

UNIwersYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSTYTUT BIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ



Charakterystyka nowo odkrytego bakteriofaga ΦAGATE wyizolowanego z wody i osadów Jeziora Góreckiego.

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Anny Goździckiej-Józefiak
w Zakładzie Wirusologii Molekularnej
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

Jakub Barylski

Poznań 2012

*Learning to see the structures
within which we operate begins a process of freeing ourselves
from previously unseen forces and ultimately mastering the ability
to work with them and change them.*

Peter Senge: The Fifth Discipline

*Pragnę złożyć szczególne podziękowania:
Pani Prof. dr hab. Annie Goździckiej-Józefiak
za opiekę naukową, przekazaną wiedzę,
nieocenioną pomoc w realizacji tej pracy
oraz mobilizację i stworzenie
doskonałego klimatu do pracy naukowej*

Rodzicom i żonie za bezgraniczne wsparcie, troskę i cierpliwość

*Serdecznie dziękuję również:
Wydziałowej Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej oraz
Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej,
za życzliwość i pomoc w trudnych sytuacjach*

*Koleżankom i kolegom
Zakładu Wirusologii Molekularnej oraz Zakładu Hydrobiologii
za pomoc i miłą atmosferę
w tym szczególnie :
mgr Ali Warowickiej za pomoc w uporaniu się ze stroną formalną pracy
dr Robertowi Nawrotowi za współpracę, naukę i fachowe wskazówki
oraz
mgr Grzegorzowi Nowickiemu za bezcenne konsultacje i...
chłodny powiew realizmu, zawsze gdy był potrzebny*

Streszczenie

Mikrobiologia ekosystemów wodnych jest od wielu lat obiektem szeroko zakrojonych badań.

Większość dotychczas dostępnych danych pochodzi jednak z badań ekosystemów morskich, mniej jest natomiast danych na temat mikroorganizmów i ich roli w wodach słodkich. Otwiera się, więc szerokie pole dla badań środowisk jezior, rzek oraz mniejszych zbiorników wodnych. Jednym ze słabiej poznanych aspektów mikrobiologii środowisk wodnych jest obecność w nich wirusów, a także rola jaką pełnią w tych ekosystemach.

Najpowszechniej występującymi w środowisku naturalnym wirusami są bakteriofagi.

W trakcie badań nad ekosystemem mikroflorą Jeziora Góreckiego (jezioro eutroficzne w centralnej części Wielkopolskiego Parku Narodowego) odkryto bakteriofagi zakażające dwa izolaty bakterii z tego pochodzące z zbiornika. Jeden z nich, fag Φ AGATE infekujący *Bacillus pumilus* okazał się być przedstawicielem nowego, nie znanego jeszcze gatunku.

Celem niniejszej pracy była charakterystyka zarówno molekularnych jak i morfologicznych oraz fizjologicznych aspektów biologii wyizolowanego faga.

Poznano pełną sekwencję genomu faga Φ AGATE i przeprowadzono wstępną analizę proteomu. W związku z odnalezieniem w jego genomie sekwencji kodujących białka o potencjale aplikacyjnym (w tym hydrolazę kwasu poli- γ -glutaminowego) rozpoczęto też ocenę możliwości ich zastosowania.

Abstract

Microbiology of aquatic ecosystems has recently been a topic of extensive studies.

Most of these studies are focused on marine environments. Only a small fraction of microbiological papers concern freshwater biota and the least explored topics are the presence of viruses in these systems and their role in limnetic or benthic ecosystems.

The most common viruses in environment are bacteriophages.

During the investigation of microflora of Góreckie Lake (an eutrophic lake in a central part of Wielkopolski National Park, Poland), bacteriophages infecting two strains originating from this reservoir were isolated. One of them, named Φ AGATE, turned out to be a member of a novel, unknown species.

The aim of this study was characterization of molecular biology, morphology and physiology of this phage.

During the investigation, full genome of the bacteriophage Φ AGATE was sequenced and preliminary data about its proteome were gathered. Also, activity of a selected enzyme (poly- γ -glutamate hydrolase), potentially useful in biotechnology, was assessed in order to determine perspectives of its future applications.

Spis treści

Wykaz skrótów:

I.	Wstęp	1
I.1.	Wprowadzenie	1
I.2.	Charakterystyka wirusów prokariotycznych	2
I.2.1.	Klasyfikacja i przebieg różnych typów zakażeń bakteriofagowych.....	2
I.2.1.1.	Zakażenie lityczne	3
I.2.1.2.	Zakażenie chroniczne.....	3
I.2.1.3.	Zakażenie lizogenne.....	3
I.2.1.4.	Pseudolizogenia	4
I.2.1.5.	Restrykcja	4
I.2.1.6.	Zakażenie poronne	5
I.2.2.	Taksonomia wirusów bakteryjnych	6
I.2.2.1.	Rząd <i>Caudovirales</i>	8
I.2.2.1.1.	Rodzina <i>Myoviridae</i>	8
I.2.2.1.2.	Rodzina <i>Podoviridae</i>	9
I.2.2.1.3.	Rodzina <i>Siphoviridae</i>	9
I.2.2.2.	Rodzina <i>Tectiviridae</i>	9
I.2.2.3.	Rodzina <i>Corticoviridae</i>	10
I.2.2.4.	Rodzina <i>Plasmaviridae</i>	10
I.2.2.5.	Rodzina <i>Inoviridae</i>	10
I.2.2.6.	Rodzina <i>Cystoviridae</i>	11
I.2.2.7.	Rodzina <i>Leviviridae</i>	11

I.2.2.8.	Rodzina <i>Microviridae</i>	11
I.2.2.9.	Fagi infekujące <i>Archaea</i>	12
I.2.3.	Wirusy w ekosystemie jeziora eutroficznego	13
I.2.3.1.	Gospodarze bakteriofagów: bakterie (w tym cyjanobakterie) w ekosystemie jeziora eutroficznego.....	13
I.2.4.	Ekologia wirusów bakteryjnych	14
I.2.4.1.	Ekologia ewolucyjna wirusów bakteryjnych i gospodarzy	14
I.2.4.2.	Rola bakteriofagów w procesach horyzontalnego transferu genów	16
I.2.4.3.	Bakteriofagi jako jedna z najistotniejszych przyczyn śmiertelności w populacjach bakterii	18
I.2.4.4.	Bakteriofagi jako część pętli mikrobiologicznej i ważne ogniwo w obiegu materii w ekosystemach wodnych.	18
I.3.	Zastosowanie bakteriofagów w gospodarce człowieka	20
I.3.1.	Fagoterapia	20
I.3.2.	Enzymy fagowe jako nowa grupa czynników przeciwbakteryjnych.....	23
I.3.3.	Enzymy fagowe jako narzędzia współczesnej biologii i biotechnologii	26
I.3.4.	Fagowe sekwencje DNA w inżynierii genetycznej	28
II.	Cel pracy	30
III.	Zadania badawcze	31

IV. Materiały i metody	32
IV.1. Podłoża mikrobiologiczne	32
IV.2. Bufory i roztwory	33
IV.3. Żele	36
IV.4. Szczepy	37
IV.5. Wektoty	37
IV.5.1. Wzorce mas cząsteczkowych (markery wielkości)	37
IV.6. Zestawy do identyfikacji bakterii na podstawie wyników testów biochemicznych	37
IV.7. Zestawy do izolacji kwasów nukleinowych	37
IV.8. Startery	38
IV.9. Oprogramowanie i serwisy internetowe	42
IV.10. Usługi	43
IV.11. Teren badań	44
IV.12. Metody	45
IV.12.1. Pobór prób	45
IV.12.2. Izolacja czystych kultur bakterii z prób wody	45
IV.12.3. Identyfikacja szczepów bakterii na podstawie sekwencji regionu 16S rDNA	45
IV.12.3.1. Przygotowanie matryc do reakcji PCR	45
IV.12.3.2. Amplifikacja regionu 16S rDNA	46
IV.12.3.3. Sekwencjonowanie produktów PCR	46
IV.12.4. Izolacja bakteriofagów dla wybranych bakterii występujących w Jeziorze Góreckim	47
IV.12.5. Mianowanie faga	47

IV.12.6.	Namnażanie uzyskanych izolatów faga	48
IV.12.7.	Przygotowanie lizatów fagowych	48
IV.12.8.	Charakterystyka gospodarzy wyizolowanych bakteriofagów	48
IV.12.9.	Badania oddziaływań antagonistycznych pomiędzy wybranymi gatunkami bakterii	49
IV.12.10.	Ustalenie zakresu gospodarzy zakażanych przez faga.....	49
IV.12.11.	Krzywa replikacji faga Φ AGATE	49
IV.12.12.	Wizualizacja cząstek fagowych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej	50
IV.12.13.	Izolacja fagowego DNA	50
IV.12.14.	Analiza wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych w wyniku trawienia genomowego DNA faga Φ AGATE enzymami <i>KpnI</i> i <i>SalI</i>	51
IV.12.15.	Przygotowanie i sekwencjonowanie biblioteki fagowego DNA	51
IV.12.16.	Przygotowanie komórek kompetentnych <i>Escherichia coli</i> DH5 α	51
IV.12.17.	Ligacja fragmentów restrykcyjnych z wektorem pBluescript	51
IV.12.18.	Transformacja komórek <i>E. coli</i> konstruktami zawierającymi fragmenty restrykcyjne fagowego DNA	52
IV.12.19.	Izolacja plazmidowego DNA.....	52
IV.12.20.	Sekwencjonowanie otrzymanych konstruktów.....	52
IV.12.21.	Amplifikacja sekwencji zakonserwowanych u bakteriofagów z rzędu <i>Caudovirales</i>	53
IV.12.22.	Wydłużanie otrzymanych sekwencji.....	54
IV.12.23.	Sekwencjonowanie na matrycy genomowej lub plazmidowej	54
IV.12.24.	PCR "z jednego startera"	54
IV.12.25.	Wydłużanie miejsc restrykcyjnych	57
IV.12.26.	Łączenie otrzymanych sekwencji.	59

IV.12.27.	Sekwencjonowanie całego genomu metodą 454	60
IV.12.28.	Składanie i anotacja genomu faga.....	60
IV.12.29.	Przygotowanie ekstraktów całkowitego białka z zakażonych i niezakażonych kultur fagowych przez strącanie siarczanem amonu.	60
IV.12.30.	Przygotowanie ekstraktu białka z zakażonych fagiem Φ AGATE kultur <i>B. pumilus</i> przez strącanie PEG 8000	61
IV.12.31.	Oczyszczanie białek z otrzymanych ekstraktów.....	61
IV.12.32.	Rozdziały białek z zakażonych i niezakażonych fagiem Φ AGATE kultur <i>B. pumilus</i> w warunkach denaturujących (PAGE)	61
IV.12.33.	Elektroforeza dwukierunkowa białek fagowych oraz bakteryjnych.....	62
IV.12.34.	Identyfikacja białek fagowych na podstawie profilu peptydów otrzymanego w spektrometrii mas.....	62
IV.12.35.	Analiza filogenetyczna na podstawie przewidywanej sekwencji głównego białka kapsydu oraz białka portalu	63
IV.12.36.	Izolacja kwasu poli- γ -glutaminowego (γ PGA) z kultur bakteryjnych	63
IV.12.37.	Testy aktywności hydrolazy kwasu poli- γ -glutaminowego	64

V. Wyniki	65
V.1. Izolacja bakterii tlenowych, fakultatywnie beztlenowych i aerotolerancyjnych z prób wody	65
V.2. Identyfikacja szczepów bakterii na podstawie fragmentów sekwencji regionu 16S rDNA.....	66
V.3. Badania oddziaływań antagonistycznych pomiędzy wybranymi gatunkami bakterii	68
V.4. Izolacja bakteriofagów dla wybranych bakterii występujących w jeziorze Góreckim	68
V.5. Określenie zakresu gospodarzy infekowanych przez wyizolowane fagi	69
V.6. Charakterystyka gospodarzy wyizolowanych bakteriofagów	69
V.7. Wizualizacja cząstek fagowych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej	71
V.8. Krzywa replikacji	71
V.9. Izolacja fagowego DNA	72
V.10. Analiza wielkości fragmentów powstałych w wyniku trawienia restrykcyjnego genomowego DNA faga Φ AGATE	73
V.11. Przygotowanie biblioteki fagowego DNA	74
V.12. Wydłużanie otrzymanych sekwencji	75
V.13. Sekwencjonowanie całego genomu metodą 454an	76
V.14. Analiza struktury i anotacja genomu faga	76
V.15. Rozdziały białek z zakażonych i niezakażonych kultur <i>B. pumilus</i> w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (PAGE)	81
V.16. Elektroforeza dwukierunkowa białek z zakażonych i niezakażonych kultur <i>B. pumilus</i>	82
V.17. Identyfikacja białek fagowych na podstawie profilu peptydów otrzymanego metodą spektrometrii mas	84

V.18. Analiza filogenetyczna na podstawie przewidywanej sekwencji głównego białka kapsydu oraz białka portalu.....	93
V.19. Izolacja kwasu poli- γ -glutaminowego z kultur bakteryjnych	95
V.20. Testy aktywności hydrolazy kwasu poli- γ -glutaminowego	96
VI. Dyskusja	97
VI.1. Izolacja bakterii tlenowych, fakultatywnie beztlenowych i aerotolerancyjnych z wody Jeziora Góreckiego.....	97
VI.2. Izolacja bakteriofaga Φ AGATE.....	98
VI.3. Identyfikacja gospodarza	98
VI.4. Określenie zakresu gospodarzy infekowanych przez wyizolowanego faga Φ AGATE	99
VI.5. Charakterystyka i znaczenie gospodarza	100
VI.6. Bakteriofagi zakażające <i>Bacillus pumilus</i>	101
VI.7. Morfologia faga Φ AGATE.....	101
VI.8. Analiza wielkości fragmentów powstałych w wyniku trawienia restrykcyjnego genomowego DNA faga Φ AGATE.....	102
VI.9. Sekwencjonowanie genomu.....	102
VI.10. Anotacja genomu faga	103
VI.11. Identyfikacja białek fagowych metodą tandemowej spektrometrii mas	104
VI.12. Analiza filogenetyczna.....	105
VI.13. Aktywności hydrolazy kwasu poli- γ -glutaminowego.....	106
VII. Podsumowanie:	107
VIII. Wnioski końcowe:.....	108
Bibliografia.....	109

Wykaz skrótów

APS	nadsiarczan amonu (ang. <i>ammonium persulfate</i>)
ATTC	Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych (ang. <i>American Type Culture Collection</i>)
cDNA	komplementarny DNA powstały w wyniku odwrotnej transkrypcji cząsteczki RNA
cfu	jednostka tworząca kolonię (ang. <i>colony forming unit</i>)
CHAPS	3- [(3-cholamidopropyl)-dimetyloamonio]-propano-sulfonian (ang. 3- [(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) detergent dipolarny wykorzystywany do solubilizacji białek
dNTP	trifosforany deoksyrybonukleotydów (mieszanina dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DOC	DOC rozpuszczony węgiel organiczny (ang. <i>dissolved organic carbon</i>)
dsDNA	dwuniciowy (ang. <i>double stranded</i>) DNA
dsRNA	dwuniciowy (ang. <i>double stranded</i>) RNA
DTT	ditiotreitol
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy (zwany też wersenowym, ang. <i>ethylenediaminetetraacetate</i>)
EHEC	enterokrwotoczne szczepy <i>Escherichia coli</i> (ang. EHEC - <i>enterohemorrhagic Escherichia coli</i>)
ICTV	Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
KpnI	endonukleaza restrykcyjna (izolowana z <i>Klebsiella pneumoniae</i>)
kpz	tysięcy par zasad (kilo par zasad)
kz	tysięcy zasad (kilo zasad)
LC-ESI-MS/MS	tandemowa spektrometria mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznymangnetycznym sprzężona z chromatografią cieczową (ang. <i>liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>)
Orf	otwarta ramka odczytu (ang. <i>open reading frame</i>)
ori	miejsce startu replikacji (ang. <i>origin of replication</i>)
PCM	Polska Kolekcja Drobnoustrojów (ang. <i>Polish Collection of Microorganisms</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PEG	glikol polietylenowy (właściwie Poli(tlenek etylenu)) polimer powszechnie używany w biologii molekularnej, stosowany między innymi do strącania cząstek wirusowych (w buforach zawierających odpowiednie stężenie NaCl powoduje on agregację tych cząstek)
pfu	jednostka tworząca łysinkę (ang. plaque forming unit)
PIPES	was piperazyno-1,4-bis(2-etanosulfonowy),(ang. piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) związek używany do przygotowania buforów
rDNA	DNA kodujące rybosomale RNA
rRNA	rybosomalny RNA
ryc.	rycina
SalI	endonukleaza restrykcyjna (izolowana z <i>Streptomyces albus</i>)
SDS	siarczan sodowo-laurylowy (nazywany również dodecylosiarczanem(VI) sodu, ang. Sodium Dodecyl Sulfate)
ssDNA	jednoniciowy (ang. single stranded) DNA
ssRNA	jednoniciowy (ang. single stranded) RNA
TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. transmission electron microscopy)
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan (właściwie 2-amino-3-(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol) związek używany do przygotowywania wielu buforów używanych w biologii molekularnej
γPGA	kwas poli-γ-glutaminowy (ang. poly(gamma-glutamic acid))- niebiałkowy polipeptyd syntezowany przez niektóre bakterie z typu Firmicutes

I. Wstęp

I.1. Wprowadzenie

Mikrobiologia ekosystemów wodnych jest od wielu lat obiektem szeroko zakrojonych badań.

Większość dotychczas dostępnych danych pochodzi jednak z badań ekosystemów morskich, mniej jest natomiast danych na temat mikroorganizmów i ich roli w wodach słodkich. Otwiera się, więc szerokie pole dla badań środowisk jezior, rzek oraz mniejszych zbiorników wodnych. Tematyka ta wydaje się tym ważniejsza, że coraz częściej podnosi się problem dostępu do dobrej jakości wody słodkiej jako kluczowych zagadnień cywilizacyjnych.

Jednym ze słabiej poznanych aspektów mikrobiologii środowisk wodnych jest obecność w nich wirusów, a także rola jaką pełnią w tych ekosystemach. Z kolei większość danych dostępnych na ten temat pochodzi wyłącznie z metod ilościowych. Najczęściej stosowane są techniki liczenia cząstek wirusopodobnych za pomocą mikroskopii elektronowej lub mikroskopii epifluorescencyjnej czy NanoSight. Warto uzupełnić te badania o pogłębioną analizę biologii wirusów wodnych.

Najpowszechniej występującymi w środowisku naturalnym wirusami są bakteriofagi. Ich wpływ na funkcjonowanie ekosystemów wodnych, choć znaczący, wciąż nie jest jeszcze w pełni poznany. Fagi i ich elementy pełnią także istotną rolę w gospodarce człowieka, a badania nad ich wykorzystaniem w medycynie po latach marginalizacji wracają do łask. Z tych właśnie powodów bakteriofagi wybrałem jako obiekt moich badań i temat niniejszej rozprawy.

I.2. Charakterystyka wirusów prokariotycznych

Wirusy prokariotów można podzielić na podstawie ich gospodarzy na: fagi zakażające *Archaea* oraz bakteriofagi. Wśród tych, z kolei wyróżnia się jako oddzielną grupę cyjanofagi, czyli wirusy infekujące sinice.

Wśród dotychczas poznanych fagów występują wirusy mające genomy w formie jedno i dwuniciowego RNA i DNA. Najmniejsze genomy fagowe są zbudowane z około 3,5 kb (fag *bz13 Escherichia coli*), a największe 670 kbp (fag *G Bacillus megaterium*) [1, 2, 3]. Także budowa ich wirionów jest niezwykle zróżnicowana. Małe i proste ikosaedralne wiriony rodziny *Leviviridae* różnią się znacznie do skomplikowanych wirionów bakteriofagów z rzędu *Caudovirales*. Szerszy opis morfologii różnych grup fagów i struktury ich genomów znajduje się w rozdziale I.2.2.

I.2.1. Klasyfikacja i przebieg różnych typów zakażeń bakteriofagowych

W literaturze zwykle opisuje się tylko lityczną i lizogenną drogę zakażenia fagiem. Są to jednak tylko dwa z wielu możliwych scenariuszy jego przebiegu. Nie wszystkie zakażenia muszą kończyć się śmiercią komórki gospodarza i nie wszystkie pozwalają na replikację cząstek fagowych.

Jeden bakteriofag może przechodzić kilka różnych ścieżek infekcji w zależności od warunków środowiskowych oraz cech genetycznych i fizjologicznych gospodarza.

Zakażenie fagiem zawsze rozpoczyna się od adsorpcji bakteriofaga do powierzchni komórki gospodarza i wniknięcia wirusowego genomu do jej wnętrza. Tym co różni możliwe drogi infekcji są dalsze losy genomu faga, komórki bakteryjnej oraz powstanie lub nie wirionów potomnych.

I.2.1.1. Zakażenie lityczne

Lityczną drogę zakażenia definiuje produkcja wirionów potomnych kończąca się lizą komórki gospodarza. Materiał genetyczny faga nie integruje zwykle do genomu bakterii (choć istnieją wyjątki jak np. bakteriofag Mu).

Po wnikięciu fagowego materiału genetycznego do komórki rozpoczyna się synteza białek odpowiedzialnych za replikację genomu fagowego i regulację transkrypcji (białka wczesne). Kolejnymi krokami są zwykle replikacja wirusowego genomu, synteza białek strukturalnych, a następnie składanie i uwalnianie wirionów potomnych. Uwalnianie to odbywa się najczęściej przy udziale lizyn - enzymów rozkładających ścianę komórkową bakterii. Fagi, które przechodzą wyłącznie cykl lityczny nazywa się zjadliwymi lub bezwzględnie litycznymi. Do tej grupy wirusów należą np. fagi T4 czy Φ X174 *Escherichia coli* [4, 5].

I.2.1.2. Zakażenie chroniczne

Podczas infekcji chronicznej następuje produkcja wirionów potomnych, nie dochodzi jednak do lizy komórki gospodarza. Wiriony wypączkowują lub są eksportowane na zewnątrz komórki przez kompleksy białkowe. Fakt, iż infekcja nie jest bezpośrednią przyczyną śmierci nie oznacza jednak, że nie ma ona wpływu na żywotność i stan fizjologiczny komórki gospodarza. Produkcja wirionów potomnych jest dla bakterii dużym wydatkiem energetycznym i może zmniejszać zdolność bakterii do konkurencji o niszę ekologiczną. Przykładami fagów zdolnych do wywoływania infekcji chronicznej są fagi M13 i f1 zakażające *Escherichia coli* [4, 5].

I.2.1.3. Zakażenie lizogenne

Podczas zakażenia lizogenego po wnikięciu do komórki bakterii fagowego materiału genetycznego dochodzi do jego integracji z genomem gospodarza. Reakcja ta katalizowana jest przez fagowe rekombinazy zwane integrasami. Zintegrowany materiał genetyczny faga jest nazywany profagiem. Ulega on powieleniu wraz z genomem gospodarza, nie dochodzi jednak do powstawania wirionów potomnych. Dzieje się tak ze względu na odpowiednią regulację ekspresji niektórych fagowych genów. Stan taki, określany jako represja faga, może utrzymywać się przez długi czas. Niekiedy jednak dochodzi do zniesienia represji czyli indukcji faga i wejścia wirusa na drogę lityczną.

Może to nastąpić pod wpływem czynników fizycznych lub chemicznych np. stresów środowiskowych. Profag wycina się z genomu gospodarza i rozpoczyna się synteza genów odpowiedzialnych za replikację bakteriofaga, a następnie lizę komórki.

Występowanie lizogenii ma ogromne znaczenie dla fizjologii i ewolucji bakterii, gdyż wiąże się ze zjawiskami konwersji i transdukcji fagowej (opisanymi szerzej w rozdziale I.2.4.2).

Na drogę infekcji lizogennej mogą wchodzić takie fagi jak np. fag λ *Escherichia coli* czy SPO2 *Bacillus subtilis* [4, 5].

I.2.1.4.Pseudolizogenia

Jeśli fag infekuje komórkę bakteryjną, lecz nie replikuje się w niej ani nie wchodzi na drogę lizogenii mamy zwykle do czynienia ze zjawiskiem pseudolizogenii. Genom bakteriofaga utrzymuje się w komórce w stanie „nieaktywnym”. Często dzieje się tak kiedy stan fizjologiczny gospodarza nie pozwala na normalny przebieg zakażenia (np. z braku dostatecznych ilości składników pokarmowych). Pseudolizogenia nie jest stanem stabilnym. Po zmianie wywołujących ją warunków bakteriofag często wchodzi na drogę lityczną, chroniczną lub lizogenną. Czasem dochodzi do usunięcia genomu wirusa z komórki co określane jest jako "wyleczenie" bakterii.

