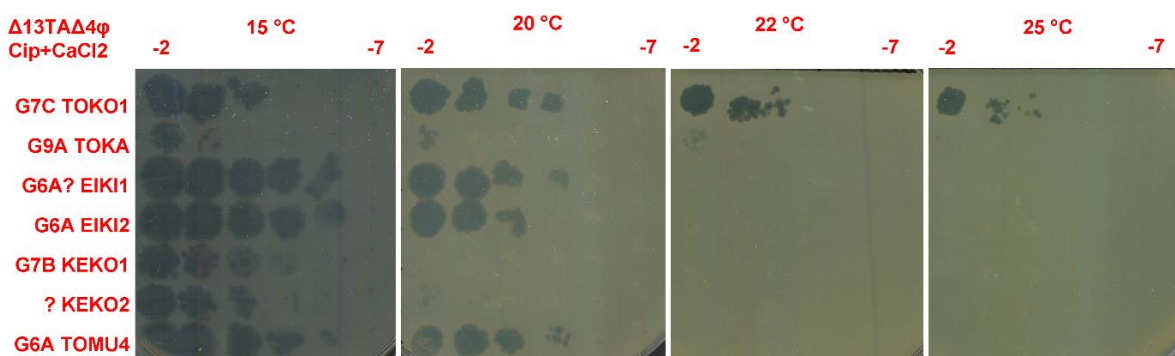
isoleeritud faage, 60%, isoleeriti üleöö rikastuse meetodiga, kuid siiski suudeti kolm bakteriofaagiliiki eraldada ka lühikese rikastusega ning üks sadestamisega (Joonis 9).



Joonis 9. Isoleeritud faagide jaotus inkubatsioonitemperatuuride ja isolatsioonimeetodite põhjal. A: Faagide jaotus vastavalt isoleerimisel kasutatud inkubatsioonitemperatuuridele. 20 °C tassidelt eraldatud faagide arv ja osakaal (kollane) ning 15 °C inkubeeritud tassidelt eraldatud faagide arv ja osakaal (sinine) B: Erinevate isolatsioonimeetoditega eraldatud faagide arv ja osakaal. Sadestusmeetod (hall) ning üleöö ja lühike rikastus (vastavalt sinine ja oranž).

2.3.4.1 Saadud faagid nakatasid kõige tugevamalt temperatuuril 15 °C

Eraldatud bakteriofaagidega viidi läbi nakatamiskatsed, mille käigus uuriti, milline on eraldatud bakteriofaagide temperatuurieelistus (Joonis 10, Tabel 9). Testiti kokku 7 erinevat faagi, duplikaatidest kaasati katsesse vaid üks eraldatud faag. Kuna mõne faagiproovi tiiter ei ole väga kõrge (10^8 PFU/ml), ei saa välistada, et kõrgema tiitriga faagilahuse testimisel, ilmneks faagilaike ka veidi kõrgematel temperatuuridel.



Joonis 10. Isoleeritud bakteriofaagide temperatuurieelistus. Faagide lahjendused kanti topeltagariga $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ bakterimuruga $CaCl_2+cip$ sisaldavatele tassidele. Pilt tehtud pärast 24 h inkubatsiooni temperatuuril (15 °C, 20 °C, 22 °C või 25 °C).

Tabel 9. Testitud bakteriofaagide temperatuurisõltuvus. Märgitud isoleeritud faagide maksimaalne kümnendlahjendus, kus oli võimalik tuvastada faagilaike. Peremeestüvi $\Delta 13TA\Delta 4\phi$, sööde $CaCl_2+cip$. Tuvastuse alampiir on lahjendus 10^{-2} (tabelis tähistatud -2).

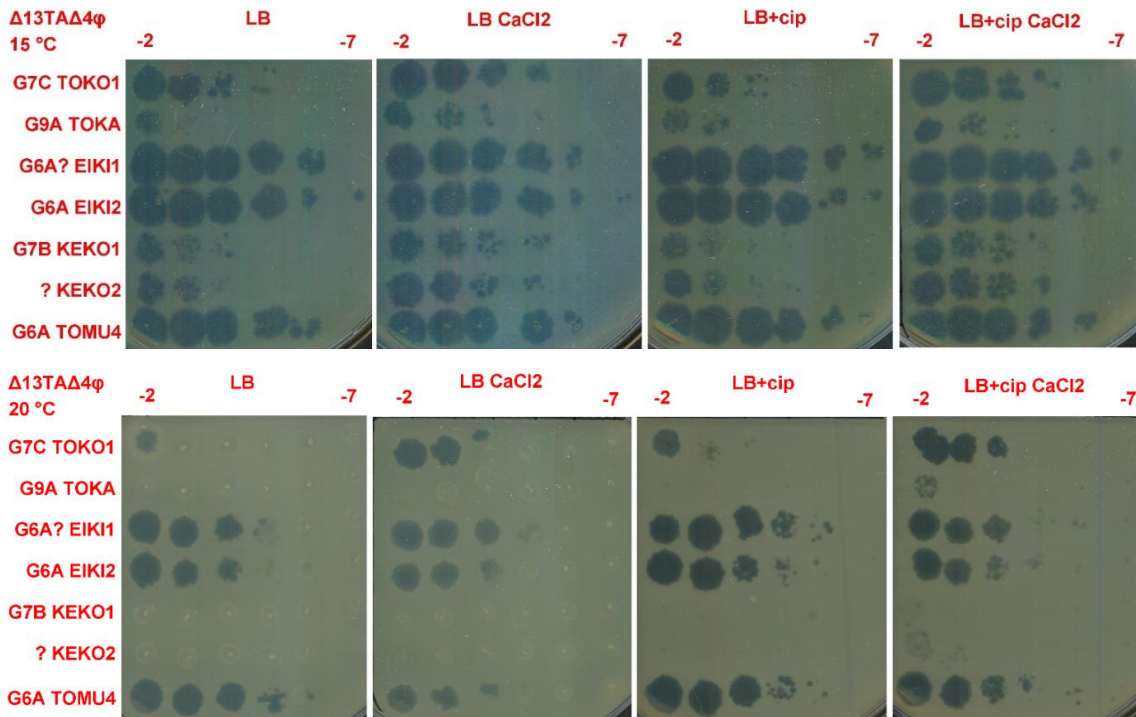
Nr.	Faag	Tiiter	Grupp	15°C	20°C	22°C	25°C	30°C	37°C
1	TOKO1	2×10^8	G7C	-4	-5	-4	-4	0	0
2	TOKA	8×10^8	G9A	-3	-2	-2	0	0	0
3	EIKI1	9×10^9	G6A?	-6	-5	0	0	0	0
4	EIKI2	$1,3 \times 10^{10}$	G6A	-6	-4	0	0	0	0
5	KEKO1	9×10^8	G7B	-5	0	0	0	0	0
6	KEKO2	6×10^8	?	-4	-2	0	0	0	0
7	TOMU4=EIKI2	2×10^9	G6A	-6	-5	0	0	0	0