Niekiedy zamiast terminu pseudolizogenia używane jest określenie "nosicielstwo" (ang. *carrier state*). Część autorów nazywa w ten sposób, także stan, w którym w kulturze występują zarówno bakterie wrażliwe jak i odporne na zakażenie fagiem. Częstki wirusowe utrzymują się w takiej kulturze w niewielkich ilościach [6].

I.2.1.5.Restrykcja

Penetracja genomu faga do komórki bakterii odpornej może doprowadzić do zniszczenia wirusa bez obniżenia żywotności komórki bakteryjnej. Fagowy DNA zostaje rozłożony przez nukleazy gospodarza. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa bakteryjny system restrykcji/modyfikacji. Jest on złożony z endonukleaz restrykcyjnych rozpoznających i tnących swoiste sekwencje DNA oraz metylaz rozpoznających te same motywy w genomie bakteryjnym i modyfikujących je przez dodanie grupy metylowej [6, 7].

I.2.1.6. Zakażenie poronne

Z zakażeniem poronnym (ang. *abortive infection*) mamy do czynienia, gdy po wniknięciu genomu faga do komórki następuje śmierć gospodarza, której nie towarzyszy replikacja faga. Niekiedy jest ona wynikiem uszkodzenia komórki w trakcie początkowych stadiów infekcji, lecz często stanowi raczej formę programowanej śmierci komórki. Przykładem takiego mechanizmu mogą być systemy toksyna/antytoksyna występujące u bakterii z rodzaju *Lactococcus*. U niezakażonych bakterii działanie obydwu składników układu jest zrównoważone. Po zakażeniu wzrasta stosunek toksyny do antytoksyny co powoduje śmierć bakterii. Choć z pozoru mechanizm ten może wydawać się ewolucyjnie niekorzystny, to chroni on populację bakterii złożoną często z klonów jednej komórki przed rozszerzaniem się zakażenia [6, 8].

I.2.2. Taksonomia wirusów bakteryjnych

Taksonomia wirusów bakteryjnych jest dziedziną stosunkowo słabo rozwiniętą i obarczoną licznymi trudnościami. Obecnie stosowane i akceptowane przez ICTV (ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses* - Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów) kryteria klasyfikacji bakteriofagów biorą pod uwagę głównie rodzaj genomu (DNA lub RNA każdy z nich w formie jednonicowej lub dwuniciowej) i morfologię wirionu. Taki podział jest z natury swojej sztuczny, nie bierze bowiem pod uwagę danych genomicznych, proteomicznych ani ekologii i fizjologii faga.

Niestety, uwzględnienie tych informacji nie jest sprawą prostą. Jedną z przyczyn takiego stanu jest powszechne u wirusów bakteryjnych zjawisko horyzontalnego transferu genów. Genomy fagowe często nazywane są „mozaikowymi” gdyż ich elementy wydają się mieć różne pochodzenie [9, 10]. Horyzontalny transfer genów zachodzi między bakteriofagami oraz między tymi wirusami i ich gospodarzami. W istocie wiele enzymów zakodowanych w genomach fagów bardziej przypomina sekwencją białka gospodarzy niż innych wirusów. W związku z tymi trudnościami zaproponowano kilka alternatywnych systemów taksonomicznych. Przykładem może być system Rohwer'a i Edwards'a, w którym klasyfikacja fagów miałaby się odbywać na podstawie podobieństwa całego (znanego lub przewidywanego na podstawie danych genomowych) proteomu faga. Podejście takie nie omija części problemów szczególnie tych związanych z transferem całych genów. Interesująca wydaje się metoda klasyfikacji oparta o badanie podobieństwa genów strukturalnych, w szczególności białek portalu odpowiedzialnych za pakowanie materiału genetycznego do wirionów. Pojawiają się także sugestie, aby zrezygnować z sztywnego hierarchicznego systemu taksonomicznego i stworzyć model „sieciowy” oparty na szerokiej analizie zarówno cech genomicznych oraz biochemicznych, jak i morfologicznych. Opisywany system mógłby być na tyle elastyczny, że umożliwiałby zaklasyfikowanie jednego wirusa do kilku grup w zależności od zespołu rozpatrywanych cech [9, 11].

Podsumowując warto zwrócić uwagę, iż obecnie stosowana klasyfikacja bakteriofagów (przedstawiona w tabeli1) jest raczej umowna. Niezależnie od przyjętej metody nie uniknie się pewnych pułapek związanych ze złożoną genetyką, a do postulowanych zależności filogenetycznych powinno odnosić się z dużą ostrożnością.

Genom	Rząd:	Rodzina:	Rodzaj:	Gospodarz	Nazwa gatunku typowego
dsDNA	Caudovirales	Myoviridae	„wirusy podobne do faga T4"	<i>Bacteria</i> <i>Archaea</i>	fag T4 <i>Escherichia coli</i>
			„wirusy podobne do faga P1"		fag P1 <i>Escherichia coli</i>
			„wirusy podobne do faga P2"	<i>Bacteria</i>	fag P2 <i>Escherichia coli</i>
			„wirusy podobne do faga Mu"	<i>Bacteria</i>	fag Mu <i>Escherichia coli</i>
			„wirusy podobne do faga SPO1"	<i>Bacteria</i>	fag SPO1 <i>Bacillus subtilis</i>
			„wirusy podobne do faga φH"	<i>Bacteria</i>	fag φH <i>Halobacterium halobium</i>
		Podoviridae	„wirusy podobne do faga T7"	<i>Bacteria</i>	fag T7 <i>Escherichia coli</i>
			„wirusy podobne do faga φ29"	<i>Bacteria</i>	fag φ29 <i>Bacillus subtilis</i>
			„wirusy podobne do faga P22"	<i>Bacteria</i>	fag P22 <i>Salmonella typhimurium</i>
			„wirusy podobne do faga N4"	<i>Bacteria</i>	fag N4 <i>Escherichia coli</i>
		Siphoviridae	„wirusy podobne do faga λ"	<i>Bacteria</i>	fag λ <i>Escherichia coli</i>
			„wirusy podobne do faga T1"	<i>Bacteria</i>	fag T1 <i>Escherichia coli</i>
			„wirusy podobne do faga T5"	<i>Bacteria</i>	fag T5 <i>Escherichia coli</i>
			„wirusy podobne do faga L5"	<i>Bacteria</i>	fag L5 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
			„wirusy podobne do faga c2"	<i>Bacteria</i>	fag c2 <i>Lactococcus lactis</i>
			„wirusy podobne do faga ψM1"	<i>Bacteria</i> <i>Archaea</i>	fag ψM1 <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
			„wirusy podobne do faga N15"	<i>Bacteria</i>	fag N15 <i>Escherichia coli</i>
			„wirusy podobne do faga φC31"	<i>Bacteria</i> <i>Archaea</i>	fag φC31 <i>Streptomyces coelicolor</i>
	-	Corticoviridae	Corticovirus	<i>Bacteria</i>	fag PM2 <i>Pseudoalteromonas espejiana</i>
		Fuselloviridae	Fusellovirus	<i>Archaea</i>	Wrzecionowaty wirus 1 <i>Sulfolobus</i>
		Guttaviridae	Guttavirus	<i>Archaea</i>	Łezkowaty Wirus <i>Sulfolobus newzealandicus</i>
		Lipothruxviridae	Alphalipothruxvirus	<i>Archaea</i>	Wirus 1 <i>Thermoproteus tenax</i>
			Betalipothruxvirus	<i>Archaea</i>	Wirus nitkowaty <i>Sulfolobus islandicus</i>
			Gammalipothruxvirus	<i>Archaea</i>	Wirus nitkowaty 1 <i>Acidianus</i>
		Plasmaviridae	Plasmavirus	<i>Bacteria</i>	fag L2 <i>Acholeplasma laidlawii</i>
		Rudiviridae	Rudivirus	<i>Archaea</i>	Wirus pałeczkowaty 2 <i>Sulfolobus islandicus</i>
			Salterprovirus	<i>Archaea</i>	Wirus His 1
		Tectiviridae	Tectivirus	<i>Bacteria</i>	fag PRD1 <i>Escherichia coli</i>
ssDNA	-	Inoviridae	Inovirus	<i>Bacteria</i>	fag M13 <i>Escherichia coli</i>
			Plectrovirus	<i>Bacteria</i>	fag MV-L51 <i>Acholeplasma laidlawii</i>
		Microviridae	Microvirus	<i>Bacteria</i>	fag φX174 <i>Escherichia coli</i>
			Spiromicrovirus	<i>Bacteria</i>	fag 4 <i>Spiroplasma melliferum</i>
			Bdellomicrovirus	<i>Bacteria</i>	fag MAC 1 <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
			Chlamydiamicrovirus	<i>Bacteria</i>	fag 1 <i>Chlamydomonas psittaci</i>
dsRNA	-	Cystoviridae	Cystovirus	<i>Bacteria</i>	fag φ6 <i>Pseudomonas syringae</i>
ssRNA	-	Leviviridae	Levivirus	<i>Bacteria</i>	fag MS2 <i>Escherichia coli</i>
(+)			Allolevirus	<i>Bacteria</i>	fag Qβ <i>Escherichia coli</i>

Tabela 1. Taksonomia wirusów prokariotycznych

I.2.2.1. Rząd *Caudovirales*

Wirusy z rzędu *Caudovirales* są najczęściej obserwowanymi z wszystkich bakteriofagów (według niektórych szacunków do tej grupy zalicza się 96% wszystkich znanych wirusów bakteryjnych [12, 13]). Ich genom tworzy pojedyncza liniowa cząsteczka dwuniciowego DNA. Charakterystyczną cechą fagów z tego rzędu jest złożona budowa wirionów. Składają się one z główki zawierającej wirusowy materiał genetyczny oraz ogonka. Główka ma symetrię ikozaedru, lub zniekształconego (wydłużonego) ikozaedru i może być zbudowana z 42-552 (najczęściej 72) kapsomerów i jest często obdzielona od ogonka przez tak zwany kołnierz. Ogonek zbudowany jest z podjednostek ułożonych helikalnie, lub w postaci "stosu dysków" (warstwowo), a jego długość waha się od 3 do 825 nm (w zależności od rodziny, do której należy wirus). Ogonek jest zwykle zakończony płytką podstawną, a ta z kolei może być zaopatrzona w jedno lub więcej (często sześć) dłuższych włókienek i/lub wypustki. Włókienka są fragmentem cząstki fagowej przystosowanym do oddziaływań z powierzchnią komórki gospodarza, szczególnie w początkowej fazie adsorpcji faga. Wiriony nie mają otoczki lipidowej. W skład tej grupy wchodzi trzy duże rodziny: *Myoviridae*, *Podoviridae* oraz *Siphoviridae* [4, 5, 11].

Rzędowi *Caudovirales* poświęcono w tej rozprawie szczególnie dużo uwagi gdyż odkryty w trakcie jej wykonywania bakteriofag Φ AGATE należy właśnie do niego.

I.2.2.1.1. Rodzina *Myoviridae*

U wirusów należących do rodziny *Myoviridae* występuje stosunkowo długi ogonek złożony z rdzenia i kurczliwej osłonki zbudowanej z jednakowych podjednostek białkowych. Kurczliwość ogonka uznawana jest za wyznacznik przynależności do grupy *Myoviridae*. Do skurczu najprawdopodobniej konieczna jest obecność ATP [4, 5]. Mechanizm ten umożliwia fagom z tej grupy penetrację błony i wstrzyknięcie DNA przez kanał rdzenia ogonka do wnętrza komórki bakteryjnej. Ogonek zakończony jest płytką podstawną zaopatrzoną zwykle w włókienka. Genomy członków rodziny *Myoviridae* składają się z 30-670 kbp. W skład rodziny wchodzi 8 rodzajów, a należące do niej wirusy infekujące zarówno *Bacteria* jak i *Archaea* [14]. Według niektórych szacunków do rodziny tej należy około 25% znanych bakteriofagów [12]. Typowym przedstawicielem tej rodziny jest np. bakteriofag T4 *Escherichia coli*.

I.2.2.1.2. Rodzina *Podoviridae*

Podoviridae są najmniejszą rodziną z rzędu *Caudovirales* (szacuje się, że należy do niej 14% obserwowanych wirusów bakteryjnych) [12, 13]. Charakterystyczną cechą wirusów z tej grupy jest krótki, niekurczliwy ogonek, często zakończony włókiemkami. Wielkość genomów wirusów z rodziny *Podoviridae* mieści się w granicach od 18 do 75 kpz. W skład rodziny wchodzi 2 podrodziny *Autographivirinae* (3 rodzaje) oraz *Picovirinae* (2 rodzaje), a także 6 rodzajów niezaklasyfikowanych do żadnej podrodziny. Przykładowy wirus z tej grupy to np. fag T7 *Escherichia coli* [5, 15, 16].

I.2.2.1.3. Rodzina *Siphoviridae*

Największą rodziną wchodzącą w skład rzędu *Caudovirales* jest *Siphoviridae* (szacuje się, że do rodziny tej należy aż 61% obserwowanych fagów). Charakterystyczną cechą wirusów z tej rodziny jest obecność długiego, lecz niekurczliwego ogonka, który jest zwykle zakończony płytką podstawną lub wypustką końcową z jednym lub kilkoma włókiemkami. Genomy tych wirusów składają się z 22-140 kpz [5, 15, 16]. Rodzina *Siphoviridae* obejmuje 9 rodzajów, a wchodzące w jej skład wirusy atakują zarówno bakterie jak i archeony. Przykładem wirusa z rodziny *Siphoviridae* jest np. fag λ *Escherichia coli* [14, 17].

I.2.2.2. Rodzina *Tectiviridae*

Kolejną rodziną fagów o materiale genetycznym w postaci liniowego dwuniciowego DNA jest *Tectiviridae*. Jej członkowie posiadają nieopłaszczony, ikozaedralny kapsyd, zaopatrzony w wypustki. Wewnątrz kapsydu znajduje się pęcherzyk lipidowy zawierający materiał genetyczny. Podczas infekcji pęcherzyk może się odkształcać i łączyć się z błoną bakterii przez por powstający w kapsydie. Tworzy się wtedy struktura przypominająca nieco ogonek, przez którą genom wirusa przedostaje się do wnętrza komórki gospodarza. Wielkość genomów tych fagów mieści się w granicach 13-15 kpz [15, 16, 18]. Rodzina *Tectiviridae* zawiera tylko jeden rodzaj (*Tectivirus*), a jej typowym przedstawicielem jest fag PRD1 zakażający bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* [14, 17].

I.2.2.3.Rodzina *Corticoviridae*

Wirusy z rodziny *Corticoviridae* należą do fagów zawierających materiał genetyczny w postaci kolistego superhelikalnie skręconego dwuniciowego DNA. Ikozaedralny wirion zaopatrzony jest w wypustki. Pod kapsydem znajduje się warstwa lipidowa, a w niej genom o wielkości około 10 kpz. [15, 18, 19]. Do rodziny *Corticoviridae* należy jeden rodzaj, zawierający tylko jeden znany gatunek: faga PM2 *Pseudoalteromonas espejiana* [14, 17, 20].

I.2.2.4.Rodzina *Plasmaviridae*

Kolejną rodziną bakteriofagów mających genom w postaci kolistego superhelikalnie skręconego dwuniciowego DNA jest *Plasmaviridae*. Wielkość genomu wynosi około 12 kpz. Wirusy te nie posiadają białkowego kapsydu. Ich pleomorficzny (różnokształtny) wirion składa się z części nukleoproteinowej (genomu faga opłasnzonego białkiem) oraz otoczki lipidowej. Jedyne znany przedstawiciel tej rodziny – fag L2 atakuje pozbawione ściany komórkowej bakterie z rodzaju *Acholeplasma*. Zakłada się, że wprowadzenie genomu do komórki gospodarza odbywa się przez fuzję błony bakterii i otoczki wirusa [14, 18, 17, 21].

I.2.2.5.Rodzina *Inoviridae*

Bakteriofagi należące do rodziny *Inoviridae* mają materiał genetyczny w postaci jednoniciowej kolistej cząsteczki DNA o polarności dodatniej i wielkości 4,5 – 11 kz. Wirion tych fagów jest nitkowaty lub pałeczkowaty. Znajdujący się wewnątrz wirionu ssDNA opłasnzone jest przez białka otoczki. Receptorem dla tych wirusów są najczęściej białka pili płciowych [18, 22, 23]. W skład rodziny wchodzi 2 rodzaje (*Inovirus* i *Plectrovirus*), a najbardziej znanym przedstawicielem jest fag M13 *Escherichia coli* [14, 17].

I.2.2.6. Rodzina *Cystoviridae*

Bakteriofagi z rodziny *Cystoviridae* posiadają otoczony warstwą lipidową kapsyd złożony z części zewnętrznej i wewnętrznej, wewnątrz której znajduje się materiał genetyczny w postaci dwuniciowego RNA. Genom tych wirusów podzielony jest na trzy segmenty o wielkości odpowiednio 6.4–7.1 kz, M 3.6–4.7 kz i S 2.6–3.2 kz [18, 19, 21, 22]. W skład rodziny wchodzi tylko rodzaj *Cystovirus*, którego typowym przedstawicielem jest fag $\phi 6$ *Pseudomonas syringae* [14, 17].

I.2.2.7. Rodzina *Leviviridae*

Genom wirusów z rodziny *Leviviridae* składa się z pojedynczej cząsteczki jednoniciowego RNA o polarności dodatniej i wielkości zaledwie 3,4 – 4,3 kz. Nieopłaszony kapsyd ma symetrię ikozaedralną zaburzoną przez położoną asymetrycznie pojedynczą kopię białka A zwanego „białkiem dojrzewania”. Białko to pełni kluczową rolę zarówno podczas adsorpcji faga jak i lizy komórki gospodarza [21, 22, 18, 19]. W skład rodziny wchodzi 2 rodzaje, a najbardziej znanym jej przedstawicielem jest fag MS2 *Escherichia coli* [14, 17].

I.2.2.8. Rodzina *Microviridae*

Fagi należące do rodziny *Microviridae* mają materiał genetyczny w postaci jednoniciowej kolistej cząsteczki DNA o polarności dodatniej i wielkości 4,4 – 6.1 kz. Nieopłaszony kapsyd o symetrii ikozaedralnej jest zaopatrzony w wypustki [18, 19, 21]. W skład rodziny *Microviridae* wchodzi jedna podrodzina (*Gokushovirinae*) złożona z 3 rodzajów i jeden niezaklasyfikowany rodzaj (*Microvirus*). Najbardziej znanym jej przedstawicielem jest fag Φ X174 *Escherichia coli* [14, 17].

I.2.2.9. Fagi infekujące *Archaea*

Bakteriofagi z rodzin *Siphoviridae* i *Myoviridae* zakażają zarówno przedstawicieli królestw *Bacteria* jak i *Archea*. Istnieją jednak fagi infekujące jedynie archeony. Należą do nich wirusy zawierające materiał genetyczny w postaci dsDNA z rodzin *Fuselloviridae*, *Globuloviridae*, *Lipothrixviridae*, *Rudiviridae*, proponowanej, lecz niezaakceptowanej jeszcze przez ICTV rodziny *Bicaudaviridae* oraz niezaklasyfikowanych rodzajów *Salterprovirus* i *Ampullavirus* [14, 18, 24,].

I.2.3. Wirusy w ekosystemie jeziora eutroficznego

Wbrew panującej wcześniej opinii w latach dziewięćdziesiątych XX wieku dowiedziono, że wirusy występują powszechnie w ekosystemach wodnych. Liczba cząstek wirusowych obserwowanych w ekosystemach słodkowodnych jest zazwyczaj większa, niż w morskich i tym większa im wyższy jest stan troficzny zbiornika. W jeziorach eutroficznych często obserwuje się cząstki wirusopodobne w liczbie rzędu 10^8 ml^{-1} niekiedy nawet 2×10^9 ml^{-1} [25, 26, 27].

Głównymi grupami wirusów występującymi w jeziorach są Fikowirusy (wirusy infekujące glony) oraz bakteriofagi. Wydaje się więc, że jezioro eutroficzne może być doskonałym miejscem do poszukiwania bakteriofagów.

I.2.3.1. Gospodarze bakteriofagów: bakterie (w tym cyjanobakterie) w ekosystemie jeziora eutroficznego

Szacuje się, że w ekosystemie jeziora eutroficznego węgiel zawarty w mikroorganizmach może stanowić nawet 90-100% całkowitego cząsteczkowego węgla organicznego [28]. Choć, poza prokariontami w skład tej grupy wchodzi, także inne organizmy (np. grzyby, zielenice czy wiciowce) to same bakterie heterotroficzne stanowią 3-20% tej masy, a cyjanobakterie uważa się za głównych producentów w zbiornikach eutroficznych [27, 29,]. Jasne jest więc, że organizmy te są istotną częścią ekosystemu, a wszystko, co wpływa na ich kondycje (np. zakażenia fagowe) będzie oddziaływać na jego kształt.

I.2.4. Ekologia wirusów bakteryjnych

Szacunkowe dane wskazują, iż bakteriofagi mogą być najliczniejszymi formami życia na Ziemi (choć nie organizmami żywymi *sensu stricto*). Ilość cząstek fagowych na naszej planecie może dochodzić do 10^{31} natomiast liczebność organizmów prokariotycznych będących ich gospodarzami szacuje się na około 10^{30} [30, 31, 32].

Łatwo wyobrazić sobie z jak ogromną i ważną częścią naszego środowiska mamy do czynienia. Wraz z poszerzaniem się wiedzy o różnorodności, biologii molekularnej, genetyce i taksonomii bakteriofagów poznawano kolejne aspekty ich ekologii.

I.2.4.1. Ekologia ewolucyjna wirusów bakteryjnych i gospodarzy

Ewolucyjne podejście do ekologii fagów podejmuje problemy koewolucji bakteriofagów i ich gospodarzy, a także zależności między różnymi parametrami cyklu replikacyjnego i biologii fagów. Ważnym zagadnieniem są tu tak zwane kompromisy adaptacyjne (ang. *trade-offs*). W danych warunkach dwa parametry cyklu replikacyjnego mogą być ze sobą negatywnie sprzężone. Typowym przykładem takiej sytuacji jest negatywna zależność między produktywnością faga (mierzona wielkością wyrzutu, czyli średnią ilością wirionów potomnych pochodzących z infekcji jednej komórki gospodarza, ang. *burst size*), a jego zdolnością konkurencyjną (zdolność faga do efektywnego konkurowania z innym wirusem infekującym tego samego gospodarza). Przy nieograniczonej migracji bakteriofagi szybko przechodzące cykl replikacyjny i infekujące kolejnego gospodarza wypierają wirusy, których cykl replikacyjny trwa dłużej, lecz jest bardziej produktywny. W warunkach naturalnych możliwość migracji może być czynnikiem regulującym ewolucyjną równowagę między tymi cechami [6, 33]. Podobny kompromis występuje między specjalizacją względem jednego gospodarza i zdolnością do zakażenia szerokiego spektrum bakterii. Kompromisy kształtują, także adaptacje wirusów do abiotycznych warunków środowiska. Badania nad mutantami faga tolerującymi wyższą temperaturę wskazują, że są one mniej żywotne w temperaturach niskich niż szczep dziki [34].

W ekologii ewolucyjnej fagów duże znaczenie mają, także kompromisy adaptacyjne między cechami ich gospodarzy. Szczególnie istotna jest negatywna zależność między odpornością danej populacji bakterii na infekcje różnymi rodzajami fagów, a jej zdolnością do szybkiego wzrostu i efektywnej produkcji biomasy. Presja selekcyjna

wywierana przez wirusa faworyzuje bakterie niepermisywne względem fagów obecnych w środowisku. Badania *in vitro* prowadzone w chemostatach wskazują jednak, że w takiej sytuacji bakterie podatne na zakażenie nie są eliminowane. Koegzystencja taka jest możliwa, gdyż odporność zwykle wiąże się z częściową utratą zdolności efektywnego konkutowania o dostępne zasoby i/lub spowolnionym tempem wzrostu populacji. Mechanizm ten pozwala utrzymać się w jednej niszy więcej niż jednemu organizmowi i przyczynia się do utrzymania bioróżnorodności zbiorowisk bakteryjnych. Na ustalenie się równowagi między organizmem opornym i wrażliwym w badanym układzie ma wpływ dostępność składników odżywczych. Kiedy badany układ zostaje wzbogacony o substancje odżywcze zmienia się równowaga i faworyzowane są bakterie odporne, gdyż zmniejsza się znaczenie konkurencji o zasoby [6, 35].