Temperatuurikatsete tulemused viitavad, et suur enamus isoleeritud faagidest nakatavad peremeesbakteritüve $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tugevamalt madalamatel temperatuuridel. Kõige temperatuuritaluvam bakteriofaag on TOKO1, nakatades *P. putida* $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüve ka temperatuuril 25 °C. Enamiku ülejäänud faagide nakatamistemperatuuri maksimum on ligikaudu 20 °C, kusjuures faag KEKO1 puhul ilmnesid laigud ainult temperatuuril 15 °C. Mitte ükski faagidest ei suutnud tekitada laiike temperatuuril 30 °C või 37 °C (Joonis 10, Tabel 9)

2.3.4.2 tsiprofloksatsiin ja $CaCl_2$ suurendasid enamasti infektsioonitugevust

Sarnaselt temperatuurikatsetele, testiti faagide nakatamisvõimekust ka erinevate söötmetega, milles varieeriti $CaCl_2$ ja tsiprofloksatsiini sisaldust. Katse viidi läbi kahel erineval temperatuuril: 20 °C ja 15 °C. $CaCl_2$ sisaldus pehmeagaris oli 0 või 10 mM ja cip-i sisaldus tardsöötmes 0 või 0,03 µg/ml.

Tulemused näitavad, et kui kõik muud faktorid jäävad samaks, suurendab $CaCl_2$ lisamine söötmesse enamasti bakteriofaagide nakatavust 10–100 kordselt. Üheks erandiks on G6 perekonna bakteriofaagid, mispuhul $CaCl_2$ lisamine ei mõjuta bakteriofaagi nakatavust või ühel juhul langetab nakatavust kümnendastme võrra (Joonis 11, Tabel 10).



Joonis 11. Faagide nakatamisvõime sõltuvus CaCl₂ ja cip-ist. Erinevaid lisandeid (CaCl₂ ja/või cip) sisaldavatele Δ13TAΔ4φ bakterimuruga tassidele kanti faagilahuste lahjendused. Tassi inkubeeriti 24 h temperatuuril 15 °C (ülemine paneel) või 20 °C (alumine paneel). 20 °C katset viidi läbi kaks korda, esitatud ühe katse tulemused.

Tabel 10. Faagide nakatamise sõltuvus CaCl₂ ja cip-ist. Isoleeritud faagide maksimaalne kümnendlahjendus, kus ilmnesid laigud erineval söötmel kasvanud Δ13TAΔ4φ bakterimurul temperatuuril 15 °C ja 20 °C. Tuvastuse alampiiriks oli lahjendus 10⁻² (tabelis märgitud -2)

Faag	Grupp	LB	LB CaCl ₂	LB+cip	LB+cip CaCl ₂
15 °C					
TOKO1	G7C	-5	-5	-4	-5
TOKA	G9A	-3	-4	-3	-5
EIKI1	G6A?	-6	-6	-7	-7
EIKI2=TOMU4	G6A	-7	-7	-7	-6
KEKO1	G7B	-4	-5	-4	-5
KEKO2	?	-4	-5	-4	-5
TOMU4=EIKI2	G6A	-6	-6	-6	-6
20 °C					
TOKO1	G7C	-2	-4	-3	-4
TOKA	G9A	0	0	0	-2
EIKI1	G6A?	-5	-5	-6	-6
EIKI2=TOMU4	G6A	-5	-4	-6	-6
KEKO1	G7B	0	0	0	-2
KEKO2	?	0	0	0	-2
TOMU4=EIKI2	G6A	-6	-4	-6	-6

Isoleeritud bakteriofaagide seas ei ole 15 °C tassidel cip-i lisamisel märgatavat efekti, mõjutades erinevaid faage nii positiivselt kui ka negatiivselt kümnendastme võrra, mis võib olla ka tingitud juhuslikust varieeruvusest (Joonis 11). Siiski viitavad temperatuuril 20 °C

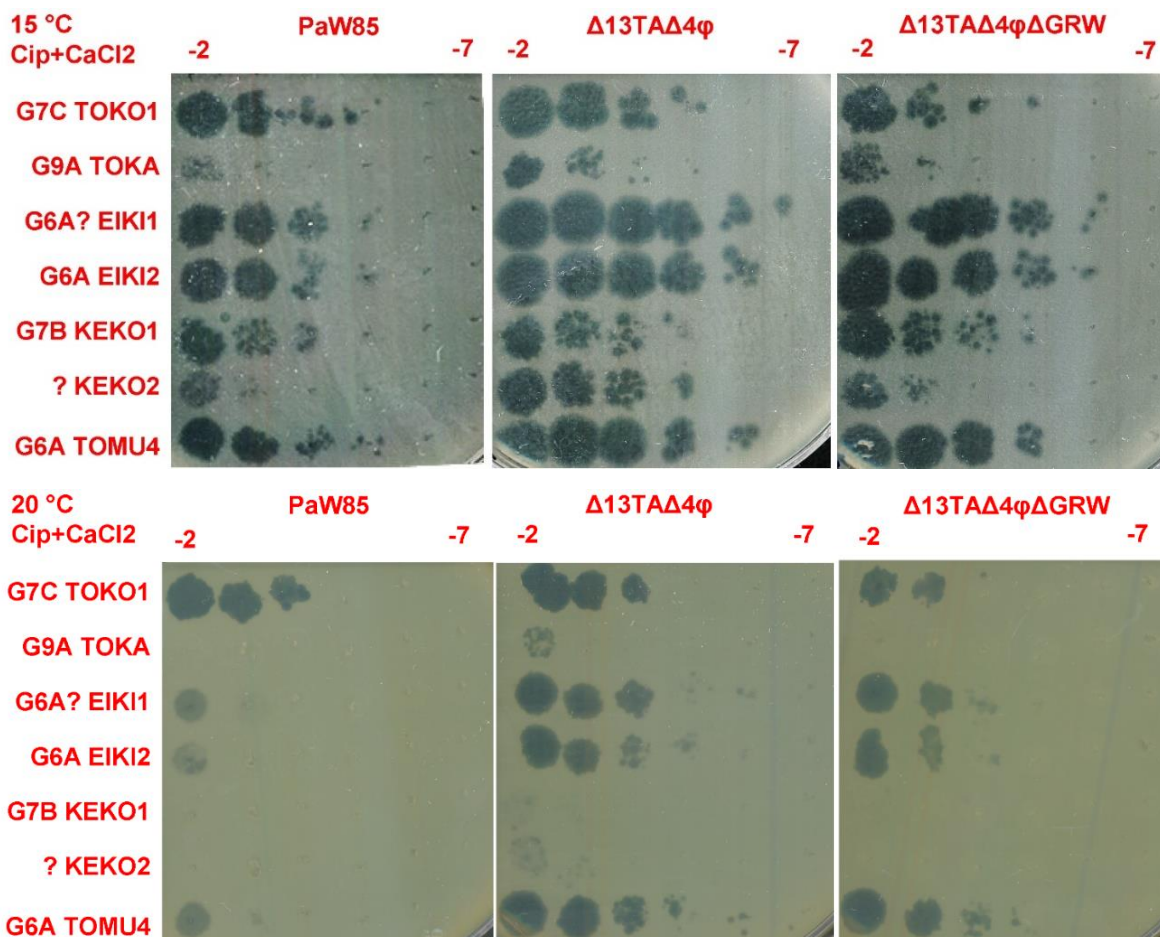
inkubeeritud tasside tulemused, et cip-i lisamisel võib olla siiski positiivne mõju bakteriofaagide nakatavuse tugevusele, tõstes näiteks G6 perekonna faagidel nakatavust 10–100 kordselt (Joonis 11). Eriti tugevalt paistis välja faagide KEKO1 ja KEKO2 sõltuvus cip-st, nakatades baktereid 20 °C juures ainult siis, kui söötmes oli nii CaCl₂ kui cip.

2.3.4.3 Tüvest eemaldatud süsteemid mängivad olulist rolli faagide nakatavusel

Lisaks söötmelisandite varieerimisele testiti ka isoleeritud faagide võimet nakatada erinevaid bakteritüvesid (PaW85, $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ või $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$), et tuvastada, kas isolatsioonitüvedest puuduvad geneetilised elemendid mõjutavad bakteri kaitset uute faagide vastu. (Joonis 12, Tabel 11)

Nagu ennustatud, mõjutas RloC puudumine peremeestüves kõiki testitud bakteriofaagiliike negatiivselt. Võrreldes tüvega $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ nakatasid faagid tüve $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ kuni 100 korda nõrgemini. Lisaks ilmnas, et tüvi $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ nakatus omakorda ainult kuni 100 korda paremini kui metsiktüvi PaW85, vaatamata eemaldatud toksiin-antitoksiin süsteemidele ja profaagidele. (Joonis 12, Tabel 11)

Kooskõlas eelnevate temperatuuri- ja söötmekatsete tulemustega näitab ka peremeestüve testimine, et 20 °C nakatavad isoleeritud bakteriofaagid peremeesbakterit tunduvalt halvemini, kui 15 °C juures.



Joonis 12. Faagide nakatusvõime sõltuvus peremeestüvedest. Faagide 10-kordsetest lahjendusridadest tehti tilgad CaCl_2 ja cip sisaldavatele *P. putida* metsiktüve PaW85 ja selle derivaatide $\Delta 13\text{TA}\Delta 4\phi$ ja $\Delta 13\text{TA}\Delta 4\phi\Delta \text{Ga}\Delta \text{Rlo}\Delta \text{Wa}$ bakterimuruga tassidele. Tasse inkubeeriti inkubatsioonis temperatuuril 15 °C (ülemine paneel) või 20 °C (alumine paneel) 24 tundi.

Tabel 11. Faagide nakatamise sõltuvus peremeestüvest. Isoleeritud faagide maksimaalne kümnendlahjendus, kus ilmnesid laigud erinevate peremeestüvedega, temperatuuridel 15 °C ja 20 °C. Tuvastuse alampiiriks oli lahjendus 10^{-2} (tähistatud -2)

Faag	Grupp	PaW85	$\Delta 13\text{TA}\Delta 4\phi$	$\Delta 13\text{TA}\Delta 4\phi\Delta \text{GRW}$
15 °C				
TOKO1	G7C	-5	-5	-5
TOKA	G9A	-2	-4	-3
EIKI1	G6A?	-5	-7	-6
EIKI2=TOMU4	G6A	-5	-6	-6
KEKO1	G7B	-4	-5	-5
KEKO2	?	-2	-5	-3
TOMU4=EIKI2	G6A	-5	-6	-5
20 °C				
TOKO1	G7C	-4	-4	-3
TOKA	G9A	0	-2	0
EIKI1	G6A?	-2	-6	-4
EIKI2=TOMU4	G6A	-2	-6	-4
KEKO1	G7B	0	-2	0
KEKO2	?	0	-2	0
TOMU4=EIKI2	G6A	-2	-6	-5

2.4 Arutelu

2.4.1 Üleöö rikastuse edukus võib tuleneda suuremast faagide kogusest

Veidi enam kui pool lõplikult eraldatud bakteriofaagidest eraldati üleöö rikastuse meetodiga, kuid ka arvestatav kogus, 30%, eraldati lühikese rikastusega (Joonis 9). Üks faag eraldati kasutades sadestuse meetodit (Joonis 9, Tabel 8). Kuigi lõplikult isoleeritud faagide seas on ülekaalukalt eraldatud faagid üleöö rikastuse meetodil (Joonis 9, Tabel 8), ei saa siiski väita, et see tähendaks meetodi soodumust haruldasemate faagide eraldamise suhtes. Nimelt võib suurem eraldatud faagide kogus tuleneda üldisest isolatsioonitasside faagilaikude tihedusest (Tabel 5 ja Tabel 6). Kuna laike ei testitud võrdses koguses kõikide meetoditega, võib suurem saagikus tuleneda ka sellest, et üleöö rikastusega eraldatud faage testiti arvuliselt rohkem.

Kuigi nii üleöö kui lühike rikastus toimusid samal põhimõttel, ilmnes esimesega faagilaike märkimisväärselt rohkem. Põhjuseks võib eeldada, et eelmainitud meetodiga on keskkonnafaagidel suurem ajaaken bakterite nakatamiseks ning seeläbi ka eksponentsiaalselt paljunemiseks, kuna keskkonnaproovist pärit faage inkubeeritakse peremeesbakteriga koos enam kui 16 tundi. Lisaks saab tuletada temperatuurikatsetest, et kuigi lühikesel rikastusel kasutatav temperatuur 25 °C on optimaalsem *P. putida* kasvuks, ei kiirenda see tingimata faagide paljunemistsükli. Veel enam, teadmata faagide paljunemistsükli kestvust ei ole teada, kui mitu (ja kas üldse) infektsioonitsükli keskkonnaproovis olevad faagid lühikese rikastuse (ligikaudu 5 tunni) jooksul läbisid.

Üleöö rikastusmeetod oli ainus meetod, millega esines isolatsioonitassidel kõigi bakterite lüüsumist, mis tegi selle meetodiga proovist individuaalsete faagide eraldamise paaril juhul võimatuks. Sellest tulenevalt on näha, kuidas üleöö rikastusega eraldatud faagide kogus tõusis hüppeliselt, kui mindi üle $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ peremeestüvele (Tabel 8). Kui esimese viie prooviga kasutati $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüve, siis kahel proovil viiest ei olnud võimalik meetodiga faage eraldada, kuna üksiklaike ei olnud võimalik eristada (Joonis 4). Sellest tulenevalt oli tüvevahetusega kaasnev faagide üldine nakatavuse vähenemine üleöö rikastuse meetodi jaoks pigem kasulik, kuna see vähendas faagilaikude ülekülluse probleemi. Nimelt liikus laikude arv tassil optimaalsesse vahemikku, kus esines laike arvukalt, kuid mitte ülemääraselt. Seevastu ilmnes tüve vahetusel nii lühikese rikastuse kui ka sadestuse meetodil probleem, kus faagide vähenenud nakatamise tõttu ei olnud võimalik nende, algselt madalama saagikusega, meetoditega enam laike tuvastada.