Ważną rolę w zachowaniu różnorodności zbiorowisk bakteryjnych pełni mechanizm zwany „zabijaniem zwycięzcy” (ang. *killing the winner*). Kiedy grupa bakterii osiąga w danym środowisku sukces reprodukcyjny zagęszczenie jej populacji zwiększa się i wzrasta jej podatność na zakażenie. Gdy krytyczne zagęszczenie zostanie przekroczone dochodzi do szybkiej redukcji liczebności bakterii na skutek epidemii faga. Mechanizm ten nie pozwala jednej bakterii całkowicie zdominować ekosystem i stwarza niszę dla jej konkurentów [36].

I.2.4.2. Rola bakteriofagów w procesach horyzontalnego transferu genów

Rola wirusów bakteryjnych w ewolucji bakterii nie ogranicza się tylko do wywierania presji selekcyjnej. Bakteriofagi stanowią także istotne ogniwo w procesach horyzontalnego transferu genów. Przenoszenie genów między komórkami za pośrednictwem wirusów bakteryjnych określane jest mianem transdukcji fagowej. Opisuje się trzy mechanizmy transferu genów z udziałem bakteriofagów.

Pierwszym z nich jest tak zwana transdukcja ogólna lub uogólniona (ang. *generalized transduction*). Podczas tego procesu do kapsydu faga zamiast jego genomu pakowany jest fragment bakteryjnego materiału tworząc nieinfekcyjny wirion defektywny. Dochodzi do tego zarówno podczas infekcji bakteriofagami bezwzględnie litycznymi jak i łagodnymi, jednak tylko wtedy, gdy tworzone są wiriony potomne. Wielkość pakowanego fragmentu DNA nie może odbiegać zbyt od wielkości genomu wirusa. Upakowany DNA zostaje następnie przeniesiony do komórki nowego gospodarza, gdzie może ulec rekombinacji z genomem bakterii lub, jeśli jest to epizom zdolny do replikacji w nowej komórce, utrzymywać się w niej podobnie jak u „dawcy” [5, 6].

Kolejną odmianą transdukcji fagowej jest tak zwana transdukcja ograniczona lub wyspecjalizowana (ang. *specialized transduction*). Występuje ona jedynie podczas infekcji fagami łagodnymi, integrującymi do genomu gospodarza. Podczas indukcji profaga (patrz rozdział I.2.1.3) dochodzi do wycinania jego materiału genetycznego z genomu gospodarza. Wycinanie to może być niedokładne, co prowadzi do powstania cząsteczek fagowego DNA, które poza sekwencjami wirusowymi zawierają sekwencje bakteryjne. Tak powstałe odcinki DNA są następnie pakowane do wirionów i w tej formie mogą dostać się do komórki nowego gospodarza. W opisany sposób przeniesione mogą być jedynie geny bakteryjne znajdujące się w pobliżu miejsc integracji profaga [5, 6].

Trzecim, najrzadziej opisywanym mechanizmem transdukcji, jest transdukcja zachodząca na skutek rekombinacji między genomem faga i gospodarza. Ten mechanizm (w przeciwieństwie do transdukcji ograniczonej) pozwala na transfer genów odległych od ewentualnego miejsca integracji gdyż nie wymaga integracji faga do genomu. Teoretycznie jest też możliwe, aby transdukcja nastąpiła nawet po fragmentacji genomu faga przez bakteryjny system restrykcji-modyfikacji (fragmenty DNA generowane w ten sposób są często dość długie by zawierać całe geny), a więc u gospodarzy uznawanych za niepermissywnych względem faga, choć jest to przypadek skrajny i mało prawdopodobny [5, 6].

Z przenoszeniem genów przez fagi związane jest zjawisko konwersji lizogennej, czyli zmiana fenotypu gospodarza pod wpływem ekspresji genów zintegrowanego profaga.

Na skutek konwersji bakterie mogą nabywać nowych cech. Znanym przykładem konwersji lizogennej było powstanie enterokrwotocznych szczepów *Escherichia coli* (ang. EHEC - *enterohemorrhagic Escherichia coli*). Czynnikiem decydującym o ich wirulencji jest zdolność do wytwarzania toksyn podobnych do toksyny Shiga. Jest ona związana z ekspresją genów znajdujących się w zintegrowanym profagu (istnieje cała grupa bakteriofagów niosących geny kodujące białka podobne do toksyny Shiga). Również inne toksyny bakteryjne, a także czynniki wspomagające adhezję bakterii do komórek nabłonkowych, ułatwiające penetrację bakterii w głąb tkanek czy chroniące przed działaniem układu odpornościowego mogą być kodowane w genomach fagowych [37].

Nie wszystkie cechy uwarunkowane przez obecność profaga mają związek z patogennością (choć w związku z dużym znaczeniem dla człowieka te właśnie są najlepiej poznane). W genomach fagów często znajdują się tak zwane „moduły uzależnienia” (ang. *addiction modules*) czyli układy toksyna-antytoksyna. Kodują one toksyny białkowe lub bakteriocyny, które mogą w niektórych przypadkach dawać przewagę w środowisku bakteriom zakażonym, lecz przetrwanie gospodarza staje się uzależnione od obecności bakteriofaga z funkcjonalnym genem kodującym białko chroniące przed działaniem tej substancji [38, 39, 40].. Znanie są również bakteriofagi kodujące własne systemy obrony przeciwfagowej, które są oparte na działaniu tak zwanych białek przeciwdziałających nadinfekcji (ang. *SiE* - *Superinfection exclusion*) [41]. Inne bakteriofagi zawierają w swoich genomach sekwencje kodujące systemy restrykcji-modyfikacji [42].

Wiele z opisywanych powyżej sekwencji zalicza się do grupy genów zwanych elementami dodatkowymi (ang. „*morons*” od *more*-więcej), niezaangażowanych bezpośrednio w replikację faga. Jednym z kryteriów przynależności do grupy elementów dodatkowych jest umiejscowienie sekwencji. Znajdują się one między genami, które u spokrewnionych fagów nie są rozdzielone żadną ramką odczytu. Sekwencje te są więc swego rodzaju „wstawkami” powstałymi prawdopodobnie na skutek rekombinacji między genomami fagów i ich gospodarzy [43, 44].

I.2.4.3. Bakteriofagi jako jedna z najistotniejszych przyczyn śmiertelności w populacjach bakterii

Najważniejsze przyczyny śmiertelności bakterii to żerowanie przez zooplankton i liza na skutek infekcji fagiem. Udział tych przyczyn wydaje się być różny w zależności od środowiskach. Większość danych na ten temat pochodzi z ekosystemów wodnych. Okazuje się, że nawet w obrębie jednego zbiornika udział fagów w śmiertelności bakterii, w tym samym czasie, w różnych częściach słupa wody może wahać się pomiędzy 25 a 92% [45, 25]. Rozpiętość tych wartości okaże się znacznie większa jeśli rozważymy informacje pochodzące z innych ekosystemów mierzone w różnych okresach. Najważniejszymi czynnikami określającymi równowagę między różnymi przyczynami śmiertelności bakterii są: intensywność żerowania heterotroficznych pierwotniaków oraz stan troficzny zbiornika [, eopv]. W ekosystemach eutroficznych gęstość populacji gospodarzy jest większa, wzrasta ryzyko zakażenia, a w konsekwencji udział bakteriofagów w kontroli liczebności bakterii. Może on dochodzić niemal do 100%. W niektórych przypadkach oddziaływanie fagów może być tak silne, że znacząco przekracza zdolność do namnażania się bakterii prowadząc do czasowego obniżenia się gęstości ich populacji [25, 27]. Warto zauważyć, że bakteriofagi lizują swych gospodarzy selektywnie i niszczone populacje mogą być szybko zastępowane przez inne. Presja bakteriofagów ma więc wpływ nie tylko na liczebność, ale i na skład gatunkowy i różnorodność zbiorowisk bakteryjnych.

I.2.4.4. Bakteriofagi jako część pętli mikrobiologicznej i ważne ogniwo w obiegu materii w ekosystemach wodnych.

Zgodnie z teorią pętli mikrobiologicznej w ekosystemach wodnych większość rozpuszczonego węgla organicznego (ang. *DOC - dissolved organic carbon*), a także związanych z nim innych pierwiastków (głównie azotu i fosforu), włączana jest do sieci troficznej za pośrednictwem bakterii (tylko one są zdolne do efektywnego wykorzystywania składników odżywczych z tej puli). Bakterie są pokarmem dla heterotroficznych pierwotniaków, które z kolei stanowią pożywienie dla drobnych bezkręgowców. W ten sposób materia organiczna wprowadzana jest na wyższe piętra łańcucha pokarmowego. Liza fagowa uwalnia zawartą w bakteriach materię organiczną z powrotem do puli rozpuszczonej. Tworzy się pętla wsteczna w stosunku do mikrobiologicznej, zwana pętlą wirusową. Liza mikroorganizmów autotroficznych również wzbogaca pulę rozpuszczonej materii organicznej. Obydwa te procesy spowalniają transfer

biomasy na wyższe piętra sieci pokarmowej (heterotroficznych pierwotniaków oraz bezkręgowców) i zwiększają dostępność składników odżywczych dla bakterioplanktonu i fitoplanktonu. Na intensywność procesów uwalniania materii organicznej i nieorganicznych składników odżywczych przez pętlę wirusową wpływ mają czynniki, które kontrolują intensywność lizy fagowej w ekosystemie (patrz rozdział 0) [6, 27, 25].

Postuluje się, że w ekosystemach morskich obecność bakteriofagów ma wpływ na działanie tak zwanej pompy biologicznej. Jest to ogół procesów transportujących węgiel ze strefy eutroficznej w tym formowanie się tak zwanego morskiego śniegu (ang. *marine snow*) czyli drobin materii organicznej. Drobiny te zawierają szczątki organiczne oraz bakterie i wirusy. Choć rola bakteriofagów w tym procesie nie jest całkowicie jasna istnieją prace wskazujące, że liza fagowa może mieć wpływ zarówno na proces formowania się drobin jak i ich późniejszy rozkład [6, 46].

I.3. Zastosowanie bakteriofagów w gospodarce człowieka

Fagi są prawdopodobnie najbardziej rozpowszechnionymi formami życia (w szerokim znaczeniu tego wyrażenia) na naszej planecie trudno więc przecenić ich wpływ na gospodarkę człowieka. Już kilka lat po ich odkryciu w drugiej dekadzie XX wieku, ludzie zaczęli wykorzystywać bakteriofagi do swoich celów.

Ustalenie czy nowo odkryty bakteriofag Φ AGATE znajdzie swoje zastosowanie w gospodarce człowieka było jednym z celów niniejszej rozprawy, przybliżę więc podstawowe kierunki rozwoju technologii opartych na wykorzystaniu bakteriofagów w medycynie, przemyśle biotechnologicznym, inżynierii genetycznej i biologii molekularnej.

I.3.1. Fagoterapia

Zdolności bakteriofagów do swoistej lizy komórek bakterii sprawiła, że szybko znalazły one zastosowania w leczeniu zakażeń bakteryjnych.

Odkrycie antybiotyków w 1928 roku sprawiło jednak, że badania nad wykorzystaniem bakteriofagów, prowadzone w krajach zachodu, zostały niemal całkowicie porzucone. Prace te były kontynuowane w państwach bloku wschodniego, szczególnie w Gruzjińskiej Socjalistycznej Republice Radzieckiej (w Instytucie im. Georga Eliawy w Tbilisi) i Polsce (w Ośrodku Terapii Bakteriofagowej przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu) [47].

Ważnym impulsem do wznowienia i intensyfikacji badań nad wykorzystaniem bakteriofagów w medycynie był wzrost liczby gatunków bakterii opornych na antybiotyki. Dane literaturowe wskazują na skuteczność i bezpieczeństwo terapii opartych na zastosowaniu bakteriofagów litycznych. Sukcesem zakończyły się próby przedkliniczne prowadzone na zwierzętach [48, 49, 50, 51] i na ludziach [52, 53, 54, 55].

W chwili obecnej przynajmniej dwa preparaty fagowe (zawierające fagi zakażające *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*) przechodzą testy kliniczne [52, 53].

Warto zaznaczyć, że fagoterapia posiada liczne zalety czyniące z niej obiecujące rozwiązanie problemu oporności bakterii na antybiotyki mianowicie [56, 57]:

- Bezwzględnie lityczne bakteriofagi niszczą bakterie podczas gdy antybiotyki często działają tylko bakteriostatycznie,
- Produkcja preparatów fagowych jest relatywnie prosta i tania,
- Fagi replikują się w miejscu zakażenia, co sprawia, że nie trzeba ich stosować w dużych ilościach, ani podawać kolejnych dawek,
- Bakteriofagi zwykle wykazują wąską swoistość względem swoich gospodarzy, niekiedy infekują tylko jeden gatunek, a nawet szczep. Dzięki temu nie wpływają na stan komensalnej i symbiotycznej mikroflory. Obniża to ryzyko wtórnej kolonizacji przez bakterie chorobotwórcze,
- Ludzie cały czas stykają się z bakteriofagami. Występują one w wodzie, oraz powietrzu i na pożywieniu nie obserwowano jednak negatywnych reakcji na cząstki fagowe,
- Bakteriofagi (za wyjątkiem fagów, których wiriony mają w komponent lipidowy) złożone są jedynie z białek i kwasów nukleinowych. Ogranicza to znacząco ilość potencjalnych mechanizmów ich toksyczności,
- Jeśli pojawi się bakteria oporna na jednego bakteriofaga odnalezienie kolejnego jest o wiele łatwiejsze niż odkrycie lub synteza nowego antybiotyku. Co więcej w związku z naturalnym ewolucyjnym "wyścigiem zbrojeń" uodpornienie się bakterii na infekcję wirusem sprzyja powstawaniu nowych, zmutowanych szczepów faga zdolnych do infekowania bakterii opornych na szczep dziki,
- Swoistość bakteriofagów ogranicza możliwość powstawania oporności gdyż nie wywierają one presji selekcyjnej na bakterie niebędące ich gospodarzami,
- Niektóre bakteriofagi mogą skutecznie lizować bakterie żyjące w obrębie biofilmu, a nawet rozkładać jego macierz egzopolimerową. Komórki bakteryjne wchodzące w skład biofilmu są zwykle bardzo odporne na antybiotykoterapię,
- Odpady powstałe w trakcie produkcji i leczenia preparatami fagowymi są w większości biodegradowalne, a ich ekotoksyczność ograniczona jest do wpływu na grupę potencjalnych gospodarzy faga.

Niestety, z leczeniem fagami związane są również pewne trudności [56, 57]:

- Cząstki fagowe są większe do większości leków. Może to uniemożliwić ich stosowanie w niektórych schorzeniach gdyż nie będą one mogły przeniknąć do zakażonych tkanek,
- Białka bakteriofagów mogą wywoływać odpowiedź ludzkiego układu odpornościowego. Zawierają potencjalne epitopy dla przeciwciał,
- Fagi są wychwytywane przez system siateczkowo-śródbłonkowy. Sprawia to, że ich czas półtrwania w organizmach zwierzęcych jest krótki. Czas ten można przedłużyć pasażując fagi w zakażonych zwierzętach i izolując mutanty słabiej wychwytywane [58],
- Swoistość bakteriofagów uniemożliwia zastosowania jednego faga do leczenia tak szerokiego spektrum zakażeń jakie można leczyć antybiotykami. W wielu przypadkach konieczna może być dokładna identyfikacja czynnika etiologicznego i dobranie do niego odpowiedniego zestawu fagów (koktajlu fagowego),
- Zastosowanie bakteriofagów jako czynników terapeutycznych niesie ze sobą ryzyko wystąpienia transdukcji i konwersji fagowej (mechanizmy te opisane są w rozdziale I.2.4.2),
- Nie wszystkie bakteriofagi nadają się do zastosowania w terapii. W szczególności nie nadają się do tego celu fagi zdolne do wejścia w cykl lizogenny. W związku z tym, że replikacja genomu takiego wirusa nie zabija gospodarza. Jego obecność często chroni go przed infekcją innymi fagami.
- Podczas wywołanej przez fagi lizy komórek bakteryjnych uwalniane są endotoksyny (głównie lipopolisacharyd i składniki ściany komórkowej bakterii) co może wywołać u pacjentów gorączkę, a w najgorszym wypadku doprowadzić do szoku toksycznego przypominającego występującą podczas antybiotykoterapii reakcję Jarischa-Herxheimera,
- Choć otrzymanie preparatów fagowych jest proste, usunięcie pozostałości komórek bakteryjnych (w tym endotoksyn) nastręcza znacznie więcej problemów i podwyższa koszt ich produkcji,
- Preparaty bakteriofagowe łatwo mogą tracić aktywność przy niewłaściwym lub zbyt długim przechowywaniu.

Wraz z rozwojem biologii syntetycznej oraz coraz szerszą wiedzą na temat genomiki fagów pojawiają się również nowe możliwości związane z zastosowaniem bakteriofagów modyfikowanych.

I.3.2. Enzymy fagowe jako nowa grupa czynników przeciwbakteryjnych

Wiele z problemów związanych z terapią fagowej można ominąć stosując nie całe cząstki wirusowe, lecz pojedyncze białka fagowe o aktywności przeciwbakteryjnej. Idea ta pojawiła się w roku 2001 kiedy wykazano taką aktywność lizyn fagowych [59]. Enzymy zalicza się do nowej klasy czynników przeciwbakteryjnych zwanych enzybiotykami. Lizyny nie są jednorodną grupą białek. Zalicza się do nich pięć klas enzymów biorących udział w rozkładzie składników bakteryjnej ściany komórkowej [60]:

- amidazy N-acetylmuramylowe (lizozymy),
- amidazy N-acetylmuramyl-L-alaninowe,
- endo- β -N-acetylglukozaminidazy,
- transglikozylazy lityczne,
- endopeptydazy lityczne.

Wspólną cechą tych enzymów jest ich funkcja biologiczna. Biorą one udział w uwalnianiu wirionów potomnych z komórki gospodarza. Testy na zwierzętach potwierdziły skuteczność lizyn w leczeniu i profilaktyce zakażeń bakteryjnych *in vivo* [60, 61, 62]. Stosowanie w terapii enzymów litycznych zamiast całych fagów ma szereg zalet:

- Endolizyny nie replikują się, co sprawia, że ich farmakokinetyka jest bardziej przewidywalna i łatwiejsza do kontrolowania,
- Lizyny należą do leków białkowych, których oddziaływanie na organizm jest poznane lepiej niż wpływ preparatów fagowych,
- Wykorzystanie lizyn nie niesie ze sobą zagrożeń związanych z horyzontalnym transferem genów,
- Lizyny wykazują swoistość podobną do bakteriofagów, z których pochodzą, niekiedy jest ona jednak nieco szersza. Ułatwia to ich zastosowanie bez dokładnej identyfikacji czynnika etiologicznego,

- Można ich używać również profilaktycznie,
- Stosunkowo nieduża w porównaniu do wirionu faga cząsteczka białka zawiera mniej epitopów, co zmniejsza ryzyko odpowiedzi immunologicznej na lek,
- Mniejszym cząsteczkom łatwiej spenetrować zakażoną tkankę,
- Enzymy te można pozyskiwać zarówno z fagów bezwzględnie litycznych jak i łagodnych, które nie nadają się do zastosowania w "zwykłej" fagoterapii,

Niestety lizyny nadają się głównie do terapii zakażeń bakteriami gram-dodatnimi. Aby enzymy te mogły działać muszą znaleźć się w bezpośrednim sąsiedztwie ściany komórkowej. Lizyna podawana z zewnątrz napotyka u bakterii gram ujemnych na barierę w postaci błony zewnętrznej. W warunkach naturalnych fagowe enzymy lityczne syntezowane są w cytoplazmie. Większość z nich nie ma sygnałów sekrecyjnych i wymaga do swojego działania białek zwanych holinami tworzących pory w błonie pozwalające na przedostanie się lizyn do przestrzeni periplazmatycznej. Przykłady lizyn o potwierdzonej aktywności przeciwbakteryjnej przedstawiono w tabeli 2.

Poza lizynami, także depolimerazy egzopolimerów macierzy stwarzają nadzieje na zastosowanie w medycynie. Są to enzymy rozkładające abiotyczne składniki biofilmów bakteryjnych. Zdolność do formowania biofilmów jest istotnym czynnikiem zjadliwości wielu bakterii, a komórki żyjące w obrębie biofilmu są bardziej odporne na antybiotyki. Jak wspomniałem w poprzednim rozdziale, niektóre fagi wykształciły w toku ewolucji przystosowania do penetrowania biofilmów. Jedną z tych adaptacji jest właśnie ekspresja depolimerazy egzopolimerów macierzy. Wykazano, że fagi kodujące te enzymy mogą zmniejszać lepkość biofilmów tworzonych przez *Pseudomonas aeruginosa* i niszczyć biofilmy *Enterobacter agglomerans*. Do rozbijania biofilmu nie jest konieczny sam bakteriofag, a jedynie jego depolimeraza [63, 64]. Otrzymano, także zmodyfikowanego faga T7 ekspresującego dyspersynę B - enzym z *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, rozkładający jeden z egzopolimerów wchodzących w skład biofilmów tworzonych przez *Escherichia coli*. Wprowadzenie do genomu faga genu kodującego aktywny enzym pozwoliło na skuteczne rozbicie biofilmu i lizę znajdujących się w nim komórek [65].

Białko	Bakteriofag	Aktywność przeciwbakteryjna względem:	Testy na zwierzętach/in vitro
PlyG	γ <i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	na zwierzętach [66]
PlyPH	Autolizyna szczepu Ames <i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	in vitro [67]
PlyV12 amidaza	$\Phi 1$ <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. Fecium</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	in vitro [68]
lizyna $\Phi 13$	$\Phi 13$ <i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	in vitro [69]
lizyna $\Phi 6$	$\Phi 6$ <i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	in vitro [69]
LysGH15	GH15 <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	na zwierzętach [61]
ClyS	fagi Twort i phiNM3 <i>Staphylococcus aureus</i> (lizyna chimeryczna)	<i>Staphylococcus aureus</i>	na zwierzętach [70]
LysK	K <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	in vitro [62]
hydrolaza mureinowa związana z wirionem (p17)	p68 <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	in vitro [71]
PlyCA oraz PlyCB (dwie podjednostki)	C1 <i>Streptococcus</i>	<i>Streptococci grupy A</i>	na zwierzętach [72, 73]
PlyGBS	NCTC11261 <i>Streptococcus</i>	<i>Streptococci grupy B</i>	na zwierzętach [74]
Pal amidaza	Dp-1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	na zwierzętach [59]
Cp-1 lizozym	Cp-1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus oralis</i> i <i>mitis</i>	na zwierzętach [75]

Tabela 2. Lizyny bakteriofagowe o potwierdzonym działaniu przeciwbakteryjnym.

I.3.3. Enzymy fagowe jako narzędzia współczesnej biologii i biotechnologii

Nie sposób wyobrazić sobie współczesnej biotechnologii, inżynierii genetycznej i biologii molekularnej bez enzymów pochodzenia bakteriofagowego. Szczególnie cenne okazały się enzymy zaangażowane w metabolizm kwasów nukleinowych. Przykłady takich białek wraz z ich zastosowaniem umieszczono w tabeli 3.