2.4.2 Madalam temperatuurieelistus võib olla seotud keskkonnaga

Katsete käigus ilmnes korduvalt asjaolu, et testitud proovidega tagas kõige suurema edu faagide eraldamisel madalamate temperatuuride kasutus. Esmalt tuli see esile erinevatel temperatuuridel inkubeeritud isolatsioonitassidel. Huvitaval kombel ei jaotunud faagilaike eksponeerivate isolatsioonitasside inkubatsioonitemperatuurid võrdselt, vaid pigem domineerisid madalamad temperatuurid, 15 °C ja 20 °C, mis moodustasid vastavalt 40% ja 47% kõigist laikudega tassidest (Joonis 6). Sarnane suund jäi kehtima ka lõplikult isoleeritud bakteriofaagide seas, kus mitte ükski neist ei pärinenud 25 °C inkubeeritud tassilt.

Isoleeritud faagidega läbiviidud temperatuuri-, tüve- ja söötmekatsed viitavad samuti sellele, et madalam temperatuur on Eesti keskkonnast eraldatud faagide nakatavuse jaoks positiivse mõjuga (Joonis 10–Joonis 12, Tabel 9–Tabel 11). Tulemused kattuvad suuresti ka Brauer *et al.*, (2024) tulemustega, mille kohaselt CEPEST kollektiooni faagide nakatamisvõime enamasti tugevneb temperatuuri alandamisel (Brauer *et al.*, 2024).

Ometigi on suudetud teiste allikate kohaselt eraldada bakteriofaage ja komplekteerida ka kollektioone palju kõrgematel temperatuuridel. Nii bakteriofaag *MiCath* (Jaryenneh *et al.*, 2023), kui ka Ngiam *et al.* (2022) kollektioonide koostamisel kasutati inkubeerimisel temperatuuri 30 °C või *E. coli* puhul (näiteks BASEL kollektioon (Maffei *et al.*, 2021)) 37 °C. *E. coli* faagikollektiooni puhul on see käik oodatav, sest tegu on soojavereliste loomade soolestikus elava bakteriga ning see kattub ka Seeley ja Primrose (1980) tulemustega, kus väljaheiteproovidest leiti pigem kõrge temperatuuritaluvusega faage. Seevastu vastandub fakt, et *P. putida* faage suudeti eraldada temperatuuril 30 °C mõnevõrra nii antud töö (ükski faag ei nakatanud enam temperatuuril 30 °C, Joonis 10, Tabel 9) kui Brauer *et al.* (2024) tulemustega.

See märkimisväärne erinevus võib tuleneda eraldamiseks kasutatavate keskkonnaproovide proovivõtukohta keskmisest temperatuurist. Kõiki eelmainitud *P. putida*'t nakatavaid faage ja faagikollektioone ühendab fakt, et kasutatavad keskkonnaproovid on võetud kohapealsest keskkonnast. CEPEST kollektiooni tegemise käigus kasutati Eesti veekogude veeproove (Brauer *et al.*, 2024), *MiCath* eraldati kodusest köögiviljajaiast Livermore'ist, USA-st (Jaryenneh *et al.*, 2023) ja Ngiam *et al.* (2022) kollektiooni jaoks kasutati Brisbane, Austraalia reovett. Tuleb täheldada, et võrreldes Eesti keskmise õhutemperatuuriga, mis on 1991–2020 andmete kohaselt 6,4 °C (Keskkonnaagentuur, 2020), on teiste kollektioonide keskkonnaproovide ülesvõtukohtad märkimisväärselt kõrgemate temperatuuridega. Brisbane'i puhul on aastaringne keskmine aastatel 1994–2024 20,6 °C (Australian Government Bureau of Meteorology, 2024) ja Livermore'is aastatel 1991–2020 15,7 °C (NOAA NCEI, 2020). Võttes

arvesse bakteriofaagide üldiselt ranget temperatuurivahemiku eelistust ja dokumenteeritud võimekust kiirelt adapteeruda (Lázaro *et al.*, 2018), on alust arvata, et keskmiselt kuumemates piirkondades nakatavad keskkonnafaagid paremini just kõrgematel temperatuuridel, kuna nendes piirkondades on see kohasem. Seetõttu võib oletada, et ideaalne isoleerimisel kasutatav inkubatsioonitemperatuur sõltub tugevalt sellest, milline on temperatuur proovivõtukohas.

2.4.3 Peremeestüve valik on oluline osa protsessi optimeerimisest

Tulemuste põhjal on võimalik väita, et kahe uuritud *P. putida* tüve $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ ja $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ vahel on nakatamises tugevad erinevused, mis mõjutavad bakteriofaagide eraldamist.

Kuivõrd tüvi $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ on väga tundlik bakteriofaagidele, on sellega võimalik eraldada korraga väga palju bakteriofaage, kuna iga individuaalse bakteriofaagi nakatamisvõimalus on suurem. See omadus on oluline madalama üldise saagikusega meetodite puhul, kuid nagu näha antud töö tulemustest (käesoleva töö peatükk 2.3.1, Tabel 5), võib see suure saagikusega meetoditel kaasa tuua bakterite lauslüüsumise. Lisaks oli läbivalt probleemiks osade faagiperekondade üleesindatus, mis väljendus kõrges G5 bakteriofaagide osakaalus testitud laikude seas. Sama probleem esines ka CEPEST kollektsiooniga, mille komplekteerimiseks kasutati samuti $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüve (Brauer *et al.*, 2024).

Tulemustest selgus, et tüve $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ kasutamine vähendab märkimisväärselt G5 faagide osakaalu, elimineerides need täielikult kuuest proovist ülesvõetud bakteriofaagide seast (Tabel 6). Tulenevalt selle tüve üldiselt suuremast resistentsusest faagide vastu, vähendas selle kasutuselevõtt küll sadestamis- ja lühikese rikastuse meetodi tõhusust, kuid üleöö rikastuse meetodiga oli toime pigem sünergiline.

Võrreldes *P. putida* $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ tüvega oli $\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GaRloWa$ tüvelt peale RloC eemaldatud veel kaks eeldatavat kaitsesüsteemi, mis võib aidata uudsete bakteriofaagide eraldamisel. Töö käigus eraldatud faagide puhul võib küll eeldada, et eemaldatud Gabija ja Wadjet süsteemid nende faagide eest ei kaitse, kuna tüvede võrdluse katses ei olnud võimalik täheldada süsteemide puudumise positiivset mõju faagide nakatamisele (Joonis 12, Tabel 11). Siiski on selle väite kinnitamiseks vaja katseid läbi viia üksikute Gabija ja Wadjet süsteemide deletsioonitüvedega, sest selliste süsteemide puhul on varasemalt faagivastast kaitset nähtud (Cheng *et al.*, 2023; Deep *et al.*, 2022). Üksikdeletantide testimisel saab välistada RloC puudumisel esineva resistentsuse suurenemise maskeerivat efekti. Tulevikus püsib jätkuvalt

olulisena isolatsioonitüvest kaitsesüsteeme eemaldamine, kuna keskkonnas võib olla faage, mis ei ilmne isolatsioonitassidel seni avastamata kaitsemehhanismide tõttu. Seni töös ja ka CEPEST kollektiooni jaoks kasutatud tüvi $\Delta 13TA\Delta 4\phi$ (Brauer *et al.*, 2024) sisaldab praegu genoomis veel hulgaliselt ennustatavaid kaitsesüsteeme (A. Ainelu, avaldamata andmed) ning nende jätkuv uurimine ja eemaldamine viib tõenäoliselt uute faagiliikide avastamisele.

2.4.4 Paljud faagid on mõjutatud söötme lisanditest

Söötmetest ilmneb, et bakteriofaagide keskkonnaproovidest isoleerimisel on olulised ka söötmes sisalduvad lisandid. Isoleeritud faagidega tehtud katsetes on võimalik täheldada CaCl_2 rolli faagide nakatamise tõstmises. 10 mM CaCl_2 lisamine suurendas enamasti faagide nakatamisvõimet 10-kordselt (Joonis 11, Tabel 10). CaCl_2 ja teiste sarnaste ühendite (näiteks MgCl_2) positiivne mõju faagide adsorptsioonile bakteripinnal on juba varasemalt kirjeldatud (Chhibber *et al.*, 2014; Jamal *et al.*, 2017; Luria & Steiner, 1954) ja üldjuhul on ühe või mõlema soola lisamine olnud standartseks praktikaks ka CEPEST ja BASEL kollektiooni jaoks isolatsioonitasside tegemisel (Brauer *et al.*, 2024; Maffei *et al.*, 2021). Erinevate artiklite vahel varieerub kasutatav kontsentratsioon 5 mM ja 10 mM vahel. Ka käesoleva töö käigus muudeti lisatava CaCl_2 kogust tassidele. Kuna Eesti mullas on 2018–2022 andmetel keskmiselt 3015 mg/kg (Maaelu Teadmuskeskus, 2022) kaltsiumit, mis ei kao ära filtreerimise käigus, lisati isolatsiooni esimestes etappides vähem CaCl_2 , kuna kaltsiumioonide positiivne mõju võib liigsetel kogustel uuesti langeda, saavutades optimumi 10 mM juures (Chhibber *et al.*, 2014).

Tsiprofloksatsiini (cip) lisamise mõju oli väiksem kui CaCl_2 puhul. Antibiootikumi lisati nii rikastuse käigus kui ka isolatsioonitassidele peamiselt eesmärgiga eraldada mõõdukaid faage (Howard-Varona *et al.*, 2017), mis tavatingimustes võivad integreeruda bakteri genoomi ja mitte tekitada faagilaike. Varasemalt on näidatud, et bakterigenoomi integreerunud profaage on võimalik indutseerida lüütilisse tsükklisse fluorokinolonidega, sealhulgas cip-ga (López *et al.*, 2014). Virulentses tsükklis hakkavad need faagid peremeesbaktereid tapma, tekitades faagilaike. Kuigi käesoleva töö käigus ei eraldatud ühtegi mõõdukat faagi, esines siiski cip-i õrn positiivne mõju faagide nakatavusele (Joonis 11, Tabel 10). Temperatuuril 15 °C juures on mõju vaevumärgatav, kuid 20 °C juures esineb oluline erinevus faagide nakatavuse osas. Nii faagidel EIKI1 kui ka EIKI2 tõuseb nakatavus cip-i lisamisel 10-kordselt, kuid kõige olulisemana on faagid KEKO1 ja KEKO2 suutelised baktereid nakatama 20 °C juures ainult juhul, kui söötmes on nii CaCl_2 kui ka cip (Joonis 11, Tabel 10). See tulemus viitab tugevalt söötmelisandite vajalikkusele eriti väheesindatud ja nõrgema nakatamisefektiivsusega faagidel, kuna ilma nende lisanditeta ei oleks olnud võimalik neid faage isoleerida.

Kokkuvõte

CEPEST faagikollektsioon, mida arendatakse Tartu ülikooli geneetika õppetoolis on küll rikkalik faagiisendite poolest, kuid ei ole väga mitmekesine faagide elutsükli, genoomi olemust või morfoloogiat arvestades. Töö peamine eesmärk oli CEPEST kollektsiooni täiendamiseks isoleerida võimalikult palju erinevaid *Pseudomonas putida* tüve PaW85 nakatavaid faage kasutades selleks erinevaid isolatsioonimeetodeid ja peremeesbaktereid. Lisaks võrreldi töö käigus kasutatud meetodeid ja kirjeldati isoleeritud faage.

Lõplikku järeldust, milline kasutatud isolatsioonimeetod uute faagide eraldamiseks kõige tõhusam on, ei saa küll selle töö põhjal tuua, kuid suudeti isoleerida mitmeid erinevaid *P. putida* laboritüve PaW85 nakatavaid bakteriofaage, sealhulgas ka perekondadest, mis varasemalt koosnesid kollektsioonis vaid üksikutest liikidest. Üldiselt saab töö tulemused kokku võtta järgmiselt:

1. Üleöö rikastusmeetodiga saadakse kvantitatiivselt rohkem faage, kui teiste meetoditega, kuid võib kaasneda laikude üleküllust isolatsioonitassidel.
2. *rloC* geeni deletsioon peremeestüvest vähendab bakteriofaagide üldist kogust isolatsioonitassidel, kuid hõlbustab haruldasemate faagiperekondade eraldust.
3. Isolatsioonitemperatuur on tähtis osa bakteriofaagide eraldamisel ning erinevatel temperatuuridel on tõenäoliselt eraldatud faagide valim erinev.
4. Isoleeriti 10 uut faagi, mis efektiivseimaks nakatamiseks vajavad enamasti CaCl_2 ja madalat inkubatsioonitemperatuuri.

Töö tulemused toovad välja bakteriofaagide isoleerimisel peremeestüve valiku olulisuse meetodite tundlikkuse suurendamisel ja *RloC* näitel ka isoleeritavate faagiperekondade osakaalude muutmisel, tõstes esile edasise tüve optimeerimise vajalikkuse. Suure tõenäosusega tasub isolatsiooni temperatuuri valikul võtta arvesse proovivõtukohta keskkonnatemperatuuri. Lisaks rõhuvad tulemused sellele, et tulenevalt bakteriofaagide mitmekesisusest on nende isoleerimisel samuti vajalik laiahaardeline lähenemine.