Bakteriofag	Nazwa enzymu	zastosowanie	uwagi
P1 <i>Escherichia coli</i>	Rekombinaza Cre	wycinanie lub inwersja fragmentów zlokalizowanych pomiędzy dwoma motywami loxP, łączenie cząstek DNA zawierających fragmenty loxP (patrz rozdział 6575)	polipeptyd o masie 38 kDa
T3 <i>Escherichia coli</i>	DNA-zależna Polimeraza RNA	transkrypcja <i>in vitro</i> , synteza znakowanego RNA	polipeptyd o masie 99 kDa
T4 <i>Escherichia coli</i>	DNA-zależna Polimeraza DNA	usuwanie wystających 3' i 5' końców cząsteczki DNA, synteza znakowanego DNA, mutageneza ukiewunkowana, nie wymagająca ligazy klonowanie produktów PCR	polipeptyd o masie 104 kDa
	Kinaza polinukleotydowa	znakowanie kwasów nukleinowych radioaktywnym fosforanem γ na końcu 5'	homotetramer, każdy z monomerów o masie 28.9 kDa
	Ligaza DNA	łączenie fragmentów DNA, usuwanie nacięć (ang. nicks) na DNA, łańcuchowa reakcja ligazy	polipeptyd o masie 55.3 kDa
	Ligaza RNA druga	usuwanie nacięć (ang. nicks) na jednej z nici dwuniciowego RNA	polipeptyd o masie 41 kDa
	Ligaza RNA pierwsza	znakowanie RNA 3', 5' [α - 32 P] bisfosforanem cytydyny, łączenie końców cząsteczek RNA ze sobą oraz innymi cząsteczkami RNA i DNA, synteza jednoniciowych oligo-rybonukleotydów,	polipeptyd o masie 43.6 kDa
	β -glucozyltransferaza	glikozylacja, wykrywanie i radioaktywne znakowanie 5-hydroksy-metylocytozyny w DNA	polipeptyd o przewidywanej masie 40,7 kDa
T7 <i>Escherichia coli</i>	DNA-zależna Polimeraza DNA	mutageneza ukiewunkowana	enzym złożony z dwóch podjednostek: tioredoksyny z <i>E. coli</i> (12 kDa) oraz DNA-zależnej Polimerazy DNA faga T7 (80 kDa)
	DNA-zależna Polimeraza RNA	transkrypcja <i>in vitro</i> , synteza znakowanego RNA	polipeptyd o masie 99 kDa
	Sekwenaza	sekwencjonowanie DNA, synteza drugiej nici cDNA przeznaczonego do zastosowania w technikach mikroacierzowych, znakowanie kwasów nukleinowych analogami nukleotydów	sztucznie otrzymany enzym, T7 Polimeraza DNA z domeną odpowiedzialną za aktywność 3'→5' zainaktywowaną za pomocą technik inżynierii genetycznej (76 kDa)
λ <i>Escherichia coli</i>	Egzonukleaza	generowanie jednoniciowych fragmentów DNA z cząsteczek dwuniciowych	polipeptyd o masie 26 kDa
	Fosfataza białkowa	nieswoista defosforylacja białek	polipeptyd o przewidywanej masie 25 kDa
Φ 29 <i>Bacillus subtilis</i>	DNA-zależna Polimeraza DNA	amplifikacja całego genomu, amplifikacja z wielokrotnym przemieszczeniem łańcucha (ang. MDA - Multiple displacement amplification), amplifikacja metodą toczącego się koła (ang. RCA - Rolling circle amplification), klonowanie fragmentów DNA poza komórkami	polipeptyd o masie 66.7 kDa
Φ 6 <i>Pseudomonas syringae</i>	RNA-zależna polimeraza RNA	synteza dwuniciowego RNA <i>in vitro</i>	polipeptyd o przewidywanej masie 75 kDa
SP6 <i>Salmonella typhimurium</i>	DNA-zależna Polimeraza RNA	transkrypcja <i>in vitro</i> , synteza znakowanego RNA	polipeptyd o masie 99 kDa

Tabela 3. Zastosowanie enzymów bakteriofagowych w biologii i biotechnologii na podstawie [76,

I.3.4. Fagowe sekwencje DNA w inżynierii genetycznej

Wraz z rozwojem genomiki bakteriofagów, kolejne pochodzące z nich sekwencje znajdowały swoje zastosowanie w inżynierii genetycznej. Silne promotory, efektywne terminatory transkrypcji czy miejsca inicjacji replikacji (*ori*) pozwalające na utrzymanie zawierających je episomów w dużej liczbie kopii czynią genomy fagowe doskonałym punktem wyjścia do budowy wektorów. Szybko zauważono, że z genomu faga λ można usunąć fragment zlokalizowany w centrum, a w jego miejsce wprowadzić inny odcinek DNA. W ten sposób powstały pierwsze wektory λ . Sekwencje *cos* tego faga posłużyły też do konstrukcji kosmidów - pierwszych wektorów do klonowania dużych fragmentów DNA (do wielkości około 50kbp) [78]. Również elementy fagów nitkowatych z rodziny *Inoviridae* (M13, f1 *Escherichia coli*) wykorzystano do przygotowania wektorów hybrydowych zwanych fagemidami. Fagi te stosuje się także w technice prezentacji fagowej (ang. *Phage display*). Jest to metoda badania oddziaływań białek i ich ligandów (w tym innych białek), w której klonuje się pofragmentowany genomowy DNA, cDNA lub losowe odcinki DNA do wektorów fagowych lub fagemidowych. Miejsce klonowania znajduje się w obrębie jednego z wirusowych białek płaszcza, dzięki czemu sekwencje kodowane w bibliotece są ekspresjonowane jako peptydy fuzyjne na powierzchni faga. Otrzymaną bibliotekę zmodyfikowanych fagów przeszukuje się w procedurze nazywanej biopanningiem. Roztwór zawierający cząstki fagowe podaje się do dołków lub próbówek opłaszczonych ligandem. Po odpłukaniu nieswoiście związanych wirusów wymywa się pozostałe i namnaża się je w kulturach *Escherichia coli*. Taki proces zwykle powtarza się kilkakrotnie, aby wyselekcjonować bakteriofagi prezentujące na swojej powierzchni peptydy o wysokim powinowactwie do liganda [79]. Przykłady elementów genomów fagowych wykorzystywanych w inżynierii genetycznej zamieszczono w tabeli 4.

Bakteriofag	Elementy sekwencji wykorzystywane do konstrukcji wektorów	Zastosowanie
CTX <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	integraza i miejsca integracji	wektory integrujące do genomu gospodarza (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
Mu <i>Escherichia coli</i>	elementy sekwencji odpowiedzialne za transpozycję genomu w tym gen kodujący transpozazę	wektory do mutagenazy insercyjnej, wektory ekspresyjne integrujące do genomu gospodarza
P1 <i>Escherichia coli</i>	sekwencje <i>loxP</i> i gen kodujący rozpoznającą ją rekombinazę Cre	systemy do rekombinacji i wymiany kaset genowych
	zmodyfikowany genom faga	liniowe wektory do klonowania fragmentów DNA w <i>Escherichia coli</i>
λ <i>Escherichia coli</i>	gen kodujący białko CI (represor faga λ)	wektory do badania oddziaływań białko
	sekwencje <i>cos</i> odpowiedzialne za cyrkularyzację wektora i pakowanie do kapsydów faga	konstrukcja wektorów kosmidowych
	układ rekombinacji RED	systemy do rekombinacji <i>in vivo</i>
	układ rekombinacji attP/B	oparte na rekombinacji systemy klonowania genów o zdefiniowanej orientacji insertu (np Gateway® firmy Invitrogen)
	zmodyfikowany genom faga	konstrukcja wektorów fagowych, fagemidowych
Φ 105 <i>Bacillus subtilis</i>	zmodyfikowany genom faga	wektory do ekspresji białek heterologicznych w <i>Bacillus subtilis</i>
Φ X174 <i>Escherichia coli</i>	gen E kodujący białko lityczne faga	konstrukcja wektorów z selekcją rekombinantów na podstawie przeżywalności
	Miejsce inicjacji replikacji (ori)	konstrukcja wektorów zdolnych do replikacji w <i>Escherichia coli</i>
m13 <i>Escherichia coli</i>	Miejsce inicjacji replikacji (ori)	konstrukcja wektorów zdolnych do replikacji w <i>Escherichia coli</i> , mogących tworzyć formę jednonicową
SPO-1 <i>Bacillus subtilis</i>	Promotor	ekspresja białek heterologicznych w komórkach <i>Bacillus subtilis</i>
T3, T4, T7, λ <i>Escherichia coli</i> i SP6 <i>Salmonella typhimurium</i>	Promotory	ekspresja białek heterologicznych w <i>Escherichia coli</i> oraz transkrypcja <i>in vitro</i>
f1, fd, m13, T3, T4, T7, λ <i>Escherichia coli</i>	sygnały terminacji transkrypcji	terminacja transkrypcji podczas ekspresji białek heterologicznych w <i>Escherichia coli</i>
m13, fd i f1 <i>Escherichia coli</i>	zmodyfikowany genom	wektory do prezentacji fagowej

Tabela 4. Sekwencje pochodzenia fagowego wykorzystywane w inżynierii genetycznej na podstawie [80, 81 82, 83, 84, 85, 86, 87].

II. Cel pracy

Celem niniejszej pracy była charakterystyka faga Φ AGATE *Bacillus pumilus* wyizolowanego z wody zbiornika eutroficznego, jakim jest Jezioro Góreckie. W związku z odnalezieniem w jego genomie sekwencji o potencjale aplikacyjnym przystąpiłem też do oceny możliwości ich zastosowania.

III. Zadania badawcze

Aby osiągnąć powyższy cel postawiłem przed sobą następujące zadania badawcze:

- Izolację bakterii tlenowych fakultatywnie beztlenowych i aerotolerancyjnych z wody Jeziora Góreckiego,
- Pozyskanie bakteriofagów zakażających bakterie najczęściej obserwowane w jeziorze,
- Izolacja materiału genetycznego odkrytego bakteriofaga (fag Φ AGATE *Bacillus pumilus*),
- Analiza wielkości fragmentów powstałych w wyniku trawienia restrykcyjnego genomowego DNA faga,
- Uzyskanie sekwencji jego genomu,
- Pozyskanie wstępnych informacji o strukturze jego proteomu,
- Potwierdzenie aktywności hydrolazy kwasu poli- γ -glutaminowego (enzymu wybranego ze względu na potencjałe zastosowanie w gospodarce człowieka) w lizatach fagowych.

IV. Materiały i metody

IV.1. Podłoża mikrobiologiczne

IV.1.1. WPCA (ang. Water Plate Count Agar) na 1 l

6g	tryptonu
3g	ekstraktu drożdżowego
15g	agaru
pH 7.2 ± 0.2	

IV.1.2. LB (ang. lysogeny broth, Miller) na 1 l

5g	ekstraktu drożdżowego
10 g	tryptonu
10g	NaCl

IV.1.3. LB agar (Miller) na 1 l

5g	ekstraktu drożdżowego
10 g	tryptonu
10g	NaCl
15g	Agaru

IV.1.4. Pożywa LB z ampicyliną (płynna i stała)

Skład jak LB lub LB agar
z dodatkiem ampicyliny (50µg/ml) (dodano po sterylizacji).

IV.1.5. Pożywka SOB (ang. Super Optimal Broth, płynna lub stała)

Skład jak LB lub LB agar
z dodatkiem 0,2% maltozy i 10mM MgSO₄ (dodano po sterylizacji)

IV.2. Bufory i roztwory:

IV.2.1. Bufor lizujący (do przygotowywania matryc do reakcji PCR)

0,5%	IGEPAL CA – 630
10 mM	Tris – HCl, pH 8,5

IV.2.2. Bufor TAE 10x

0,5 M	Tris – HCl, pH 8,3
100 mM	octan sodu
50 mM	EDTA

IV.2.3. Bufor TE 10x

0,5 M	Tris – Cl, pH 8,3
50 mM	EDTA

IV.2.4. Roztwór PEG 8000

20%	roztworu PEG 8000
2,5 M	NaCl

IV.2.5. Obciążacz do elektroforezy w żelu agarozowym

0,25 %	błękit bromofenolowy
0,25 %	ksylencjanol
50 %	glicerol

IV.2.6. Bufor do rozpuszczania białek

0,1 M	Tris-Cl, pH 8,0
10%	glicerol

IV.2.7. Bufor do nakładania białek (SB – sample buffer)

1 x	Tris pH 6,8 (0,05 M)
20%	glicerol
4%	SDS
0,25%	błękit bromofenolowy

IV.2.8. Bufor elektrodowy (Laemmli)

0,125 M	Tris
0,96 M	glicyna
0,5%	SDS

IV.2.9. Barwnik do białek (wykorzystywany przy SDS PAGE)

0,25 %	Coomassie Brilliant Blue R-250
50 %	metanol
10 %	kwasy octowe

IV.2.10. Odbarwiacz

20 %	metanol
10 %	kwasy octowe

IV.2.11. Bufor do rehydratacji pasków do ogniskowania izoelektrycznego

7 M	mocznik
2 M	tiomocznik
2 % (1-4 %)	CHAPS
1%	DTT
1% (0,25-2 %)	Servalyt

IV.2.12. Bufor 1 do równoważenia pasków do ogniskowania izoelektrycznego (po pierwszym kierunku elektroforezy dwukierunkowej):

50 mM	Tris-HCl, pH 8.8
6M	mocznik
30% v/v	glicerol
2% w/v	SDS
0,01%	błękit bromofenolowy
1% w/v	ditiotreitol

IV.2.13. Bufor 2 do równoważenia pasków do ogniskowania izoelektrycznego (po pierwszym kierunku elektroforezy dwukierunkowej)

50 mM	Tris-HCl, pH 8.8
6M	mocznik
30% v/v	glicerol
2% w/v	SDS
0,01%	błękit bromofenolowy
5% w/v	jodoacetamid

IV.2.14. Barwnik "Coomassie silver blue" do barwienia żeli po elektroforezie dwukierunkowej

0,12 %	Coomassie Brilliant Blue G-250
8,5%	kwask ortofosforowy
10%	siarczan amonu
20%	metanol

IV.2.15. Roztwór błękitu metylenowego do barwienia γ PGA

0.23%	błękit metylenowy
23%	etanol
0.008%	KOH

IV.3. Żele

IV.3.1. Żele do PAGE:

Składniki	Żel rozdzielający 10% (10ml)	Żel zagęszczający (5ml)
40% akrylamid/bisakrylamid	2,5 ml	0,83 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	1,2 ml
20% SDS	5 μ l	-
H ₂ O	5,0 ml	2,97 ml
TEMED	9 μ l	5 μ l
10% APS	90 μ l	50 μ l
Razem	10 ml	5 ml

Tabela 5. Żel do elektroforezy białek w warunkach denaturujących

IV.3.2. Żel do drugiego kierunku (elektroforeza dwukierunkowa)

Składniki	Żel rozdzielający 10% (100 ml)	Żel zagęszczający (20 ml)
40% akrylamid/bisakrylamid	25 ml	3,32 ml
1,5 M Tris pH 8,8	25 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	4,8 ml
20% SDS	50 μ l	-
H ₂ O	50 ml	11,88 ml
TEMED	90 μ l	20 μ l
10% APS	900 μ l	200 μ l

Tabela 6. Żel do drugiego kierunku elektroforezy dwukierunkowej

IV.4. Szczepy:

Escherichia coli DH5α:

fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

Izolaty z kolekcji mikroorganizmów Instytutu Roślin i Przetworów Zielarskich

Bacillus subtilis, *B. licheniformis* i *B. cereus*, *Enterobacter arogenes*, *E. agglomerans* oraz *Citrobacter freundii*

IV.5. Wektory:

Wektor fagemiowy pBluescript II KS(-) (Fermentas X52329)

IV.5.1. Wzorce mas cząsteczkowych (markery wielkości)

- Nova 1kb DNA ladder (Novazym, MA1000-05)
- MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas, #SM0403)
- pUC Mix Marker 8, ready-to-use (Fermentas, #SM0303)
- Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, #SM0431)
- Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, #SM0441)

IV.6. Zestawy do identyfikacji bakterii na podstawie wyników testów biochemicznych:

- Microbact™ 24E (Oxoid, MB 1074 A)

IV.7. Zestawy do izolacji kwasów nukleinowych

- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, 28104)
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, 51304)
- Plasmid Mini AX (A&A Biotech., 010-50)

IV.8. Startery:

IV.8.1. Startery do amplifikacji i sekwencjonowania regionu 16S rDNA [88]

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')
S*-Univ-1492-b-A-21	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
S-D-Bact-0008-a-S-20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S1100R	AGGGTTGCGCTCGTTG
16S1100.F	CAACGAGCGCAACCCT
16S519RDeg	GWATTACCGCGGCKGCTG
16S357F	CTCCTACGGGAGGCAGCAG

Tabela 7. Startery do amplifikacji i sekwencjonowania regionu 16SrDNA

IV.8.2. Startery do sekwencjonowania fragmentów DNA klonowanych w wektorach pBluescript

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
M13F(-47)	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13R	TCACACAGGAAACAGCTATGAC

Tabela 8. Startery do sekwencjonowania fragmentów DNA klonowanych w wektorach pBluescript

IV.8.3. Startery do amplifikacji sekwencji w zakonserwowanych genomach *Caudovirales*

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')
MiTF	GGTTTTCTATYGARGGTGCART
MiTR	ACTTGHGYRTCWGGTGHTGT
MtF	AAATAWATGGAGGTTGTTTRTTGRRT
MtR	TCWATYTCACTAAARCCAAYCAGY

Tabela 9. Startery do amplifikacji sekwencji w zakonserwowanych genomach *Caudovirales*

IV.8.4. Startery i starery/adaptory stosowane w technice wydłużania miejsca restrykcyjnego (RSE)

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')
ApAatII	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGTC
ApHaeIIc	GTAATACGACTCACTATAGGGCGCGCC
ApHaeIIc	GTAATACGACTCACTATAGGGCGCGCT
ApKpnI	GTAATACGACTCACTATAGGGCGTACC
ApSalI	GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCTC
RSE_AP	GTAATACGACTCACTATAGGGC

Tabela 10. Startery i starery/adaptory stosowane w technice wydłużania miejsca restrykcyjnego

IV.8.5. Startery do wydłużania otrzymanych sekwencji fagowych

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')
ML174N	TCTCGTGTTTGGTGGAGACCTA
124F177N	TGATGGCAGTCTGACCAAAGTT
124F277	AGCCTTGAACAACGTGCAGATA
124FIII	AAGTTGTTAGCTTCACACTCTCG
124FIV	GGTCCGTCGTTNACAATCTC
124r170N	TCCTCAACCGCTTCTAACTTCTC
124r316	GAACGGCACTATACGGATCATTC
124RIII	TTCANTGATCTTTTTTCATCTTAACC
124RIV	TGCATGTTAACCGCTTCCTC
1fF22	TTTAAGACCATCGAACTTT
1fR22	TATTCTTTTTGCGAGGTAT
36f236N	CCAGCAGAAATCACGTAGTCTTT
36F281N	CCGTTCAACCCTGTAACATCAG
36F300	TTTGGAAGGGAAATCAAAAA
36F312	TCTTACGTTGGCAGGGTCATTA
3FIII	AGAAAAGTCTGCTATTTTCACTTTG
3FIV	GGTNGAAATCCGGACAGGT
3RIII	CACGCTTTNAGTCTAACCGATA
3RIV	CCTGCTTCGATAACANGTGC
5F192N	CACGGCGGGTTCATTAAGTATT
5F233	AGCGGTACAACAACGACACATT
5FIII	GAACATTTGAGGGGCAAAGT
5FIV	CCTTTTAAACCTGCCAGNCTA
5I124f	TCGATAGAGTTCCAGTTCCTG
5I124r	TCCTCAACCGCTTCTAACTTC
5I3f	GTGCTTCCCACACTTTGGTT

Tabela 11. Startery do wydłużania otrzymanych sekwencji fagowych

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')
5I3r	CGGCATACTCGAGCTGAATC
5r242N	CGTACAGATGAAGCAACACAAGC
5r297	GTTAGCTTGGAACCCATCTCCA
5RIII	TCAAAGAAGTCAAAGAAGTGAAAA
5RIV	CACTGGAGAAGAAGCAGCAG
6FIII	GCAGCTTTACACACACTGTTGA
6FIIIFIV	AATAACGGGTTTGAGGCANC
6FIIIRIV	GTAGCGCTAGAGGACGATGG
6fx399R	AAAATAAGGTGATCCGTAA
6fx49F	ACCAACTCAACTCCAAATA
6RIII	TGCGTCTCTTACTGCTCCTTC
6RIV	GGACTGCCNTTTTGCTCAC
8F195N	GGTCAGTGGTGGAACTTGCTTA
8F290	CTGTAACGCTCAAACCGCTAAA
8r199N	TGCGGTAAATGCCATTTAAGTCT
8r210	GTTATCTGCCCTGCGGTTAATG
F1A309A	TCTCCCTCTNCTAATATCCTTTTCAA
F3306A	CGGAACTCGCTGTCTATTGTG
F5359A	AGTTCGGAATGGGATGTGTG
F599	TTGAGGAGGTAAGCTACAT
F6359A	GCGNAACTAATGACTTTCAATCTTC
F6I321A	TTTAAGGNAAAGGATGATGAGACC
F7316A	AGGCTGATAAGGGGGCTGAT
F8333A	CCGCTGCCCTTAGAGTTGAG
K1F	TGGTCTAAATGGTGGCAA
K2F	CAGGAAAAGGAGGANGAGAGA
K2R	CACGTATGGGTACGTGAGTCT
K2R	CCCNTTTATTTTCGATCTCGT
K3F	AACACACCATCGTTAAACTCG
K3R	GGCGTACTTAAGTTAACTCCTTCA
K4F	CGCCGTTAGCTTGTGACTTAC
K4R	CGGTACAACGGAATTATCACAA
K5F	TGCTTAAGGTCGATGACTCCT
K5R	AACCGAGAAGCGATTAGACAA
K6F	GGTTTGGTAGTGGTTTTGTGTTT
K6R	TCCTCCGTTGTAGTATCGGAAT
Mitf237N	TGTGAAAAGTCGAAAGACGAA
Mitf260	GAAGAATCCGAAGAGGCTGAAA
MiTF2F	GGACTTTGAGACTATGTGGAAAGA

Tabela 11. Startery do wydłużania otrzymanych sekwencji fagowych cd.

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')
MiTF2R	TCTTTCCACATAGTCTCAAAGTCC
MitfF184	GTCATCCACGTAGCAGTTTTCG
MitfF210	TCTTGAGCATGGTTCCACATTT
ML243	AGACCGCTTCAGAGACCAGATT
MLF169N	TCCGGCTGTCAACTTCTTCTAA
MLF235	AGCTAAAGTCGGGCATATCAGC
MTF2F	TCCTCCCTCTCCGGTAAGTT
MTF2R	AACTTACCGGAGAGGGAGGA
Pi14F2	GCCACNTCTTCATTTCTTA
Pi14R2	GCTTTANGGATGGCTATGA
Pi2F2	AAACCAGTTCTCANAAAAAGC
Pi2R2	CATTACTTACTGCGGANTCG
Pi2R2	TCCAGTAGTTTCCCATTTTG
Pi3F2	TGCTCTAATGAGTACAAGTTGC
Pi3R2	TTTCGATATCTTTTATGGCTTC
Pi5F2	CTTGTGACTGGATCATCAGC
Pi5R2	TAAAAGTAGCATTGGCAACC
Pi6F2	CGGTTACTGCGAAGATTNAC
R1278A	TTCTCTTGTCATATGTAACCNNTCCT
R128	CTGTCTTTGATTCTGCCTC
R3358A	GGCTATGCCGCAGACACATA
R5305A	CGAATTTGTAAGAACTCGTGCAT
R6365A	TGGTCCATTTAAAACGACTAGCA
R6I246A	TTNTTTGGAAGGGAAATCAAAAA
R7337A	CGCCAATATGCATAGGGAAA
R8338A	TGGATAGTCCTTTAGGGTCAACTATG
T3F	GAAGTTGTGGTTGAGAACTA
T3R	AAGATATAAGTACCTTCGGGGAAGT
T7F	AATCAAGATTGNTATACCCGAAGA
T7R	CTACTAGTTCTTGTGCGGAGTGAA

Tabela 11. Startery do wydłużania otrzymanych sekwencji fagowych cd.

IV.9. Oprogramowanie i serwisy internetowe:

Analiza obrazów uzyskanych w trakcie rozdzielania elektroforetycznych DNA i białek:

- Bio1D (Vilber Lourmat)

Analiza sekwencji DNA, anotacja genomu fagowego:

- Blastp (NCBI)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>

- Blastn (NCBI)

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=WGS&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch

- Blastx (NCBI)

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn

- Geneious 5.5.7 (Biomatters Ltd)
- DNA Baser v3.5.1 (Heracle BioSoft S.R.L.)
- FGENESB (SoftBerry)
<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>
- Muscle 3.8.31 (Robert Edgar's Bioinformatics Software)

Analiza żeli uzyskanych metodą elektroforezy dwukierunkowej:

- Phoretix 2D Range (Nonlinear Dynamics)

IV.10. Usługi:

Mikroskopia elektronowa - Wydziałowa Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Synteza oligonukleotydów – Pracownia Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie oraz firma Sigma-Aldrich

Sekwencjonowanie DNA - Wydziałowa Pracownia Technik Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Sekwencjonowanie genomowe - Firma Genomed Sp. z o. o. Serwis Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów Diagnostyka Genetyczna.