Methods of isolating environmental bacteriophages of *Pseudomonas putida*

Juhan Mattias Laipaik

Summary

Bacteriophages, or viruses that exclusively infect bacteria, are a ubiquitous part of virtually every ecosystem in the world, outnumbering their hosts by a factor of ten, reaching 10^{31} particles globally by some estimates (Comeau *et al.*, 2008). In addition, phages in the environment are remarkably diverse, both genetically and morphologically. Crucially, they usually have an extremely narrow host and temperature range, making isolation difficult.

Despite these challenges, several different bacteriophage collections have been assembled globally, one of these being the CEPEST collection of *Pseudomonas putida* specific bacteriophages at the Department of Genetics, University of Tartu (Brauer *et al.*, 2024). The size of the collection is unprecedented for *P. putida* phages with 67 different phage isolates. However, a sizeable majority of these isolates belong to just two genera of phages.

To remedy this issue, this work aimed to extract novel phages by processing numerous different environmental samples with three different isolation techniques using three incubation temperatures and two host strains. Though the results remain inconclusive on which method used is the best for isolating new species, the benefits of different isolation methods and the effects of other variables on isolation efficacy were assessed. The results can be summarized as follows:

1. Overnight enrichment yields a higher number of phage plaques overall, though this can be detrimental due to excessive lysis on isolation dishes.
2. The deletion of the *rloC* gene from the host strain reduces the overall amount of bacteriophage plaques on isolation dishes but facilitates the isolation of phages from less common genera.
3. The incubation temperature used during isolation has a sizeable effect and the usage of varying temperatures may yield different phage species overall.
4. Ten novel phages were isolated, most of which require CaCl_2 and low incubation temperatures to maximise infectivity.

The results of the work highlight the importance of the host strain used. The deletion of various genes can increase the sensitivity of methods used, or, in the case of RloC, change the proportion of phage families that can be isolated, emphasizing the need for further host strain optimisation. In addition, there seems to be a link between the ambient temperature of the

sampling site and the temperature tolerance of the isolated phages, which should be considered during the isolation process. To summarize, stemming from the vast diversity of phages, a wide-ranging approach to their isolation seems inevitable.

Tänuõnad

Täna oma juhendajat, Hedvig Tammanit, põhjaliku nõustamise eest katsete läbiviimisel ja kirjutamise käigus ning Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi personali meeldiva õhkkonna loomise ja jooksva abi eest laborikeskkonnas orienteerumisel.

Kirjanduse loetelu

- Ackermann, H.-W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, *146*(5), 843–857. <https://doi.org/10.1007/s007050170120>
- Ackermann, H.-W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, *152*(2), 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Aiewsakun, P., Adriaenssens, E. M., Lavigne, R., Kropinski, A. M., & Simmonds, P. (2018). Evaluation of the genomic diversity of viruses infecting bacteria, archaea and eukaryotes using a common bioinformatic platform: Steps towards a unified taxonomy. *Journal of General Virology*, *99*(9), 1331–1343. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001110>
- Alsaadi, S. E., Lu, H., Zhang, M., Dykes, G. F., Allison, H. E., & Horsburgh, M. J. (2024). Bacteriophages from human skin infecting coagulase-negative Staphylococcus: Diversity, novelty and host resistance. *Scientific Reports*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59065-9>
- Brauer, A., Rosendahl, S., Kängsep, A., Lewanczyk, A. C., Rikberg, R., Hõrak, R., & Tamman, H. (2024). Isolation and characterization of a phage collection against *Pseudomonas putida* (lk 2024.03.26.586772). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.03.26.586772>
- Bryan, D. W., Hudson, L. K., Wang, J., & Denes, T. G. (2023). Characterization of a Diverse Collection of Salmonella Phages Isolated from Tennessee Wastewater. *PHAGE*, *4*(2), 90–98. <https://doi.org/10.1089/phage.2023.0004>
- Cheng, R., Huang, F., Lu, X., Yan, Y., Yu, B., Wang, X., & Zhu, B. (2023). Prokaryotic Gabija complex senses and executes nucleotide depletion and DNA cleavage for antiviral defense. *Cell Host & Microbe*, *31*(8), 1331-1344.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.06.014>
- Chhibber, S., Kaur, T., & Kaur, S. (2014). Essential role of calcium in the infection process of broad-spectrum methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriophage. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(8), 775–780. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300051>

- Comeau, A. M., Hatfull, G. F., Krisch, H. M., Lindell, D., Mann, N. H., & Prangishvili, D. (2008). Exploring the prokaryotic virosphere. *Research in Microbiology*, 159(5), 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.05.001>
- Czajkowski, R., Ozymko, Z., & Lojkowska, E. (2016). Application of zinc chloride precipitation method for rapid isolation and concentration of infectious *Pectobacterium* spp. And *Dickeya* spp. Lytic bacteriophages from surface water and plant and soil extracts. *Folia Microbiologica: Official Journal of the Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic and Czechoslovak Society for Microbiology*, 61(1), 29–33. <https://doi.org/10.1007/s12223-015-0411-1>
- Davidov, E., & Kaufmann, G. (2008). RloC: A wobble nucleotide-excisive and zinc-responsive bacterial tRNase. *MOLECULAR MICROBIOLOGY*. *MOLECULAR MICROBIOLOGY*, 69(6), 1560–1574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06387.x>
- Deep, A., Gu, Y., Gao, Y.-Q., Ego, K. M., Herzik, M. A., Zhou, H., & Corbett, K. D. (2022). The SMC-family Wadjet complex protects bacteria from plasmid transformation by recognition and cleavage of closed-circular DNA. *Molecular Cell*, 82(21), 4145–4159.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.09.008>
- Domingo-Calap, M. L., Bernabéu-Gimeno, M., M. Aure, C., Marco-Noales, E., & Domingo-Calap, P. (2022). Comparative Analysis of Novel Lytic Phages for Biological Control of Phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e02960-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02960-22>
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K. R., Abedon, S. T., & Sullivan, M. B. (2017). Lysogeny in nature: Mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal*, 11(7), 1511–1520. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>
- Hyman, P. (2019). Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35. <https://doi.org/10.3390/ph12010035>

- Jamal, M., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., & Das, C. R. (2017). Isolation and characterization of a bacteriophage and its utilization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-2995. *Life Sciences*, *190*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.09.034>
- Jaryenneh, J., Schoeniger, J. S., & Mageeney, C. M. (2023). Genome sequence and characterization of a novel *Pseudomonas putida* phage, MiCath. *Scientific Reports*, *13*(1), 21834. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48634-z>
- Lázaro, E., Arribas, M., Cabanillas, L., Román, I., & Acosta, E. (2018). Evolutionary adaptation of an RNA bacteriophage to the simultaneous increase in the within-host and extracellular temperatures. *Scientific Reports*, *8*(1), 8080. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26443-z>
- Lee, L. F., & Boezi, J. A. (1966). Characterization of Bacteriophage gh-1 for *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, *92*(6), 1821–1827. <https://doi.org/10.1128/jb.92.6.1821-1827.1966>
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D708–D717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- López, E., Domenech, A., Ferrándiz, M.-J., Frias, M. J., Ardanuy, C., Ramirez, M., García, E., Liñares, J., & Campa, A. G. de la. (2014). Induction of Prophages by Fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Emergence of Resistance in Genetically-Related Clones. *PLOS ONE*, *9*(4), e94358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094358>
- Luria, S. E., & Steiner, D. L. (1954). THE ROLE OF CALCIUM IN THE PENETRATION OF BACTERIOPHAGE T5 INTO ITS HOST. *Journal of Bacteriology*, *67*(6), 635–639. <https://doi.org/10.1128/jb.67.6.635-639.1954>

- Maffei, E., Shaidullina, A., Burkolter, M., Heyer, Y., Estermann, F., Druelle, V., Sauer, P., Willi, L., Michaelis, S., Hilbi, H., Thaler, D. S., & Harms, A. (2021). Systematic exploration of *Escherichia coli* phage–host interactions with the BASEL phage collection: PLoS Biology. *PLoS Biology*, *19*(11), 1–52. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001424>
- Moraru, C., Varsani, A., & Kropinski, A. M. (2020). VIRIDIC—A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. *Viruses*, *12*(11), 1268. <https://doi.org/10.3390/v12111268>
- Ngiam, L., Weynberg, K. D., & Guo, J. (2022). The presence of plasmids in bacterial hosts alters phage isolation and infectivity: ISME Communications. *ISME Communications*, *2*(1). <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00158-9>
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D. U., Strömpl, C., Moore, E. R. B., & Timmis, K. N. (2002). Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environmental Microbiology*, *4*(12), 912–915. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00368.x>
- Rosendahl, S., Tamman, H., Brauer, A., Remm, M., & Hörak, R. (2020). Chromosomal toxin-antitoxin systems in *Pseudomonas putida* are rather selfish than beneficial. *Scientific Reports*, *10*(1), 9230. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65504-0>
- Sanz-Gaitero, M., Seoane-Blanco, M., & van Raaij, M. J. (2019). Structure and Function of Bacteriophages. D. R. Harper, S. T. Abedon, B. H. Burrowes, & M. L. McConville (Toim), *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy* (1k 1–73). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_1-1
- Seeley, N. D., & Primrose, S. B. (1980). The Effect of Temperature on the Ecology of Aquatic Bacteriophages. *Journal of General Virology*, *46*(1), 87–95. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-46-1-87>

- Suttle, C. A. (1994). The Significance of Viruses to Mortality in Aquatic Microbial Communities. *Microbial Ecology*, 28(2), 237–243.
- Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057), Article 7057.
<https://doi.org/10.1038/nature04160>
- Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., van Zyl, L. J., Aziz, R. K., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., Kropinski, A. M., Barylski, J., Brister, J. R., Chanisvili, N., Edwards, R. A., Enault, F., Gillis, A., Knezevic, P., Krupovic, M., ... Adriaenssens, E. M. (2023). Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 168(2), 74.
<https://doi.org/10.1007/s00705-022-05694-2>

Kasutatud veebiaadressid

- Australian Government Bureau of Meteorology, Climate statistics for Australian locations.* (2024). Vaadatud 23.05.2024.
http://www.bom.gov.au/climate/averages/tables/cw_040842_All.shtml
- Keskkonnaagentuur, Kliimanormid. (2020). Vaadatud 21.05.2024.
<https://www.ilmateenistus.ee/kliima/kliimanormid/ohutemperatuur/>
- Maaelu Teadmuskeskus, Eesti muldade seisund. (2022). Vaadatud 23.05.2024.
<https://metk.agri.ee/teadus-uuringud-projektid/mullastik/eesti-muldade-seisund>
- National Centers for Environmental Information, National Oceanic and Atmospheric Administration. U.S. Climate Normals.* (2020). Vaadatud 23.05.2024.
<https://www.ncei.noaa.gov/access/us-climate-normals/#dataset=normals-annualseasonal&timeframe=30&station=USC00044997>

Lisad

Lisa 1. Ülevaade kõigist testitud laikudest

Fenotüübi tulbas tähistab „S“ selget laiku, „H“ hägust laiku ning „VH“ väga hägust laiku. Perekondade tulbas tähistab lahtri oranž värvus, et laik ei kuulu kindlalt G5 perekonda, kuid osadel juhtudel ei ole lõplik perekonda kuuluvus kinnitatud, mispuhul on see tähistatud tähisega „?“ . Laigu koodil on tähendus, kusjuures „L“ tähistab lühikese rikastuse meetodit, „P“ üleöö rikastuse meetodit ja „S“ sadestuse meetodit. Kui proove inkubeeriti erinevatel temperatuuridel, on ka see välja toodud laigu koodis.

Nr.	Tüvi	Proov	Laigu Kood	Laigu fenotüüp (mm, selgus)	Perekond	Edasine töö	Lõplik nimetus
1	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L1	2,5 S	G7C	Puhastus	TOKO1
2	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L2	2,5 H	G7C	Puhastus	TOKO2
3	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L3	1 S	G5		
4	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L4	1 VH	G5		
5	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L5	1 H	G5		
6	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L6	1,5 S	G7	Kadus puhastusel	
7	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L7	1 S	G5		
8	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L8	1 S	G5		
9	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L9	1,5 H	G5		
10	Δ13TAΔ4φ	TOKO	L10	1 H	G5		
11	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S1	1 H	G5		
12	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S2	1 H	G5		
13	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S3	1 S	G5		
14	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S4	1 VH	G5		
15	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S5	1 S	G5		
16	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S6	1,5 S	G5		
17	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S7	1 H	G5		
18	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S8	1 VH	G5		
19	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S9	1,2 S	G5		
20	Δ13TAΔ4φ	TOKO	S10	1 S	G5		
21	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L1	>1 S	G5		
22	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L2	1 H	G5		
23	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L3	<1 H	G5		
24	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L4	<1 VH	G5		
25	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L5	1 S	G5		
26	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L6	1 H	G5		
27	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L7	1,5 VH	G9A	Puhastus	TOKA
28	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L8	1,5 VS	G5		
29	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L9	<1 H	G5		
30	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L10	2 S	G5		
31	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L11	-	G5		
32	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L12	-	G5		
33	Δ13TAΔ4φ	TOKA	L13	-	G5		