Identyfikacja białek z zastosowaniem spektrometrii mas – Środowiskowe Laboratorium Spektrometrii Mas, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

IV.11. Teren badań:

Próby wody pobierano zarówno ze strefy pelagialnej jak i litoralnej Jeziora Góreckiego

Jezioro Góreckie jest jeziorem rynnowym zlokalizowanym w centralnej części Wielkopolskiego Parku Narodowego. Należy do zbiorników eutroficznych. W jego fitoplanktonie dominują sinice nitkowate, głównie *Planktothrix agardhii* i *Aphanizomenon flos-aquae* [89, 90]. Powierzchnia jeziora wynosi 1,0136 km², głębokość średnia 8,5 m, głębokość maksymalna 16,6 m, objętość 8598,1 tys. m³, brzegi porastają lasy [91, 92]. Na jeziorze znajdują się dwie wyspy. Większa z nich nazywana jest Zamkową ze względu na znajdujące się na niej ruiny zamku Klaudyny Potockiej.

IV.12. Metody

IV.12.1. Pobór prób

Próby pobierano z ośmiu stanowisk w obrębie strefy litoralnej (rozłożonych wzdłuż północno-wschodniego brzegu jeziora) oraz z dwóch stanowisk w obrębie strefy pelagialnej (zlokalizowanych w najgłębszym punkcie jeziora oraz na północny zachód od wyspy Zamkowej).

Próby wody z głębokości 0-15m pobierano za pomocą batometru. Wodę nadosadową pobierano z wykorzystaniem próbnika Kajaka (do prób z osadów dennych). Próby wody ze strefy litoralnej pobierano za pomocą sterylnej pipety. Materiał był mieszany z pożywką transportową (LB) w stosunku 6:4.

IV.12.2. Izolacja czystych kultur bakterii z prób wody

200 μ l każdej z prób wysiewano na podłoże stałe (WPCA patrz IV.1.1) i inkubowano przez noc w 37°C (a wybrane próby także w 20°C). Kolonie liczono lub uznawano za niepoliczalne, jeśli ich liczba na płytce przekraczała 200.

Czyste kultury wyprowadzano metodą posiewu redukcyjnego (także na podłożu WPCA).

IV.12.3. Identyfikacja szczepów bakterii na podstawie sekwencji regionu 16S rDNA

IV.12.3.1. Przygotowanie matryc do reakcji PCR

Ślad biomasy z kolonii bakteryjnej po całonocnej kulturze zawieszono w 30 μ l buforu lizującego (patrz IV.2.1). Mieszaninę inkubowano 10min w 95°C, a następnie chłodzono w lodzie przez 5min. Odwirowywano nierozpuszczalne resztki komórek (20min, 14000 rpm, 4°C), a nadsącz po przeniesieniu do nowej próbówki rozcieńczano 5-10 razy.

IV.12.3.2. Amplifikacja regionu 16S rDNA

W reakcji PCR użyto starterów S-D-Bact-0008-a-S-20 oraz S*-Univ-1492-b-A-21 (tabela 7 [88]) służących do powielania regionu kodującego 16S rRNA. Mieszanina reakcyjna zawierała: 1x bufor dla polimerazy, 200μM dNTP, 1μM każdego ze starterów, 0,04U/μl rekombinowanej polimerazy Taq (Fermentas) oraz 1,5 mM MgCl₂ oraz 2 μl matrycowego DNA na każde 10μl. Reakcję prowadzono w objętości 10-20 μl w następujących warunkach:

- wstępna denaturacja 95°C 5 min
- hybrydyzacja starterów 48°C 1min
- wydłużanie łańcucha 72°C 1min 30s
- denaturacja 95°C 1 min
- końcowe wydłużanie 72°C 15 min.

Produkty reakcji rozdzielano na 1% żelu agarozowym i oczyszczono za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit.

IV.12.3.3. Sekwencjonowanie produktów PCR

Oczyszczone produkty PCR sekwencjonowano w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej WB UAM za pomocą sekwenatora 3130x Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Do sekwencjonowania użyto starterów S-D-Bact-0008-a-S-20 oraz S*-Univ-1492-b-A-21 (tych samych, co w reakcji PCR).

IV.12.4. Izolacja bakteriofagów dla wybranych bakterii występujących w jeziorze Góreckim

Jako gospodarzy do poszukiwania fagów wybrano 5 izolatów reprezentujących najczęściej obserwowane rodzaje bakterii (według dostępnych wówczas informacji na ten temat). Wybrane izolaty zostały oznaczone skrótami pochodzącymi od nazw gatunków, do których były podobne:

AH - *Aeromonas hydrophila*

AL - *Acinetobacter lwoffii*

BP - *Bacillus pumilus*

EA - *Enterobacter amnigenus*

PF - *Pseudomonas fluorescens*

Pierwszym etapem izolacji było namnożenie fagów obecnych w próbach wody. Przeprowadzono je w kulturach wzbogaceniowych o następującym składzie:

- 10x pożywka LB - 0,5ml
- płynna kultury jednego z gospodarzy (LB) - 0,5ml
- badana próba wody - 4,5 ml

Kulturę inkubowano w 30°C przez noc przez z łagodnym wytrząsaniem. Odwirowywano komórki bakteryjne (10 min, 14 000 rpm, 20°C), a supernatant sączono przez filtr strzykawkowy Millex 33mm (Millipore) o średnicy porów 0,22 µm. Mikrolitr tak przygotowanego filtratu nanoszono na podłoże stałe, na którym wcześniej wysiano 50 µl całonocnej kultury odpowiedniego gospodarza.

Jeśli obserwowana była strefa przejaśnienia (lizy lub spowolnionego wzrostu komórek) mianowano filtrat w celu uzyskania pojedynczych łysinek.

IV.12.5. Mianowanie faga

Przygotowywano serię rozcieńczeń mianowanej próby w pożywce SOB, a następnie mieszano je z kulturą gospodarza w proporcji 30µl:100µl. Mieszaninę inkubowano przez 15 min w temperaturze 30°C i wysiewano na podłoże stałe. Miano obliczano na podstawie średnich wyników otrzymanych na płytkach, na których zaobserwowano od 10 do 200 łysinek.

IV.12.6. Namnażanie uzyskanych izolatów faga

1 ml płynnej pożywki SOB zaszczerpiono śladem kolonii gospodarza. Po całonocnej inkubacji w 30°C z łagodnym wytrząsaniem (optimum temperaturowe dla *B. pumilus*) kulturę zaszczerpiono materiałem wyizolowanym z pojedynczej łysinki i ponownie inkubowano przez noc.

IV.12.7. Przygotowanie lizatów fagowych

Pożywkę SOB (w ilości 50 - 200 ml) zaszczerpiano śladem kolonii gospodarza i inkubowano w temperaturze 30°C z łagodnym wytrząsaniem przez 20h. Po upływie tego czasu do kultury dodawano lizat fagowy o mianie 1×10^8 - 1×10^9 (uzyskany podczas namnażania fagów uzyskanych z pojedynczej łysinki lub w poprzednim, podobnym pasażu) w stosunku 1:100 i inkubowano 22-24h w 30°C, po czym wirowano (10 min. 4000 g, 20°C), aby oddzielić większość komórek bakteryjnych. Tak uzyskane lizaty zamrażano w - 20°C lub wykorzystywano bezpośrednio do izolacji DNA, lub białka. Część każdego lisatu sączono przez filtr strzykawkowy Millex 33mm (Millipore) o średnicy porów 0,22µm mianowano i wykorzystywano, jako inokulum do dalszej propagacji faga.

IV.12.8. Charakterystyka gospodarzy wyizolowanych bakteriofagów

Identyfikację obydwóch gospodarzy wyizolowanych bakteriofagów prowadzono za pomocą testów biochemicznych Microbact 24E. Inokulację i inkubację testów zawiesinami badanych izolatów bakterii prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. W przypadku izolatu EA identyfikację odczytano za pomocą programu dołączonego do zestawu. W przypadku izolatu BP identyfikacja została wyznaczona na podstawie porównania otrzymanych wyników z tabelą przygotowaną przez Logan'a i Berkeley'a [93].

W celu otrzymania pełnej sekwencji regionu 16S rDNA izolatu BP (gospodarza faga ΦAGATE) przeprowadzono powtórne sekwencjonowanie produktu jego powielania, z wykorzystaniem dodatkowych starterów 16S1100R, 16S1100.F, 16S519RDeg, 16S357F (patrz tabela 7) [88].

Wyniki identyfikacji izolatu BP potwierdzono również na podstawie analizy profilów peptydów uzyskanych metodą spektrometrii mas (patrz IV.12.34).

IV.12.9. Badania oddziaływań antagonistycznych pomiędzy wybranymi gatunkami bakterii

Oddziaływania między wybranymi izolatami bakterii badano metodą dołkową na pożywce WPCA. Do studzienki wyciętej w podłożu, na które wcześniej wysiano 100μl całonocnej kultury jednego z mikroorganizmów, podawano 50μl kultury drugiego. Próby inkubowano w 37°C i 20°C, a wynik odczytywano po 24h i 48h. Jako wynik pozytywny (oddziaływanie antagonistyczne) interpretowano strefę przejaśnienia (spowolnionego wzrost warstwy bakterii) zlokalizowaną wokół studzienki.

IV.12.10. Ustalenie zakresu gospodarzy zakażanych przez faga

Aby określić wrażliwość innych (niż gospodarze wykorzystani do izolacji) bakterii na zakażenie fagiem - nanoszono 1μl lizatu na podłoże stałe, na którym wcześniej posiano badany mikroorganizm. Szalki inkubowano przez noc w 30°C i obserwowano ewentualną strefę lizy lub zahamowania wzrostu. Wśród testowanych bakterii były izolaty *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *Enterobacter arogenes*, *E. agglomerans* oraz *Citrobacter freundii* uzyskane z kolekcji Instytut Roślin i Przetworów Zielarskich, a także uzyskane w trakcie trwania badań izolaty zaklasyfikowane do rodzajów *Bacillus* i *Enterobacter* (po 1 przedstawicielu każdego wstępnie zidentyfikowanego gatunku).

IV.12.11. Krzywa replikacji faga ΦAGATE

W celu ustalenia dynamiki replikacji faga dodano 10 μl lizatu fagowego (przygotowanych jak w punkcie IV.12.7) o mianie $\sim 4 \times 10^3$ pfu/ml do 1 ml całonocnej kultury *B. pumilus* (w pożywce SOB patrz IV.1.5). Mieszaninę inkubowano w temperaturze 30°C z łagodnym wytrząsaniem. Z zakażonej kultury co godzinę pobierano próbę i mianowano zawartego w niej faga.

IV.12.12. Wizualizacja cząstek fagowych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Lizaty fagowe były sączone przez filtr strzykawkowy Millex 33mm (Millipore) o średnicy porów 0,22 μm . Otrzymany filtrat był następnie sączony przez filtr poliwęglanowy Nuclepore Track-Etched Membrane (Whatman) o wielkości porów 0,015 μm . Zatrzymane na nim cząstki fagowe były odpłukiwane przez wytrząsanie w 2% roztworze formaldehydu lub 0,1 M roztworze octanu amonu (w ilości około 1ml). Cząstki fagowe przenoszono na siatki mikroskopowe i wizualizowano przez barwienie negatywowe fosforanem wolframu. Bakteriofagi obserwowano przy napięciu przyspieszającym wiązkę 80 kV i powiększeniu od 120 tys. do 150 tys. razy w Wydziałowej Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej WB UAM.

IV.12.13. Izolacja fagowego DNA

Bakterie pozostałe w lizatach fagowych (patrz IV.12.7) inaktywowano termicznie (20 minut w temp. 65°C). Zawiesinę wirowano (10 min. 4000 g, 20°C), a do 20 ml otrzymanego nadsącza dodawano 4 ml 20% roztworu PEG 8000. Mieszaninę inkubowano 20 min. w temp. 4°C i ponownie wirowano w celu osadzenia agregatów cząstek fagowych (rotor 55.2 *Ti Backman*, 35000 rpm, 30 min., 4°C). Otrzymany osad zawierający cząstki fagowe zawieszano w 600 μl buforu TE. Następnie prowadzono ekstrakcję fenolem (pH 8.0), mieszaniną chloroform:fenol (1:1) i chloroformem. W razie potrzeby każdą z ekstrakcji powtarzano (aż do zaniknięcia osadu w interfazie). DNA wytrącano z roztworu przez dodanie do fazy wodnej 3 objętości mieszaniny 96% etanolu i 3 M octanu sodu (25:1) i inkubację przez 10-30 minut w -20°C i odwirowywano (12000 rpm, 10 min, 4°C). Osad DNA przemywano 75% alkoholem etylowym, ponownie wirowano (12000 rpm, 1 minuta, 4°C) i suszono przez 10 min w temperaturze 37°C. DNA zawieszano w 20 μl sterylnej wody Milli-Q i przechowywano w -20°C. Ocenę jakości izolowanego DNA prowadzono przez elektroforezę w 0,8% żelu agarozowym.

Alternatywnie:

DNA z osadu straconego PEG 8000 (jak powyżej) dwukrotnie oczyszczano zestawem QIAamp DNA Mini z wykorzystaniem procedury przeznaczonej do izolacji DNA bakteryjnego (pierwsza runda oczyszczania), a następnie według procedury izolacji DNA z surowych lizatów komórkowych i innych prób.

IV.12.14. Analiza wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych w wyniku trawienia genomowego DNA faga Φ AGATE enzymami *KpnI* i *Sall*

DNA fagowe poddano trawieniu za pomocą enzymów restrykcyjnych *KpnI* i *Sall* (8h w temperaturze 37°C, po zakończeniu trawienia przeprowadzono inaktywację termiczną enzymu według wskazań producenta). Otrzymaną mieszaninę fragmentów strącano trzema objętościami lodowatego 96% etanolu, po uprzednim dodaniu 0,2 objętości 1,5 M roztworu octanu amonu. Próby inkubowano przez 20 min w temperaturze -20°C, wirowano (14000 rpm, 30 min, 4°C), przemywano lodowatym 75% etanolem i ponownie wirowano (14000 rpm, 5 min., 4°C). Osad suszono w temperaturze 37°C, po czym zawieszano w sterylnej wodzie Mili-Q.

Otrzymaną mieszaninę rozdzielano w 1% żelu agarozowym. Obraz rozdziału analizowano za pomocą programu Bio1D.

IV.12.15. Przygotowanie i sekwencjonowanie biblioteki fagowego DNA

IV.12.16. Przygotowanie komórek kompetentnych *Escherichia coli* DH5 α

50 ml płynnej pożywki LB zaszczerpiono 1ml całonocnej kultury DH5 α (także w LB), a następnie inkubowano w 37°C z lekkim wytrząsaniem do osiągnięcia OD₆₀₀=0,4-0,6. Kulturę wirowano (10 min, 3000 rpm, 4°C), odrzucano nadsącz, a komórki zawieszono w 25 ml sterylnego, schłodzonego (4°C) roztworu 50mM CaCl₂/5mM PIPES o pH 7,0 i inkubowano w lodzie przez 30 min, delikatnie mieszając. Po inkubacji w lodzie komórki odwirowano (10 min., 1700g) i zawieszono w 5 ml schłodzonego roztworu 50mM CaCl₂/5mM PIPES o pH 7,0. Próby inkubowano w lodzie przez 20 min. Po zakończeniu inkubacji dodano sterylnego glicerolu do stężenia końcowego 15% i rozdzielono otrzymaną mieszaninę na porcje o objętości 200 μ l, które zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

IV.12.17. Ligacja fragmentów restrykcyjnych z wektorem pBluescript

W celu przeprowadzenia ligacji przygotowano mieszaninę o składzie:

1 μ l – 10x bufor do ligazy DNA T4

1 μ l – ligazy DNA T4 (5u/ μ l)

6 μ l – mieszaniny fragmentów restrykcyjnych (trawionych odpowiednio *Sall* lub *KpnI*)

2 μ l – wektora pBluescript (10ng/ μ l)

Mieszaninę inkubowano przez 2,5h w temperaturze 21°C.

IV.12.18. Transformacja komórek *E. coli* konstruktami zawierającymi fragmenty restrykcyjne fagowego DNA

Komórki kompetentne *E. coli* rozmrażano na lodzie, po czym do 50 µl zawiesiny komórek dodano 10 µl mieszaniny ligacyjnej i inkubowano na lodzie przez 20 minut. Po upływie tego czasu poddano komórki szokowi cieplnemu (ang. *heat-shock*) (75 sekund, 42°C) i umieszczono w lodzie na 3 minuty. Dodano 940 µl pożywki LB (bez antybiotyku) i inkubowano w temp 37°C przez 1-1,5 godziny, delikatnie wytrząsając. Komórki odwirowano (10 minut, 4000 rpm, 20°C) supernatant odrzucono, a osad zawierający komórki bakteryjne zawieszono w 200 µl pożywki LB. Bakterie wysiewano na podłoże stałe (LB z ampicyliną) w objętości 50 µl i 150 µl. Selekcję transformantów przeprowadzono na podstawie wyniku testu α -komplementacji.

IV.12.19. Izolacja plazmidowego DNA

Śladem kolonii każdego z wyselekcjonowanych transformantów zaszczerpiono 10 ml płynnej pożywki LB z ampicyliną, po czym inkubowano tak otrzymaną kulturę w 37°C przez noc z intensywnym wytrząsaniem. Otrzymane komórki oddzielano przez wirowanie (10 minut, 4000 rpm, 20°C) i izolowano DNA plazmidowy za pomocą zestawu Plasmid Mini AX. Jakość DNA i wielkość otrzymanych konstruktów oceniano na podstawie obrazu ich rozdziału w 1% żelu agarozowym.

IV.12.20. Sekwencjonowanie otrzymanych konstruktów

Oczyszczone DNA plazmidowe wykorzystano jako matryce do sekwencjonowania ze starterów T7, SP6, M13f i M13r (t). Sekwencjonowanie prowadzono w Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej przy użyciu sekwenatora 3130x Genetic Analyzer.

IV.12.21. Amplifikacja sekwencji zakonserwowanych u bakteriofagów z rzędu *Caudovirales*

Na podstawie porównania wielu sekwencji zaprojektowano zdegenerowane startery do amplifikacji niepoznanych jeszcze sekwencji w genomie faga Φ AGATE zakonserwowanych u wybranych fagów z rzędu *Caudovirales*: zależną od S-adenoylo-L-metioniny metylotransferzę DNA oraz mniejsze białko kapsydu (proteazę proglówki). Mieszanina reakcyjna zawierała:

1x bufor dla polimerazy, 200 μ M dNTP, 1 μ M każdego ze starterów, 0,04U/ μ l rekombinowanej polimerazy Taq (Fermentas) oraz 1,5 mM MgCl₂. oraz 2 μ l matrycowego DNA na każde 10 μ l. Reakcję prowadzono w objętości 10-20 μ l w następujących warunkach:

- wstępna denaturacja 95°C, 5 min,
- hybrydyzacja starterów 50°C, 30 s,
- wydłużanie łańcucha 72°C, 1 min 30 s,
- denaturacja 95°C, 1min,
- końcowe wydłużanie 72°C, 15 min,

Po ocenie długości i jakości produktów PCR na podstawie obrazu rozdziału elektroforetycznego wybrane z nich oczyszczano (zestawem QIAquick PCR Purification Kit) i sekwencjonowano. Sekwencjonowanie przeprowadzono w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej z wykorzystaniem tego samego zestawu starterów co do amplifikacji.

IV.12.22. Wydłużanie otrzymanych sekwencji

Sekwencje otrzymane w trakcie sekwencjonowania biblioteki fagowego DNA wydłużano technikami chodzenia po genomie (lub spaceru po genomie, ang. *genome walking*). Zastosowano następujące metody:

- sekwencjonowanie na matrycy genomowej lub plazmidowej ze starterów zaprojektowanych na podstawie znanych odcinków
- PCR z "jednego startera"
- wydłużalnie miejsca restrykcyjnego
- łączenia znanych fragmentów DNA za pomocą PCR z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji znajdujących się na ich końcach.

IV.12.23. Sekwencjonowanie na matrycy genomowej lub plazmidowej (ang. *primer walking*)

Sekwencjonowanie prowadzono w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej przy użyciu sekwenatora 3130x Genetic Analyzer. Wykorzystano do tego celu startery opisane w tabeli 11. Podobnie sekwencjonowano wszystkie opisane poniżej produkty reakcji PCR.

IV.12.24. PCR "z jednego startera"

PCR "z jednego startera" (ang. *single primer PCR*) jest to technika, w której wykorzystuje się niespecyficzne wiązanie startera do matrycy przy obniżonej temperaturze hybrydyzacji.

Pierwszą rundę przeprowadza się jedynie ze starterem specyficznym dla znanej sekwencji. DNA syntezowane jest w kierunku nieznanego fragmentu, gdzie ten sam starter powinien się przyłączyć niespecyficznie. Zwykle podczas pierwszej rundy amplifikacji powstaje wiele różnych produktów. Przeprowadza się więc drugą, stanowiącą swoistą odmianę "zagnieżdżonej" (ang. *nested*) reakcji PCR. Tym razem używa się startera z pierwszej rundy (który hybrydyzuje teraz do obydwóch końców ampliconu) i drugiego, zaprojektowanego tak, aby hybrydyzował za (w kierunku 3' od) miejscem przyłączania pierwszego startera (to jest bliżej brzegu znanej sekwencji) [94].

W reakcji PCR "z jednego startera" wykorzystywano startery z tabeli 11, a warunki reakcji były następujące:

I Runda:

Mieszanina reakcyjna zawierała:

1x bufor dla polimerazy, 200 μ M dNTP, 2 μ M startera dla rundy I, 0,04U/ μ l rekombinowanej polimerazy Taq (Fermentas) oraz 1,5 mM MgCl₂. oraz od 2 μ l matrycowego DNA na każde 10 μ l.

Warunki amplifikacji:

Wstępna amplifikacja przy podwyższonej temperaturze hybrydyzacji starterów, stosowana dla poprawienia specyficzności reakcji (ang. *touchdown*)

- wstępna denaturacja 94°C, 1 min
- denaturacja 94°C, 30 s
- hybrydyzacja starterów 55°C, 45 s
- wydłużanie łańcucha 72°C, 2 min 10 s

5 cykli

- denaturacja 94°C, 30 s
- hybrydyzacja starterów 45 s (temperatura różna, w zależności od zastosowanej pary starterów)
- wydłużanie łańcucha 72°C, 2 min 10 s

30 cykli

- końcowe wydłużanie 72°C, 5 min

II Runda:

Mieszanina reakcyjna zawierała:

1x bufor dla polimerazy, 200 μ M dNTP, 0,2 μ M startera dla rundy I 2,5 μ M startera dla rundy II, 0,04U/ μ l rekombinowanej polimerazy Taq (Fermentas) oraz 1,5 mM MgCl₂. oraz od 2 μ l matrycowego DNA na każde 10 μ l.

Warunki amplifikacji:

Wstępna amplifikacja przy podwyższonej temperaturze hyrydzacji starterów

- wstępna denaturacja 94°C, 1 min
- denaturacja 94°C, 30 s
- hybrydyzacja starterów 55°C, 45 s
- wydłużanie łańcucha 72°C, 2 min 10s

5 cykli

- denaturacja 94°C, 30s
- hybrydyzacja starterów 45s (temperatura różna, w zależności od zastosowanej pary starterów wyższa o 3-5°C niż w rubdzie pierwszej)
- wydłużanie łańcucha 72°C, 2min 10s

30 cykli

- końcowe wydłużanie 72°C, 5min

Produkt rozdzielano na 1% żelu agarozowym i oczyszczono za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

IV.12.25. Wydłużanie miejsc restrykcyjnych (ang. *RSE - restriction site extension*)

Wydłużanie miejsc restrykcyjnych to metoda pozwalająca na poznanie sekwencji znajdującej się pomiędzy znanym odcinkiem DNA, a najbliższym miejscem cięcia dla wybranej endonukleazy restrykcyjnej. DNA genomowe trawi się enzymem generującym lepkie końce. Tak przygotowana matryca jest amplifikowana w trakcie zmodyfikowanej reakcji PCR. Jednym starterem jest specyficzny dla znanej sekwencji, a drugi to starter/adaptor zaprojektowanym tak, aby jego 3' koniec hybrydyzował do miejsca restrykcyjnego. Pierwszym etapem jest przyłączanie startera/adaptora do kohezyjnego końca DNA. Wystający koniec jest następnie wydłużany przez polimerazę Taq na matrycy adaptora, powstaje więc sekwencja do niego komplementarna. Następnie rozpoczyna się normalna reakcja PCR pomiędzy nowo utworzonym miejscem hybrydyzacji startera/adaptora, a miejscem wiązania startera specyficznego względem znanej sekwencji. Zwykle w reakcji powstają liczne niespecyficzne produkty, więc wykonywana jest druga runda amplifikacji, w której jeden starter zaprojektowany jest tak, że hybrydyzuje z fragmentem sekwencji adaptorowej, a drugi jest starterem "zagnieżdżonym" (w stosunku do specyficznego względem znanej sekwencji startera z pierwszej rundy, podobnie jak w przypadku PCR "z jednego startera") [95].

W reakcji wykorzystywano startery adaptorowe (tabela 10) oraz startery z tabeli 11. Stosowane warunki reakcji prezentowały się następująco:

I Runda

Mieszanina reakcyjna zawierała:

1x bufor dla polimerazy, 200 μ M dNTP, 1 μ M startera specyficznego względem znanej sekwencji dla rundy I, 1 μ M startera/adaptora, 0,04U/ μ l rekombinowanej polimerazy Taq (Fermentas) oraz 1,5 mM MgCl₂. oraz od 2 μ l matrycowego DNA

Warunki amplifikacji:

Synteza odcinka komplementarnego do starterów/adapterów:

- denaturacja 94°C 2 min
- hybrydyzacja starterów/adaptorów do wystającego końca miejsca restrykcyjnego 45°C 20 s
- wydłużanie łańcucha 72°C 5 s

Właściwa reakcja PCR:

- denaturacja 94°C 30 s
- hybrydyzacja starterów/wydłużanie łańcucha 72 3 min 10 s (-1°C na każdy kolejny cykl, aż do osiągnięcia właściwej temperatury hybrydyzacji dla każdej pary starterów wynoszącej T_m -5°C gdzie T_m to średnia temperatura topnienia pary)

20 cykli (od momentu osiągnięcia właściwej temperatury hybrydyzacji)

- końcowe wydłużanie 72°C 8 min

II Runda

Mieszanina reakcyjna zawierała:

1x bufor dla polimerazy, 200 μ M dNTP, 1 μ M startera specyficznego względem znanej sekwencji dla rundy II, 1 μ M startera specyficznego względem adaptora, 0,04U/ μ l rekombinowanej polimerazy Taq (Fermentas) oraz 1,5 mM MgCl₂. oraz od 2 μ l matrycowego DNA

Warunki amplifikacji:

- wstępna denaturacja 94°C 2 min
- denaturacja 94°C 30 s
- hybrydyzacja starterów/wydłużanie łańcucha 72 3 min 10 s (-1°C na każdy kolejny cykl, aż do osiągnięcia właściwej temperatury hybrydyzacji dla każdej pary starterów wynoszącej T_m -1°C gdzie T_m to średnia temperatura topnienia pary)

25 cykli (od momentu osiągnięcia właściwej temperatury hybrydyzacji)

- końcowe wydłużanie 72°C 8 min

IV.12.26. Łączenie otrzymanych sekwencji.

Łączenie otrzymanych sekwencji prowadzono techniką PCR. Wykorzystywano startery opisane w tabeli 11. Mieszanina reakcyjna zawierała, 1x bufor dla polimerazy, 200 μ M dNTP, 1 μ M każdego ze starterów, 0,04U/ μ l rekombinowanej polimerazy Taq (Fermentas) oraz 1,5 mM MgCl₂. oraz od 2 μ l matrycowego DNA na każde 10 μ l. Warunki reakcji różniły się w zależności od wybranej pary starterów i przewidywanej długości produktu.

IV.12.27. Sekwencjonowanie całego genomu metodą 454

Sekwencjonowanie metodą 454 i złożenie otrzymanych odczytów wykonano w firmie Genomed, za pomocą sekwenatora GS Junior (Roche).

IV.12.28. Składanie i anotacja genomu faga

Składanie (wraz z automatycznym odcinaniem fragmentów pochodzących z wektorów lub o słabej jakości odczytu) sekwencji otrzymanych z sekwencjonowania metodą Sanger i 454 prowadzono przy pomocy zestawu narzędzi Geneious przy najwyższej dostępnej czułości. Także przewidywanie ramek odczytu prowadzono wykorzystując algorytm z tego zestawu. Jako minimalną długość ramki wybrano 90 nukleotydów, a automatyczną translację przeprowadzono według tabeli bakteryjnego kodu genetycznego.

Analizę podobieństwa otrzymanych sekwencji białkowych prowadzono stosując algorytm Blastp. Jako maksymalną wartość oczekiwaną dla uzyskanych trafień wybrano 1×10^{-20} . Analizę obecności operonów prowadzono za pomocą narzędzia FGENESB (SoftBerry). Jako szablon do przewidywania operonów wykorzystano dane na temat *Bacillus subtilis*.

IV.12.29. Przygotowanie ekstraktów całkowitego białka z zakażonych i niezakażonych kultur fagowych przez strącanie siarczanem amonu.

Kultury *B. pumilus* niezakażone fagiem ΦAGATE poddawano sonikacji (15 cykli po 20s, 40 sekund przerwy, przy maksymalnej mocy sonikatora). Z tak przygotowanych lizatów, a także z lizatów fagowych (patrz IV.12.7) odwirowywano i odrzucono nierozpuszczalne pozostałości komórek bakteryjnych (20 min, 14000 rpm, 4°C). Zawarte w nadsączu białko było następnie strącane przez dodanie odpowiedniej ilości nasyconego roztworu siarczanu amonu. Białka z kultur niezakażonych strącono w 60% oraz 80% nasyceniu siarczanu amonu. Dla lizatów z kultur zakażonych fagiem przygotowano dodatkową próbę strąconą przy 50% nasyceniu tej soli. Precypitat rozpuszczano w buforze do rozpuszczania białka (rozdział IV.2.6).

IV.12.30. Przygotowanie ekstraktu białka z zakażonych fagiem Φ AGATE kultur *B. pumilus* przez strącanie PEG 8000 (zagęszczanie białek związanych z cząstkami fagowymi)

Z lizatów fagowych (patrz IV.12.7) odwirowano nierozpuszczalne pozostałości komórek bakteryjnych (20 min, 14000 rpm, 4°C). Do 20 ml otrzymanego nadsącza dodawano

4ml roztworu PEG 8000 (rozdział IV.2.4), a po wymieszaniu inkubowano 20 min. w temp. 4°C i ponownie wirowano w celu osadzenia agregatów cząstek fagowych (rotor 55.2 Ti Backman, 35000 rpm, 30 min., 4°C). Precypitat zawieszano w buforze do zawieszania białka (IV.2.6).

IV.12.31. Oczyszczanie białek z otrzymanych ekstraktów

Białko ekstrahowano fenolem (pH 8.0). Fazę fenolową przemywano sterylną wodą Mili-Q trzy lub więcej razy (jeśli po wirowaniu faza wodna nie była klarowna). Rozpuszczone białka wytrącano z roztworu czterema objętościami lodowatego 100% acetonu i inkubowano przez noc w -20°C. Po odwirowaniu (30 min, 14000 rpm, 4°C), osad przemywano trzykrotnie 100% acetonem i suszono około 1h pod komorą z laminarnym przepływem powietrza, w temperaturze pokojowej. Stężenie uzyskanego białka oznaczano metodą Bradford, a jego jakość na podstawie obrazu w rozdziale elektroforetycznym.

IV.12.32. Rozdziały białek z zakażonych i niezakażonych fagiem Φ AGATE kultur *B. pumilus* w warunkach denaturujących (PAGE)

Do rozdzału białek bakteriofagowych wykorzystano dwustopniowy żel poliakryloamidowy, o składzie podanym w punkcie IV.3.1. Elektroforezę białek prowadzono w buforze Laemmli przez 2 h przy natężeniu 30 mA i napięciu 120 V. Przed nałożeniem na żel próby obciążano barwnikiem do nakładania białek (SB – IV.2.7) w stosunku 1:1 i inkubowano przez 10 min w 95°C. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w obecności markera mas cząsteczkowych SM431 Unstained Protein Molecular Weight Marker lub SM0441 Prestained Protein Molecular Weight Marker.

IV.12.33. Elektroforeza dwukierunkowa białek fagowych oraz bakteryjnych

Oczyszczone białko fagowe zawieszano w buforze do rehydratacji (rozdział IV.2.11), tak aby uzyskać końcowe stężenie 0,75mg/ml. Do rynienek nakładano 400 µl buforu do rehydratacji, a następnie umieszczano w nich pasek do ogniskowania izoelektrycznego (IPG BlueStrip 4-7/18 cm). Całość pokrywano płynem zabezpieczającym przed parowaniem (PlusOne cover fluid, GE Healthcare) i inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej. Ogniskowanie izoelektryczne prowadzono w następujących warunkach:

Krok programu	Napięcie [V]	Czas [h]	Czas trwania [Vh]
1	300	0,25	75
2	600	0,25	150
3	1500	0,25	375
4	3000	0,5	1500
5	6000	5-7	30000-42000
Całość		6,25-8,25	ok. 32100-44100

Tabela 12. Warunki ogniskowania izoelektrycznego.

Po zakończeniu paski równoważono 10 min w buforze równoważącym 1 (IV.2.12) i kolejnych 10 minut w buforze równoważącym 2 (IV.2.13), a następnie nakładano na żel do drugiego kierunku (tabela 6).

Wertykalny rozdział elektroforetyczny (PAGE) prowadzono przy napięciu 80-90V/żel tak długo, aż czoło barwnika zbliżyło się na 1-3 cm do dolnej granicy żelu. Żele wybarwiano roztworem Coomassie Silver Blue (IV.2.14) i odbarwiano wodą dejonizowaną.

IV.12.34. Identyfikacja białek fagowych na podstawie profilu peptydów otrzymanego w spektrometrii mas

Oczyszczone białka były trawione trypsyną, a profil peptydów otrzymano metodą połączonej z chromatografią cieczową, tandemowej spektrometrii mas z jonizacją typu electrospray (LC-ESI-MS/MS) w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas w IBB PAN w Warszawie.

Otrzymany profil był analizowany za pomocą programu Mascot. Minimalna wartość punktacji, przy jakiej identyfikację uznawano za wiarygodną wynosiła 50.

IV.12.35. Analiza filogenetyczna na podstawie przewidywanej sekwencji głównego białka kapsydu oraz białka portalu

Sekwencje głównego białka kapsydu i białka portalu otrzymano na podstawie translacji *in vitro* otwartych ramek odczytu kodujących te białka w genomie faga ΦAGATE. Do analizy filogenetycznej użyto także wszystkich odnalezionych w bazie NR Protein sekwencji fagowych, dla których wartość oczekiwana algorytmu blast (przy przeszukiwaniu sekwencją głównego białka kapsydu i białka portalu faga ΦAGATE) była mniejsza niż 1×10^{-20} . Sekwencje porównano za pomocą programu Geneious metodą MUSCLE, a następnie przygotowano dendrogramy konsensusowe (z 1000 powtórzeń) metodami UPGMA i Neighbour Joining w tym samym programie przy ustawieniach domyślnych [96].

IV.12.36. Izolacja kwasu poli-γ-glutaminowego (γPGA) z kultur bakteryjnych

Izolację kwasu poli-γ-glutaminowego (ang. γPGA, *poly-γ-glutamic acid*) prowadzono nieznacznie zmodyfikowaną procedurą Goto i Kunioka [97]. Z całonocnej kultury izolatu BA (gospodarza faga) odwirowywano komórki (2x10min, 14000 rpm, 4°C, za każdym razem osad odrzucano a supernatant przenoszono do nowej próbówki). γPGA z supernatantu strącano czterema objętościami 100% metanolu w temperaturze -20°C przez 1h, odwirowywano (40min, 14000 rpm, 4°C). Osad przemywano 75% metanolem i zawieszano w 1% roztworze chlorku sodu. Odwirowywano nierozpuszczalne zanieczyszczenia i ponownie strącano γPGA czterema objętościami metanolu tym razem w temperaturze 4°C przez noc. Otrzymany osad ponownie odwirowywano (40min, 14000 rpm, 4°C), przemywano 75% metanolem i suszono pod komorą z laminarnym przepływem powietrza, w temperaturze pokojowej przez noc. Po wysuszeniu, osad ważono i zawieszano w sterylnej wodzie Mili-Q. Jakość wyizolowanego γPGA oceniano przez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. Dla porównania rozdzielano także γPGA poddane trawieniu proteinazą K (10min, 30μg enzymu, 56°C 0,5 bufor AL z zestawu QIAamp DNA Mini). Obraz rozdziału uwidaczniano przez barwienie polimeru zawartego w żelu roztworem błękitu metylenowego.

IV.12.37. Testy aktywności hydrolazy kwasu poli- γ -glutaminowego

Test aktywności hydrolazy γ PGA przeprowadzono według Kimury i Itoh [98], z tą różnicą, że nie izolowano enzymu, lecz badano aktywność w ekstraktach zawierających wszystkie białka z zakażonych lub niezakażonych fagiem Φ AGATE kultur *B. pumilus*.

Do 194 μ l przygotowanej mieszaniny reakcyjnej ($\sim$ 15 mg/ml γ -PGA zawieszonego w 10 mM fosforanie sodowym [pH 7.5] i 150 mM chlorku sodu) podano na lodzie 6 μ l ekstraktu zawierający 10 μ g całkowitego białka z zakażonych kultur. Jako kontrolę przygotowano taką samą mieszaninę, do której podano ekstrakt zawierający taką samą ilość białka z kultur niezakażonych. Reakcje prowadzono w 37°C. Z każdej mieszaniny pobierano próby po 20 μ l przed podaniem enzymu, natychmiast po podaniu, a także po 0,5 h i po 1h. Degradację γ PGA oceniano na podstawie obrazu rozdziału elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. Obraz rozdziału uwidacziano przez barwienie polimeru zawartego w żelu roztworem błękitu metylenowego.

V. Wyniki

V.1. Izolacja bakterii tlenowych, fakultatywnie beztlenowych i aerotolerancyjnych z prób wody

Próby wody do badań pobierano z Jeziora Góreckiego wysiewano na podłoże stałe. Bakterie hodowano i liczono w sposób opisany w punkcie IV.12.1.

Miano bakterii różniło się znacznie w zależności od czasu i miejsca poboru próby. W strefie litoralnej uzyskano najwięcej kolonii z posiewów prób pobranych w miesiącach letnich. Maksimum (średnio 604,63 cfu/ml) przypadało na sierpień 2009. Najniższe miano (średnio 15 cfu/ml) uzyskano z posiewów prób pochodzących z października 2009. Należy zaznaczyć, iż w związku z niestabilną pokrywą lodową dane z stycznia i lutego 2010 nie są dostępne. W profilu pionowym najwyższe miano zaobserwowano w próbach pobranych bezpośrednio znad osadu (średnia 634,26 cfu/ml) oraz pomiędzy powierzchnią i piątym metrem głębokości (średnio 362,19 cfu/ml). Pomiedzy piątym metrem, a dnem (15m) liczba kolonii była znacznie mniejsza (średnio 20,77 cfu/ml). Wyższe wyniki uzyskano dla kultur inkubowanych w temperaturze 37°C (średnio 418,38 cfu/ml) niższe natomiast w 20°C (średnio 342,82 cfu/ml)

W strefie pelagialnej dla prób pobranych w marcu i czerwcu 2010 uzyskano niepoliczalną ilość kolonii. Zagęszczenie populacji może być więc największe właśnie w tych miesiącach. Najwyższą (policzalną) liczbę kolonii uzyskano w czerwcu 2009.

Czyste kultury zostały wyprowadzone dla 117 klonów ze strefy litoralnej oraz 293 klonów ze strefy pelagialnej.

V.2. Identyfikacja szczepów bakterii na podstawie fragmentów sekwencji regionu 16S rDNA

Po wyprowadzeniu czystych kultur bakterie identyfikowano na podstawie sekwencji regionu kodującego 16S rRNA. Przynajmniej częściową sekwencję udało się poznać dla 61 izolatów pochodzących ze strefy litoralnej i 149 ze strefy pelagialnej.

Wśród bakterii wyizolowanych z litoralu zidentyfikowano przedstawicieli rodzajów: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Hafnia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Serratia*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* oraz *Stenotrophomonas*. Przedstawicieli rodzajów: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Cronobacter*, *Deinococcus*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* a także *Shewanella* zidentyfikowano w pelagialu.

Do dalszej analizy wybrano pięć izolatów bakterii reprezentujących rodzaje najczęściej obserwowane w badanych próbach wody. Selekcji dokonano przed uzyskaniem pełnych danych na temat składu populacji bakteryjnej aby jak najwcześniej przystąpić do poszukiwania fagów. Wybrane izolaty zostały oznaczone skrótami ustalonymi na podstawie najbardziej podobnych gatunków:

AH - *Aeromonas hydrophila*

AL - *Acinetobacter lwoffii*

BP - *Bacillus pumilus*

EA - *Enterobacter amnigenus*

PF - *Pseudomonas fluorescens*

l.p.	Gatunek	Liczba klonów		l.p.	Gatunek	Liczba klonów	
		Litoral	Pelagial			Litoral	Pelagial
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	1	25	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	1
2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1	-	26	<i>Enterobacter amnigenus</i> *	-	8
3	<i>Acinetobacter lwoffii</i> *	2	3	27	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-	1
4	<i>Aeromonas hydrophila</i> *	2	3	28	<i>Enterobacter mori</i>	-	1
5	<i>Aeromonas jandaei</i>	-	1	29	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	1	-
6	<i>Aeromonas popoffii</i>	-	1	30	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	1	-
7	<i>Aeromonas salmonicida</i>	2	-	31	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	-	1
8	<i>Aeromonas veronii</i>	2	11	32	<i>Exiguobacterium undae</i>	1	1
9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	2	33	<i>Hafnia alvei</i>	1	1
10	<i>Bacillus arsenicus</i>	-	1	34	<i>Moraxella osloensis</i>	-	1
11	<i>Bacillus aryabhatai</i>	-	1	35	<i>Pantoea agglomerans</i>	1	1
12	<i>Bacillus idriensis</i>	-	1	36	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	-	1
13	<i>Bacillus indicus</i>	-	1	37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1
14	<i>Bacillus lentus</i>	1	-	38	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1	-
15	<i>Bacillus licheniformis</i>	1	2	39	<i>Pseudomonas fluorescens</i> *	-	2
16	<i>Bacillus marisflavi</i>	-	1	40	<i>Pseudomonas fragi</i>	2	-
17	<i>Bacillus megaterium</i>	-	2	41	<i>Pseudomonas fulva</i>	1	-
18	<i>Bacillus pumilus</i> *	1	12	42	<i>Pseudomonas koreensis</i>	-	2
19	<i>Bacillus simplex</i>	1	3	43	<i>Pseudomonas mandelii</i>	1	-
20	<i>Bacillus subtilis</i>	-	1	44	<i>Pseudomonas putida</i>	2	-
21	<i>Bacterium NLAE-zl-P845</i>	1	-	45	<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	2
22	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	-	1	46	<i>Sphingobacterium anhuiense</i>	1	-
23	<i>Cronobacter sakazakii</i>	-	1	47	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>	2	-
24	<i>Deinococcus aquaticus</i>	-	2	48	<i>Staphylococcus lentus</i>	1	-
Klony nie wykazujące znacznego podobieństwa do opisanych gatunków							
l.p.	Gatunek	Liczba klonów		l.p.	Gatunek	Liczba klonów	
		Litoral	Pelagial			Litora	Pelagial
49	<i>Acinetobacter sp.</i>	2	-	56	<i>Pantoea sp.</i>	-	1
50	<i>Aeromonas sp.</i>	7	14	57	<i>Pseudomonas sp.</i>	7	12
51	Grupa <i>Bacillus cereus</i> ¹	-	2	58	<i>Raoultella sp.</i>	2	-
52	<i>Bacillus sp.</i>	2	20	59	<i>Serratia sp.</i>	1	2
53	<i>Enterobacter sp.</i>	4	12	60	<i>Shewanella sp.</i>	-	1
54	<i>Exiguobacterium sp.</i>	2	1	61	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	1	-
55	<i>Flavobacterium sp.</i>	-	1	62	inne <i>Enterobacteriaceae</i>	3	8

Tabela 13. Wstępna identyfikacja izolatów bakterii z Jeziora Góreckiego na podstawie analizy sekwencji 16SrDNA.

* Gwiazdką oznaczono izolaty wybrane do dalszej analizy.

¹ Szczepy z grupy *Bacillus cereus* umieszczono w drugiej części tabeli ze względu na niemożliwość zaklasyfikowania jej przedstawicieli do gatunku na podstawie sekwencji 16S.

V.3. Badania oddziaływań antagonistycznych pomiędzy wybranymi gatunkami bakterii

W trakcie badań oddziaływań między wybranymi izolatami, metodą dołkową (patrz IV.12.9) jedynie izolat BP wykazywał działanie hamujące wzrost PF. Wokół pozostałych szczepów nie zaobserwowano stref zahamowania wzrostu, co wskazuje na brak oddziaływań antagonistycznych między tymi bakteriami.

V.4. Izolacja bakteriofagów dla wybranych bakterii występujących w Jeziorze Góreckim

W celu wyizolowania bakteriofagów swoistych względem wybranych izolatów bakterii, wirusy zawarte w próbkach wody namnożono w kulturach wzbogaceniowych zawierających ich gospodarzy. Otrzymane zawiesiny nanoszono na przygotowaną murawkę bakteryjną. Wystąpienie strefy przejaśnienia interpretowano jako obecność cząstek fagowych.

W opisany powyżej sposób wyizolowano dwa bakteriofagi: Φ AGATE i phd2B. Gospodarzem pierwszego z nich jest izolat zidentyfikowany jako *Bacillus pumilus* (BP), a drugiego izolat podobny do *Enterobacter amnigenus* (EA). Obydwa fagi izolowano tylko z wody nadosadowej zawierającej niewielkie ilości osadu. Miesiące, w których obserwowano występowanie fagów w Jeziorze Góreckim przedstawiono w tabeli 14.

Fag infekujący izolat BP										Fag infekujący izolat EA									
Stanowisko	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	P1	Stanowisko	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	P1
04.10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	04.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05.10	-	-	-	-	-	+	-	+	+	05.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06.10	-	-	+	-	-	+	-	-	-	06.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
07.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08.10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	08.10	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Tabela 14. Występowanie bakteriofagów w jeziorze góreckim

V.5. Określenie zakresu gospodarzy infekowanych przez wyizolowane fagi

Swoistość fagów względem bakterii innych, niż gospodarze wybrani do ich izolacji, badano nanosząc krople zawiesiny fagowej na wysianą wcześniej na podłoże stałe warstwę odpowiednich mikroorganizmów. Poza *Bacillus pumilus* (BP) bakteriofag ΦAGATE zakażał także izolat ze strefy pelagialnej o sekwencji 16S rRNA podobnej do tej występującej u bakterii z grupy *Bacillus cereus* (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* oraz *B. weihenstephanensis*) nie infekował jednak szczepów z tej grupy uzyskanych z kolekcji IRiPZ. Nie zaobserwowano, też aby zakażał jakiegokolwiek z innych badanych szczepów z rodzaju *Bacillus*. Fag phd2B zakażał jedynie izolat EA wykorzystany do jego izolacji.

V.6. Charakterystyka gospodarzy wyizolowanych bakteriofagów

W celu uzyskania pełniejszej charakterystyki gospodarzy wyizolowanych fagów przeprowadzono testy biochemiczne z wykorzystaniem zestawów Microbact 24E™ (procedura zmodyfikowana według [93].). Wyniki identyfikacji gospodarzy fagów przeprowadzonej za pomocą testów biochemicznych przedstawiono w tabeli 15.

Test:	Redukcja azotanów	Dekarboksylaza izyny	Dekarboksylaza ornityny	Produkcja siarkowodoru	Kwas z glukozy	Kwas z manitolu	Kwas z ksylozy	OPNG	Indol z tryptofanu	Ureaza	Test Voges-Proskauer	Wykorzystanie cytrynianu	Rozkład żelatyny
BP	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
EA	nd	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Test:	Inhibicja przez metionin	Kwas z Inozytolu	Kwas z sorbitolu	Kwas z ramnozy	Kwas z sacharozy	Kwas z Laktozy	Kwas z arabinozy	Kwas z Rybitolu	Kwas z rafinozy	Kwas z salicyny	dihydrolaza arginy	Identyfikacja:	
BP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus pumilus</i>	
EA	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>Enterobacter agglomerans</i> (92,28%)	

Tabela 15. Identyfikacja gospodarzy wyizolowanych fagów na podstawie testów biochemicznych.