34	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	L14	-	G5		
35	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S1	<1 H	G5		
36	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S2	1 H	G5		
37	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S3	<1 VH	G5		
38	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S4	1,2 S	G5		
39	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S5	0,1 S	G5		
40	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S6	1 S	G5		
41	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S7	<1 H	G5		
42	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S8	1 S	G5		
43	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S9	1 VH	G5		
44	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	TOKA	S10	0,1 S	G5		
45	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P1	1 H	G6A	Puhastus	EIKI1
46	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P2	1 S	G6A	Puhastus	EIKI2
47	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P3	0,1 VH	?	Kadus puhastusel	
48	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P4	1,5 S	G6		
49	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P5	1 H	G6		
50	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P6	0,5 VH	G6		
51	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P7	1 H	G6		
52	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P8	0,5 VH	G6		
53	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P9	1 H	G6		
54	$\Delta 13TA\Delta 4\phi$	EIKI	P10	0,5 VH	G6		
55	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-1	1,5 S	G7B	Puhastus	KEKO1
56	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-2	0,5 H	?	Puhastus	KEKO2
57	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-3	0,5 S	G7		
58	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-4	1,5 S	G7		
59	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-5	0,5 H	G7		
60	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-6	0,5 H	G7		
61	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-7	0,5 H	G7		
62	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-8	0,5 H	G7		
63	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-9	0,5 H	G7		
64	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P15-10	0,5 H	G7		
65	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-1	1,5 S	G7		
66	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-2	1 VH	G7B	Puhastus	KEKO1 duplikaat
67	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-3	1 VH	?		
68	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-4	0,5 S	G7		
69	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-5	0,5 VH	?		
70	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-6	1 VH	G7		
71	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-7	1 S	G7		
72	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-8	1 VH	?		
73	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-9	1 VH	G7		
74	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	KEKO	P20-10	1 VH	?		
75	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	TOMU	P15-1	0,1 VH	?	Tühi proov	
76	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	TOMU	P15-2	0,1 VH	G6A	Puhastus	TOMU2
77	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	TOMU	P20-1	1 VH	?	Puhastus	
78	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	TOMU	P20-2	1 VH	?		
79	$\Delta 13TA\Delta 4\phi\Delta GRW$	TOMU	L15-1	1 S	G6		

80	Δ13TAΔ4φΔGRW	TOMU	S15-1	1,5 S	G6		
81	Δ13TAΔ4φΔGRW	TOMU	S15-2	1,5 S	G6		
82	Δ13TAΔ4φΔGRW	TOMU	S15-3	1,5 S	G6		
83	Δ13TAΔ4φΔGRW	TOMU	S15-4	1,5 S	G6A	Puhastus	TOMU4
84	Δ13TAΔ4φΔGRW	TOMU	S15-5	1,5 S	G6		
85	Δ13TAΔ4φΔGRW	TOMU	S15-6	1,5 S	G6		
86	Δ13TAΔ4φΔGRW	TOMU	S20-1	1,5 S	G6		
87	Δ13TAΔ4φΔGRW	TOMU	S20-2	1,5 S	G6		
88	Δ13TAΔ4φΔGRW	TOMU	S20-3	1,5 S	G6		
89	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	P15-1	-	?	Jät kub tulevikus	
90	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	P20-1	-	?	Jät kub tulevikus	
91	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	P20-2	-	?	Jät kub tulevikus	
92	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	P25-1	-	?	Jät kub tulevikus	
93	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	P25-2	-	?	Jät kub tulevikus	
94	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	P25-3	-	?	Jät kub tulevikus	
95	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	L20-1	1 H	?	Jät kub tulevikus	
96	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	L20-2	1 H	?	Jät kub tulevikus	
97	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	L20-3	1 H	?	Jät kub tulevikus	
98	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	L20-4	1 H	?	Jät kub tulevikus	
99	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S15-1	1,5 S	G6	Jät kub tulevikus	
100	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S15-2	1-1,5 H	G6	Jät kub tulevikus	
101	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S15-3	1-1,5 H	G6	Jät kub tulevikus	
102	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-1	1,5-2 S	G6	Jät kub tulevikus	
103	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-2	1,5-2 S	G6	Jät kub tulevikus	
104	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-3	1,5-2 S	G6	Jät kub tulevikus	
105	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-4	1,5-2 S	G6	Jät kub tulevikus	
106	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-5	1,5-2 S	G6	Jät kub tulevikus	
107	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-6	1 S	G6	Jät kub tulevikus	
108	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-7	1 S	G6	Jät kub tulevikus	
109	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-8	1 S	G6	Jät kub tulevikus	
110	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-9	1 S	G6	Jät kub tulevikus	
111	Δ13TAΔ4φΔGRW	TT	S20-10	1,5 S	G6	Jät kub tulevikus	
112	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P20-1	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	
113	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P20-2	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	
114	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P20-3	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	
115	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P20-4	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	
116	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P20-5	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	
117	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P25-1	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	
118	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P25-2	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	
119	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P25-3	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	
120	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P25-4	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	
121	Δ13TAΔ4φΔGRW	MUKI	P25-5	0,5 VH	?	Jät kub tulevikus	

Lisa 2. Täispikkuses tabel Δ13TAΔ4φΔGRW tüvega tehtud proovidest

Proov	Proovi tüüp	Meetod, ink. Temp (°C)	Laike/taass	Testitud laigud	Mitte-G5	% Mitte-G5
Kerna Kompost (KEKO)	muld	üleöö rik. 15	100	10	10	100%
		üleöö rik. 20	50	10	10	100%
		üleöö rik. 25	0			
		lühike rik.15	0			
		lühike rik. 20	0			
		lühike rik. 25	0			
		sadestus 15	0			
		sadestus 20	0			
		sadestus 25	0			
Rita Aed Vana Kompost	muld	üleöö rik. 15	0			
		üleöö rik. 20	0			
		üleöö rik. 25	0			
		lühike rik.15	0			
		lühike rik. 20	0			
		lühike rik. 25	0			
		sadestus 15	0			
		sadestus 20	0			
		sadestus 25	0			
Tõrva Mutimuld (TOMU)	muld	üleöö rik. 15	4	2	2	100%
		üleöö rik. 20	3	2	2	100%
		üleöö rik. 25	0			
		lühike rik.15	1	1	1	100%
		lühike rik. 20				
		lühike rik. 25	0			
		sadestus 15	6	6	6	100%
		sadestus 20	3	3	3	100%
		sadestus 25	0			
Eisma Teetruup (TT)	muld	üleöö rik. 15	1	1	1	100%
		üleöö rik. 20	2	2	2	100%
		üleöö rik. 25	5	3	3	100%
		lühike rik.15	0			
		lühike rik. 20	4	4	4	100%
		lühike rik. 25	0			
		sadestus 15	3	3	3	100%
		sadestus 20	19	10	10	100%
		sadestus 25	0			
Saaremaa Kraaviperv	muld	üleöö rik. 15	0			
		üleöö rik. 20	0			
		üleöö rik. 25	0			

		lühike rik.15	0			
		lühike rik. 20	0			
		lühike rik. 25	0			
		sadestus 15	0			
		sadestus 20	0			
		sadestus 25	0			
Kivimüür Lillede						
Muld	muld	üleöö rik. 15	0			
		üleöö rik. 20	20	5	5	100%
		üleöö rik. 25	20	5	5	100%
		lühike rik.15	0			
		lühike rik. 20	0			
		lühike rik. 25	0			
		sadestus 15	0			
		sadestus 20	0			
		sadestus 25	0			
		KOKKU		67	67	

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Juhan Mattias Laipaik,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „*Pseudomonas putida* bakteriofaagide keskkonnast eraldamise meetodid“, mille juhendaja on Hedvig Tamman, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Juhan Mattias Laipaik

27.05.2024