Porównanie otrzymanych wyników z danymi na temat pełnej sekwencji fragmentu kodującego 16S rRNA pozwoliło na zaklasyfikowanie gospodarza faga ΦAGATE (BP) do gatunku *Bacillus pumilus*. Badanie białka bakteryjnego metodą spektrometrii mas (tabela 16) potwierdziło tę identyfikację.

Strącane 60% siarczanem amonu				Strącane 80% siarczanem amonu			
L.p.	Accession	Ilość punktów	Opis	L.p.	Accession	Ilość punktów	Opis
1	gi 157691933	10102	flagellin [Bacillus pumilus SAFR-032]	1	gi 1402739	3449	major cold-shock protein [Bacillus subtilis]
2	gi 194016946	1096	aldehyde dehydrogenase, (aldhclass 2) (aldh1) (aldh-e2) [Bacillus pumilus ATCC 7061]	2	gi 157691933	1654	flagellin [Bacillus pumilus SAFR-032]
3	gi 194017532	859	translation elongation factor Tu [Bacillus pumilus ATCC 7061]	3	gi 157691463	1100	hypothetical protein BPUM_0675 [Bacillus pumilus SAFR-032]
4	gi 194015219	838	phosphopyruvate hydratase [Bacillus pumilus ATCC 7061]	4	gi 157691330	941	hypothetical protein BPUM_0538 [Bacillus pumilus SAFR-032]
5	gi 157692139	661	dihydrolipoamide dehydrogenase [Bacillus pumilus SAFR-032]	5	gi 194014870	824	aconitate hydratase 1 [Bacillus pumilus ATCC 7061]
6	gi 157690896	556	elongation factor G [Bacillus pumilus SAFR-032]	6	gi 157692139	782	dihydrolipoamide dehydrogenase [Bacillus pumilus SAFR-032]
7	gi 157692475	523	aconitate hydratase [Bacillus pumilus SAFR-032]	7	gi 157692778	720	non-specific DNA-binding protein HBSu [Bacillus pumilus SAFR-032]
8	gi 157692616	494	2-methylcitrate dehydratase [Bacillus pumilus SAFR-032]	8	gi 157693111	706	zinc (Zn) alcohol dehydrogenase [Bacillus pumilus SAFR-032]
9	gi 194016090	482	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative [Bacillus pumilus ATCC 7061]	9	gi 194015648	630	triose-phosphate isomerase [Bacillus pumilus ATCC 7061]
10	gi 194015894	460	acetoin:2,6- dichlorophenolindophenol oxidoreductase subunit beta [Bacillus pumilus ATCC 7061]	10	gi 157693314	607	citrate synthase [Bacillus pumilus SAFR-032]

Tabela 16. Identyfikacja izolatu BP na podstawie profilów peptydów uzyskanuch metodą spektrometrii mas

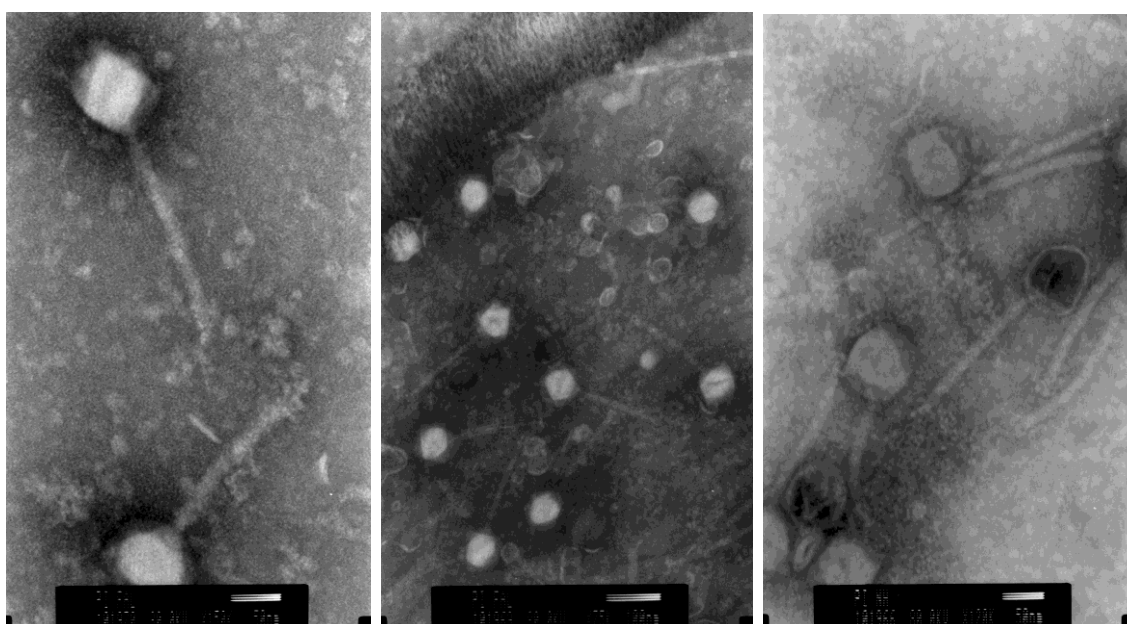
W związku z tym, że wyniki identyfikacji izolatu EA były niejasne udało się jedynie ustalić, że należy on prawdopodobnie do rodzaju *Enterobacter*.

Do dalszych badań został wybrany fag ΦAGATE, z uwagi na łatwość namnożenia i pełniejszą charakterystykę gospodarza.

V.7. Wizualizacja cząstek fagowych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Cząstki fagowe przeniesiono na siatki mikroskopowe na których były obrazowane za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej, po uprzednim barwieniu negatywowym fosforanem wolframu.

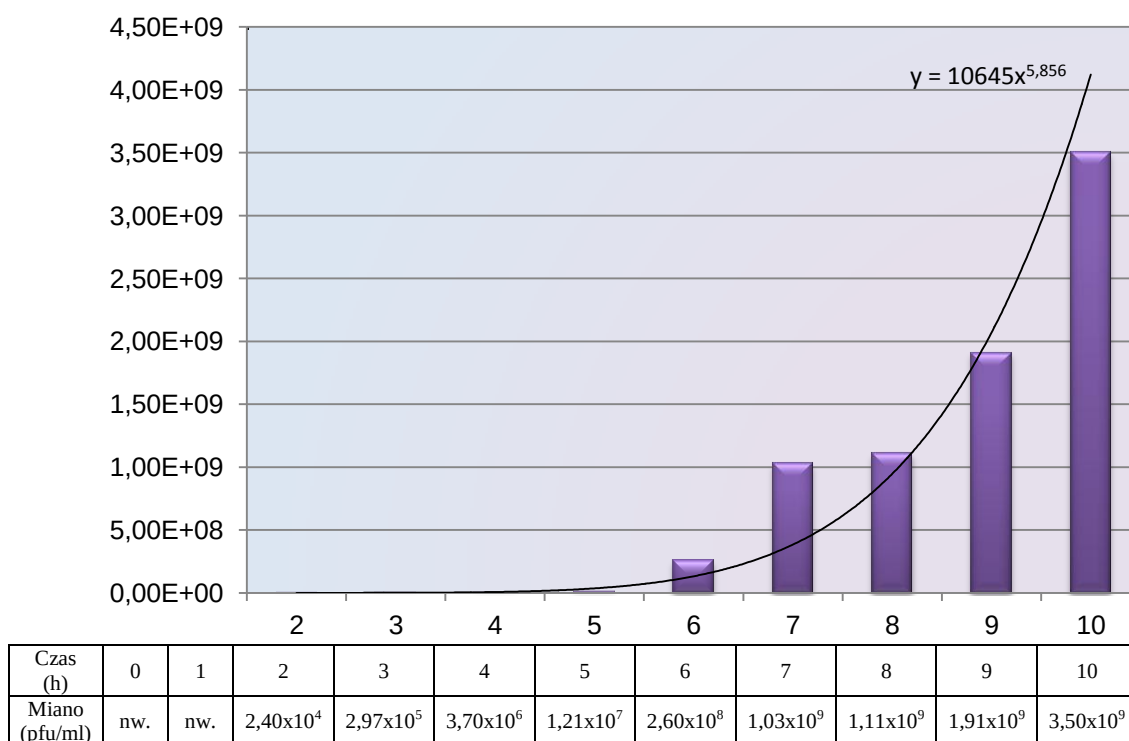
Uzyskane mikrografie (rycina 1) ujawniły, że wirion faga Φ AGATE ma strukturę typową dla rzędu *Caudovirales*. Pozbawiona otoczki ikozaedralna główka o średnicy około 80 nm połączona jest z długim (około 200 nm) ogonkiem. Rozdzielczość otrzymanych mikrografii nie pozwala ustalić czy ogonek wyposażony jest w włókienka.



Ryc. 1. Mikrografie (TEM) przedstawiające faga Φ AGATE

V.8. Krzywa replikacji

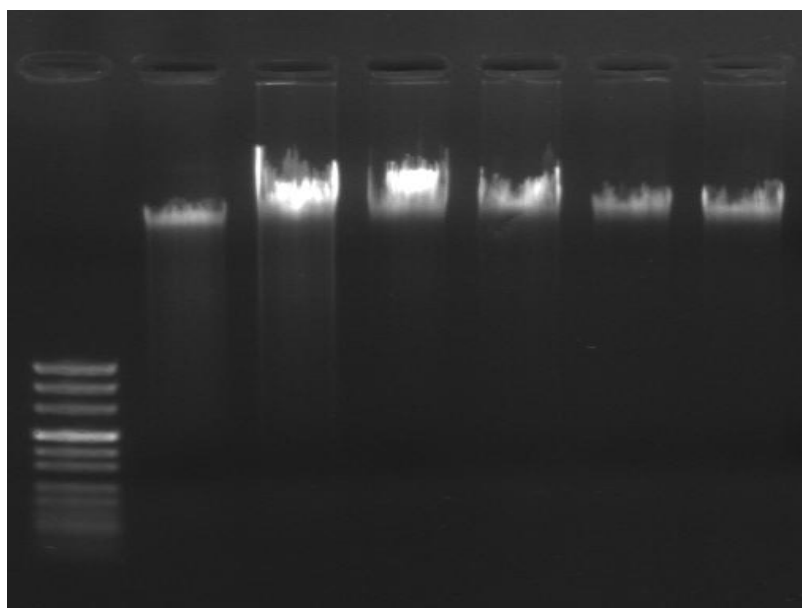
Kolejnym etapem badań było ustalenie dynamiki replikacji bakteriofaga Φ AGATE. Wyznaczono krzywą replikacji faga (rycina 2 Ryc. 2). Obserwowany okres latencji wynosił około jednej godziny. W czasie trwania eksperymentu (10h) replikacja bakteriofaga nie osiągnęła w fazie plateau. Dla porównania, miano uzyskiwane podczas przygotowywania lizatów fagowych (IV.12.7, 22-24h kultury) wahało się w granicach od 1×10^9 do 1×10^{10} pfu/ml.



Ryc. 2. Krzywa replikacji faga ΦAGATE

V.9. Izolacja fagowego DNA

Kolejnym etapem badań była izolacja fagowego DNA metodą opisaną w punkcie IV.12.13. Typowy obraz elektroforetycznego rozdziału oczyszczonego fagowego DNA przedstawia rycina 3Ryc. 3.

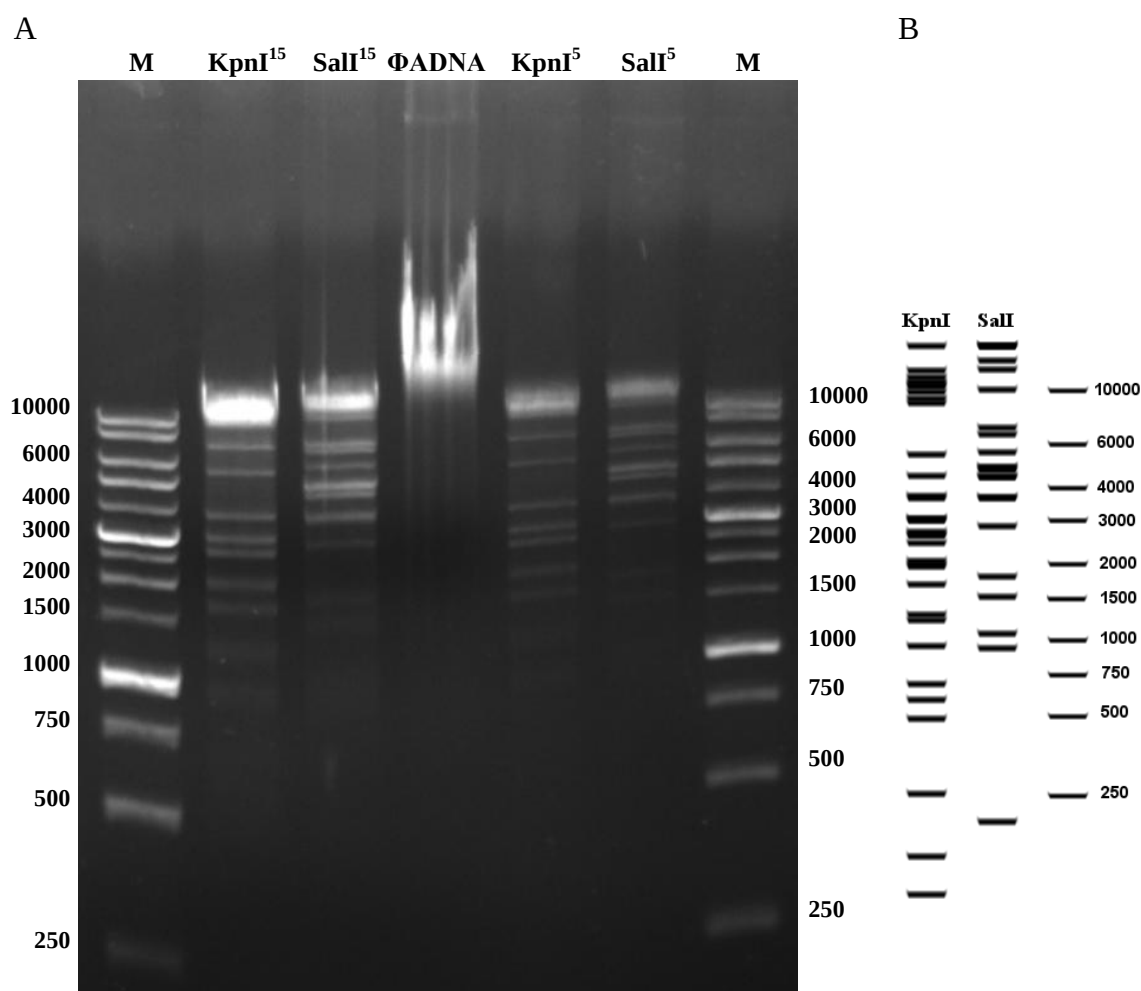


Ryc. 3. Rozdział elektroforetyczny fagowego DNA. W ścieżce pierwszej rozdzielano Marker mas pUC Mix 8 w pozostałych DNA wyizolowane z lizatów zawierających cząstki faga ΦAGATE.

V.10. Analiza wielkości fragmentów powstałych w wyniku trawienia restrykcyjnego genomowego DNA faga Φ AGATE

Fagowy DNA poddano trawieniu za pomocą enzymów *KpnI* oraz *SalI*, a następnie rozdzielano produkty trawienia restrykcyjnego w 1% żelu agarozowym. W obrazie rozdziału widocznych było 9 prążków odpowiadających fragmentom DNA powstałym w wyniku trawienia enzymem *KpnI* i 10 otrzymanych w wyniku trawienia enzymem *SalI*.

Obraz ten jest przedstawiony na rycinie 4, natomiast przewidywany i obserwowany rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych zamieszczono w tabeli 17.



Ryc. 4. Analiza wielkości fragmentów restrykcyjnych genomu faga Φ AGATE. W sekcji A przedstawiono rozdziel elektroforetyczny fragmentów powstałych w wyniku trawienia fagowego DNA enzymami *KpnI* (ścieżki 2 $KpnI^{15}$ i 5 $KpnI^5$) oraz *SalI* (ścieżki 3 $SalI^{15}$ i 6 $SalI^5$). Dla porównania do kieszonki 4 ($\Phi ADNA$) podano nietrawione fagowe DNA. Marker mas Nova 1kb DNA ladder. Po bokach fotografii podano wielkość (pz) fragmentów DNA wchodzących w skład markera. Sekcja B przedstawia obraz rozdziału *in silico* fragmentów restrykcyjnych przewidywanych na podstawie danych genomowych [96].

Nazwa enzymu	Wielkość fragmentu		Nazwa enzymu	Wielkość fragmentu		Nazwa enzymu	Wielkość fragmentu	
	Przewidywana	Obserwowana		Przewidywana	Obserwowana		Przewidywana	Obserwowana
KpnI	16219	>10Kpz	KpnI	2428	-	SalI	9836	-
KpnI	11751	>10Kpz	KpnI	2074	-	SalI	6944	~7kpz
KpnI	10962	>10Kpz	KpnI	2013	~2kpz	SalI	6523	~6kpz
KpnI	10520	>10Kpz	KpnI	1959	-	SalI	5566	-
KpnI	10227	>10Kpz	KpnI	1665	~1,5kpz	SalI	4862	~5kpz
KpnI	10171	>10Kpz	KpnI	1260	~1,2kpz	SalI	4803	-
KpnI	9633	-	KpnI	1202	-	SalI	4735	-
KpnI	9045	-	KpnI	953	~0,9kpz	SalI	4457	~4a5kpz
KpnI	8743	~8kpz	KpnI	672	-	SalI	4423	-
KpnI	5422	~5,5kpz	KpnI	580	-	SalI	3704	-
KpnI	4489	-	KpnI	486	-	SalI	3673	~3a5kpz
KpnI	3745	-	KpnI	246	-	SalI	2847	~3kpz
KpnI	3648	~3,5kpz	KpnI	136	-	SalI	1790	~1a9kpz
KpnI	3039	~3kpz	KpnI	96	-	SalI	1497	~1a5kpz
KpnI	3009	-	SalI	21328	>10kpz	SalI	1059	~1kpz
KpnI	2975	-	SalI	18489	>10kpz	SalI	936	-
KpnI	2692	-	SalI	14975	>10kpz	SalI	193	-
KpnI	2611	-	SalI	12870	>10kpz	-	-	-
KpnI	2608	~2,5kpz	SalI	11769	>10kpz	-	-	-

Tabela 17. Rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych powstałych w wyniku trawienia genomowego DNA faga ΦAGATE enzymami KpnI i SalI

V.11. Przygotowanie biblioteki fagowego DNA

Fragmenty fagowego DNA klonowano do wektora pBluescript II KS(-), a otrzymanymi konstruktami transformowano bakterie *E. coli* DH5α. Otrzymano 2 klony *E. coli* zawierające zrekombinowane plazmidy z fragmentami genomu faga powstałymi po trawieniu enzymem *KpnI* oraz 3 klony niosące konstrukty z produktami trawienia *SalI*. Łączna wielkość sekwencji otrzymanych w trakcie ich sekwencjonowania wyniosła 7737 pz. Charakterystykę otrzymanych fragmentów umieszczono w tabeli 18.

L.p	Użyty enzym	Wielkość (pz)	Pozycja w ostatecznym złożeniu genomu faga
1	Sal	3710	56301 - 52592
2	Sal	1796	58091 - 56296
3	Sal	1503	142229 - 140727
4	Kpn	586	5070 - 4485
5	Kpn	142	22808 - 22667

Tabela 18. Fragmenty fagowego DNA wchodzące w skład biblioteki

Wśród poznanych sekwencji wykryto obecność fragmentu podobnego do znanych genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład polimerów otoczki bakteryjnej (hydrolazy kwasu poli- γ -glutaminowego).

Dodatkowe dwa odcinki złożone z 135 oraz 148 bp otrzymano w trakcie prób amplifikacji i sekwencjonowania regionów, zakonserwowanych u *Caudovirales*.

V.12. Wydłużanie otrzymanych sekwencji

W celu pozyskania większej części sekwencji genomowego DNA faga Φ AGATE sekwencje zawarte w bibliotece i amplikonach wydłużano metodami opisanymi w punkcie IV.12.22. W trakcie realizacji tego zadania otrzymano 242 odczyty sekwencji DNA o łącznej wielkości 164369 pz pochodzące z:

- sekwencjonowania produktów PCR „z jednego startera”:
25 sekwencji - 10780 pz,
- sekwencjonowania produktów PCR uzyskanych metodą RSE:
38 sekwencji- 27246 pz,
- sekwencjonowania produktów PCR z prób łączenia znanych sekwencji 104 sekwencji - 83645 pz,
- sekwencjonowania bezpośrednio na matrycy genomowej:
84 sekwencji - 42415 pz.

Po usunięciu sekwencji pochodzących z przypadkowych amplikonów lub odczytów o słabej jakości i złożeniu pozostałych otrzymano 23 fragmenty genomu faga o łącznej długości 54593 pz.

V.13. Sekwencjonowanie całego genomu metodą 454

W celu poznania sekwencji całego genomu bakteriofaga Φ AGATE przeprowadzono sekwencjonowanie genomowe metodą 454 (Roche).

Po usunięciu błędnie odczytanych pozycji (których obecność związana jest z błędem metody) otrzymano sekwencję o łącznej wielkości 147175 pz o, średnim pokryciu 52,2 razy.

Sekwencję porównano i ponownie złożono ze znanymi wcześniej odcinkami pochodzącymi z sekwencjonowania biblioteki i produktów jej wydłużania. Pozwoliło to na uzyskanie sekwencji o wielkości 147282 pz i średnim pokryciu 52,7 razy.

V.14. Analiza struktury i anotacja genomu faga

Zastosowany do analizy genomu faga Φ AGATE program Geneious wykrył 1345 otwartych ramek odczytu (ORF) dłuższych niż 90 pz. Porównanie sekwencji otrzymanych przez ich automatyczną translację z bazą NR (non redundant) Protein (NCBI) ujawniło, że 81 otwartych ramek odczytu wykazuje znaczące podobieństwo do przynajmniej jednej, ze znanych sekwencji białkowych (wartość oczekiwana algorytmu BLASTp mniejsza niż $1e^{-20}$) a 46 z nich było podobnych do sekwencji o znanej funkcji. Ich przewidywana funkcja została określona na podstawie analizy 10 najwyżej punktowanych trafień algorytmu blast (o wartości oczekiwanej nie większej niż $1e^{-20}$) z uwzględnieniem informacji dostępnych w bazie Uniprot.

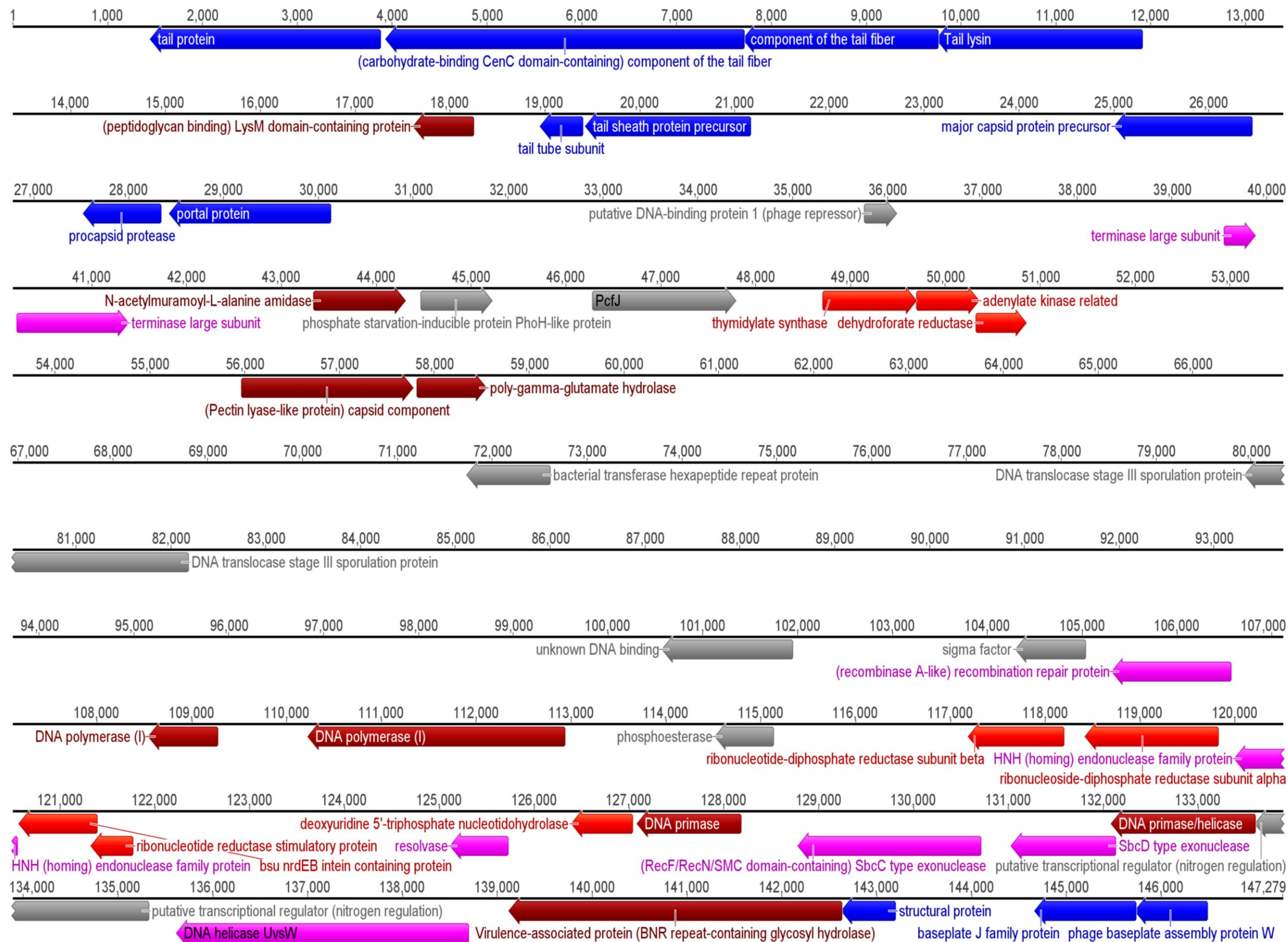
Wyniki anotacji genomu faga przedstawiono na rycinach 5 i 6 oraz w tabelach 19 i 22 (wraz z innymi danymi, strony 86-92)

L.p.	Numer ORF	Sekwencja podobna	Punktacja	Wartość oczekiwana	L.p.	Numer ORF	Sekwencja podobna	Punktacja	Wartość oczekiwana
1	209	ZP_00782398	100.523	6.05e-23	42	933	AEW47169	343.199	4.80e-107
2	213	AEW47009	89.7373	3.75e-21	43	936	AEW47168	175.637	8.29e-53
3	224	AEW47018	155.606	1.08e-45	44	939	AEW47165	269.626	7.43e-82
4	228	AEW47019	163.696	1.26e-45	45	941	ACU27400	461.07	2.51e-157
5	233	AAS45252	618.616	0	46	944	AEW47161	141.354	8.88e-41
6	237	YP_001468455	127.102	1.49e-31	47	945	AEW47160	238.81	1.00e-75
7	240	YP_004957267	137.887	2.10e-36	48	952	AEW47157	278.485	2.92e-88
8	244	ADF97529	161.77	1.35e-43	49	959	YP_001468528	366.696	1.62e-119
9	246	AEW47025	291.582	3.94e-96	50	965	AEW47141	169.474	2.79e-49
10	250	AEW47027	335.109	7.32e-106	51	971	AEW47133	351.673	1.19e-119
11	253	AEO93390	171.014	2.59e-50	52	972	AEW47132	155.992	1.63e-44
12	257	BAI49171	385.956	9.79e-131	53	973	AEW47131	167.933	1.94e-49
13	260	AEW47030	166.392	4.60e-48	54	974	AEW47129	118.242	4.55e-28
14	262	BAI49173	183.726	5.92e-56	55	979	AEW47119	98.5969	8.78e-22
15	283	BAI49175	653.284	0	56	1006	AEW47113	398.667	1.97e-134
16	290	BAC65290	182.956	4.86e-54	57	1011	AEW47109	95.1301	2.38e-21
17	816	AEW47202	172.94	2.41e-51	58	1012	AEW47108	347.821	2.47e-113
18	817	AEW47201	307.76	3.44e-102	59	1016	AEW47107	748.043	0
19	819	AEW47200	478.404	5.80e-166	60	1035	AEW47128	315.079	3.16e-105
20	821	AEW47199	223.016	6.29e-65	61	1036	AEW47127	187.578	1.18e-57
21	825	YP_001468485	179.489	6.70e-54	62	1046	ZP_07627413	161.77	1.50e-44
22	826	AEW47198	1397.1	0	63	1237	AEW47013	91.2781	2.52e-21
23	836	YP_238583	745.732	0	64	1238	AEW47012	109.383	1.57e-28
24	845	AEW47194	536.954	0	65	1264	ZP_08000016	160.229	1.96e-46
25	850	AEW47192	640.188	0	66	1271	AEW47232	796.579	0
26	856	AEW47191	344.354	4.41e-113	67	1274	AEW47230	311.612	3.92e-103
27	860	AEW47190	621.698	0	68	1279	AEW47228	657.522	0
28	866	AEW47188	374.4	7.21e-125	69	1285	AEW47226	402.519	8.25e-138
29	868	AEW47185	186.422	8.72e-56	70	1288	AEW47225	333.183	2.46e-111
30	873	AAV53357	182.956	1.00e-54	71	1290	AEW47224	278.485	2.63e-91
31	890	YP_005540964	108.227	2.84e-27	72	1293	AEW47223	308.916	2.68e-101
32	892	ZP_03591761	151.369	3.34e-44	73	1296	AEW47221	795.038	0
33	894	ZP_07999929	431.409	1.41e-150	74	1298	AEW47220	264.233	3.18e-88
34	897	YP_005546010	201.83	4.36e-62	75	1302	YP_005494407	165.622	6.99e-47
35	898	YP_001486871	804.283	0	76	1309	YP_004957042	144.05	3.05e-41
36	906	EHA30663	532.332	0	77	1311	AEW47214	201.06	5.82e-62
37	909	YP_005563595	188.734	2.74e-57	78	1326	AEW47212	891.338	0
38	911	ZP_09077123	88.9669	1.88e-21	79	1330	AEW47211	673.7	0
39	914	ZP_09452017	139.428	8.83e-38	80	1334	AEW47208	639.417	0
40	917	AEW47172	387.111	3.71e-133	81	1339	YP_001504141	314.694	3.86e-91
41	921	AEW47169	932.554	0	-	-	-	-	-

Tabela 19. Sekwencje z bazy NR Protein podobne do otwartych ramek odczytu zlokalizowanych w genomie faga Φ AGATE [99].



Ryc. 5. Rozkład sekwencji podobnych do zdeponowanych w bazie NR Protein (NCBI) w genomie faga ΦAGATE [96]



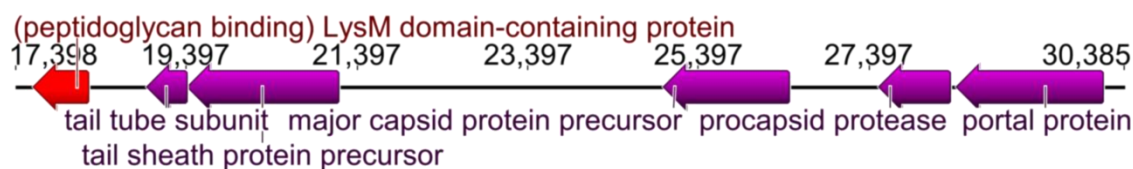
Ryc. 6. Przewidywane funkcje wybranych białek kodowanych w genomie faga Φ AGATE [96]

Geny, kodujące białka o podobnej przewidywanej funkcji biologicznej tworzą w genomie faga ΦAGATE zespoły zlokalizowanych w pobliżu siebie sekwencji. Sugeruje to, że mogą być one zorganizowane w operony. Pięć takich regionów przedstawiono na rycinie 7.

Region 1 - sekwencje kodujące białka zaangażowane w składanie i wirionów i lizę komórki gospodarza



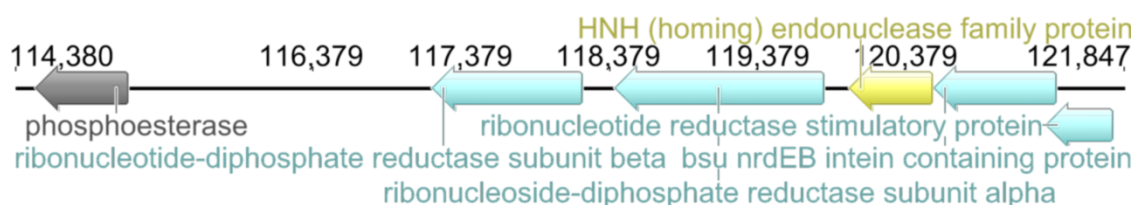
Region 2 - sekwencje kodujące białka zaangażowane w składanie i wirionów i lizę komórki gospodarza



Region 3 - sekwencje kodujące białka zaangażowane w metabolizm nukleotydów



Region 4 - sekwencje kodujące białka zaangażowane w metabolizm nukleotydów



Region 5 - sekwencje kodujące białka zaangażowane w składanie i wirionów i lizę komórki gospodarza

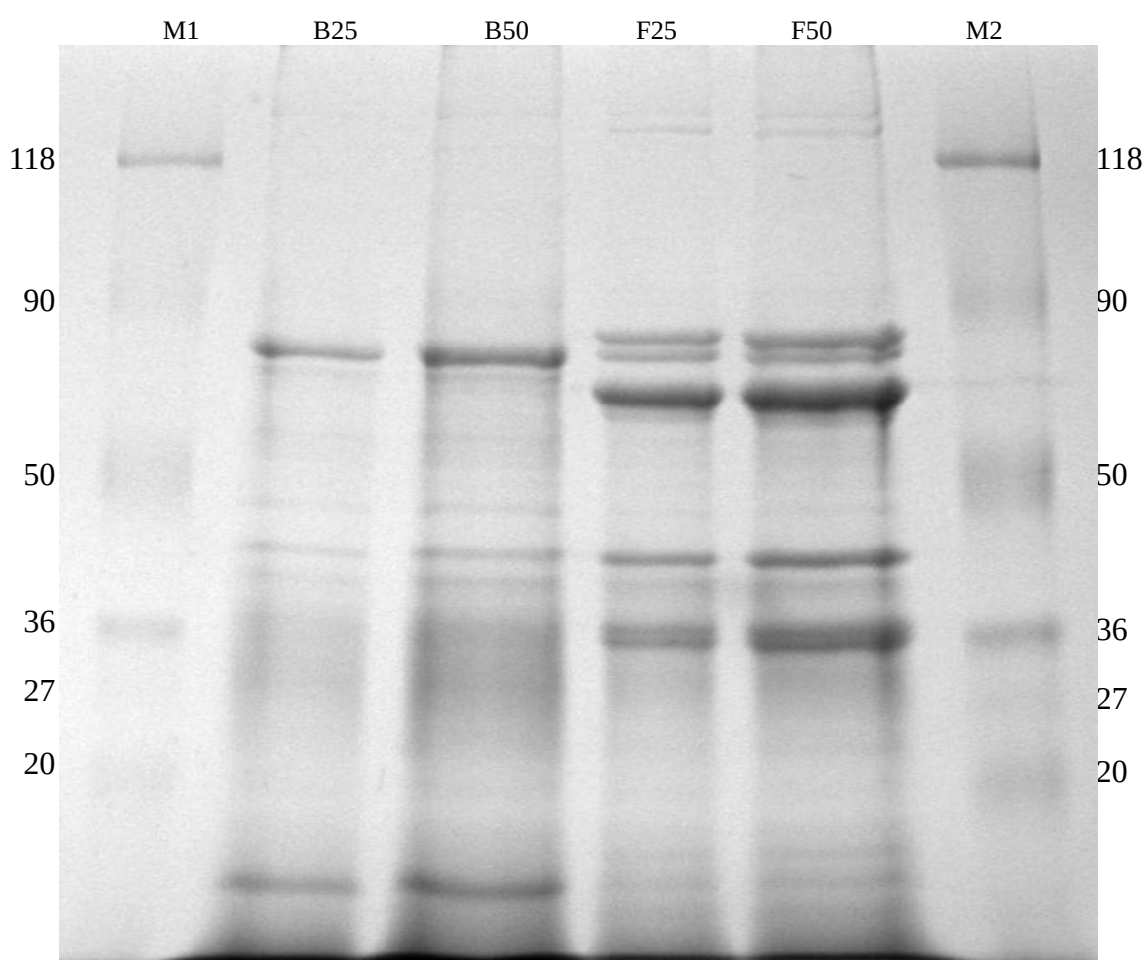


Ryc. 7. Regiony funkcjonalne w genomie bakteriofaga ΦAGATE

Również wyniki analizy wykonanej za pomocą narzędzia FGENESB (SoftBerry) [100] wskazują na obecność operonów w badanych sekwencjach. Regiony 1 i 3 zostały przez ten program zaklasyfikowane jako pojedyncze operony, natomiast 2, 4 oraz 5 podzielone na mniejsze (lecz wciąż wielogenowe) jednostki transkrypcyjne.

V.15. Rozdział białek z zakażonych i niezakażonych kultur *B. pumilus* w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (PAGE)

Po poznaniu struktury genomu faga Φ AGATE przystąpiono do analizy jego proteomu. Pierwszym jej etapem było wykonanie rozdzielów elektroforetycznych całkowitego białka z kultur *Bacillus pumilus* zakażonych fagiem Φ AGATE i niezakażonych. Obrazy rozdziału przedstawiono na rycinie 8. Wzór prążków odpowiadających frakcjom białkowym różnił się znacznie między próbami z kultur zakażonych i niezakażonych. Zaobserwowano 6 prążków (frakcji) charakterystycznych jedynie dla prób zakażonych fagiem Φ AGATE (o przewidywanych masach cząsteczkowych około 124, 79, 65, 36, 34 i 14 kDa).



Ryc. 8. Obraz rozdziału elektroforetycznego białek z zakażonych i niezakażonych kultur w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. M1 i M2 marker mas SM0441, B25 25 μ g całkowitego białka bakteryjnego, B50 50 μ g całkowitego białka bakteryjnego, F25 25 μ g całkowitego białka fagowego, f50 50 μ g całkowitego białka fagowego. Po bokach fotografii podano wielkość (kDa) białek wchodzących w skład markera

V.16. Elektroforeza dwukierunkowa białek z zakażonych i niezakażonych kultur *B. pumilus*

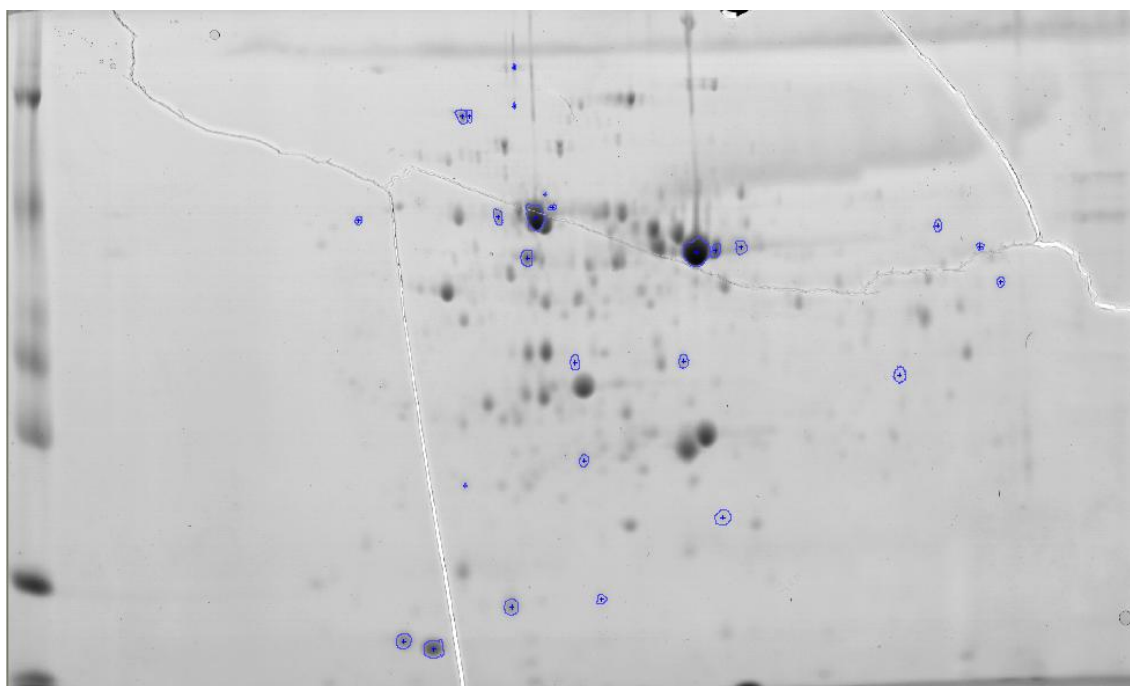
Kolejnym etapem analizy proteomu faga ΦAGATE była elektroforeza dwukierunkowa białek z zakażonych i niezakażonych kultur. Ich rozdział, barwienie oraz analizę wyników przeprowadzono według procedury opisanej w punkcie IV.12.33.

Analiza ta ujawniła znaczne różnice w profilach białek wyizolowanych z zakażonych i niezakażonych kultur. W trakcie analizy odrzucono plamki (frakcje) o średniej znormalizowanej objętości (w żelach, w których rozdzielano białko z kultur zakażonych) mniejszej niż 0,05, a także te, które występowały w mniej, niż dwóch powtórzeniach. Jako plamki, których obecność związana jest z infekcją fagowa, wybrano te, których średnia znormalizowana objętość wzrastała przynajmniej pięciokrotnie (8 plamek), lub też te, które nie miały odpowiedników w żelach, w których rozdzielano białka z kultur niezakażonych (20 plamek).

Numer plamki	Znormalizowana objętość						Średnia		Stosunek BP+fag/Bp
	Żel Bp1	Żel Bp2	Żel Bp3	Żel Bp+fag1	Żel Bp+fag2	Żel Bp+fag3	Bp1	Bp+fag1	
44	0	0	0,01	0,1	0,21	0,97	0,003	0,11	141,67
154	0	0	0,01	0,15	-	0,31	0,004	0,05	37,67
45	0,2	0,25	0,3	4,87	8,72	6,66	0,25	4,63	27,1
163	0	0,29	0,12	0,47	0,88	1,31	0,14	0,49	6,41
58	0	0,07	0,03	0,02	0,06	0,47	0,03	0,04	5,94
30	0	0,02	0,05	0,09	0,21	0,1	0,02	0,11	5,58
146	0	0	0,09	0,2	0,05	0,23	0,03	0,11	5,1
114	0	0	0,07	0,04	0,04	0,29	0,02	0,05	5,08
187	-	-	-	7,76	9,69	13,48	-	8,72	-
173	-	-	-	1,25	1,37	3,2	-	1,31	-
174	-	-	-	0,49	2,89	0,91	-	1,69	-
197	-	-	-	0,42	0,62	0,91	-	0,52	-
175	-	-	-	0,57	0,28	0,63	-	0,43	-
188	-	-	-	0,18	0,37	0,78	-	0,28	-
194	-	-	-	0,23	0,37	0,7	-	0,3	-
182	-	-	-	0,21	0,12	0,47	-	0,16	-
198	-	-	-	0,16	0,15	0,25	-	0,16	-
181	-	-	-	0,12	0,11	0,23	-	0,12	-
166	-	-	-	0,2	0,2	0,06	-	0,2	-
191	-	-	-	0,09	0,03	0,21	-	0,06	-
165	-	-	-	0,11	-	0,1	-	0,06	-
190	-	-	-	-	0,12	0,08	-	0,06	-
169	-	-	-	0,11	0,04	0,05	-	0,08	-
193	-	-	-	0,07	-	0,13	-	0,03	-
186	-	-	-	0,07	0,03	0,09	-	0,05	-
196	-	-	-	-	0,17	0,01	-	0,09	-
177	-	-	-	0,05	0,11	0,01	-	0,08	-

Tabela 20. Wyniki analizy profili białkowych z kultur *Bacillus pumilus* zakażonych i niezakażonych fagiem ΦAGATE: białka związane z obecnością faga.

a



b



Ryc. 9. a. i 9. b. Rozdział białek z zakażonych (a) i niezakażonych (b) fagiem Φ AGATE kultur *Bacillus pumilus* przeprowadzony metodą elektroforezy dwukierunkowej. Kolorem niebieskim oznaczono plamki których obecność związana jest z infekcją fagową. Marker mas SM0431.

V.17. Identyfikacja białek fagowych na podstawie profilu peptydów otrzymanego metodą spektrometrii mas

Białka z zakażonych i niezakażonych fagiem Φ AGATE kultur *B. pumilus* były strącane siarczanem amonu przy nasyceniu 50%, 60% i 80% (lub strącaniu za pomocą roztworu PEG-8000 patrz IV.12.29 i IV.12.30). Następnie oczyszczano je, trawiono trypsyną i badano metoda tandemowej spektrometrii mas (LC-ESI-MS/MS).

W czterech badanych próbach zawierających białko z kultur zakażonych fagiem Φ AGATE zidentyfikowano łącznie 57 białek. W próbach kontrolnych (białko z kultur niezakażonych) tylko dla jednej z sekwencji fagowych (ORF_244) przekroczona została progowa wartość punktacji programu Mascot (50). Otrzymana ilość punktów była jednak znacznie niższa od punktacji jakie polipeptyd ten uzyskał w próbach fagowych. Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 21.

Białko strącane 50% NH ₄ SO ₄			Białko strącane 60% NH ₄ SO ₄			Białko strącane 80% NH ₄ SO ₄			Białko wytrącane PEG 8000*		
ORF	punktacja		ORF	punktacja		ORF	punktacja		ORF	punktacja	
1 ORF_1296	13259		1 ORF_1296	9283		1 ORF_1279	4355		1 ORF_1279	75199	
2 ORF_1279	9661		2 ORF_1279	5499		2 ORF_1296	4252		2 ORF_1296	59298	
3 ORF_949	4078		3 ORF_949	2036		3 ORF_244	2056		3 ORF_949	8307	
4 ORF_826	1875		4 ORF_826	1483		4 ORF_826	1151		4 ORF_826	5965	
5 ORF_1271	602		5 ORF_1309	490		5 ORF_949	1041		5 ORF_1298	4596	
6 ORF_1298	489		6 ORF_1275	380		6 ORF_1275	880		6 ORF_1314	1510	
7 ORF_939	488		7 ORF_939	374		7 ORF_1283	739		7 ORF_1271	822	
8 ORF_1309	428		8 ORF_244	367		8 ORF_1302	467		8 ORF_244	788	
9 ORF_244	418		9 ORF_816	339		9 ORF_1309	437		9 ORF_819	746	
10 ORF_941	411		10 ORF_240	302		10 ORF_247	354		10 ORF_816	681	
11 ORF_1341	394		11 ORF_1302	264		11 ORF_1341	331		11 ORF_821	621	
12 ORF_816	368		12 ORF_1271	258		12 ORF_825	316		12 ORF_817	529	
13 ORF_1062	311		13 ORF_948	214		13 ORF_939	296		13 ORF_825	481	
14 ORF_1334	297		14 ORF_959	198		14 ORF_290	295		14 ORF_1326	449	
15 ORF_821	292		15 ORF_821	185		15 ORF_959	270		15 ORF_948	444	
16 ORF_240	271		16 ORF_864	178		16 ORF_1238	258		16 ORF_1239	414	
17 ORF_959	234		17 ORF_1239	161		17 ORF_948	248		17 ORF_1285	410	
18 ORF_1339	229		18 ORF_1285	150		18 ORF_1062	244		18 ORF_1274	399	
19 ORF_1239	225		19 ORF_247	136		19 ORF_913	238		19 ORF_1238	327	
20 ORF_1274	225		20 ORF_1264	136		20 ORF_816	229		20 ORF_939	318	
21 ORF_819	204		21 ORF_257	132		21 ORF_979	227		21 ORF_240	180	
22 ORF_1238	185		22 ORF_979	131		22 ORF_1298	209		22 ORF_941	157	
23 ORF_864	171		23 ORF_1238	125		23 ORF_1271	207		23 ORF_959	142	
24 ORF_1285	169		24 ORF_1255	109		24 ORF_257	184		24 ORF_1293	137	
25 ORF_825	166		25 ORF_1298	107		25 ORF_1274	176		25 ORF_950	116	
26 ORF_1314	162		26 ORF_1274	99		26 ORF_1343	174		26 ORF_906	114	
27 ORF_1275	150		27 ORF_1341	97		27 ORF_1264	170		27 ORF_1343	93	
28 ORF_948	128		28 ORF_1283	88		28 ORF_1239	156		28 ORF_868	80	
29 ORF_1326	125		29 ORF_941	85		29 ORF_883	148		29 ORF_1002	73	
30 ORF_1343	121		30 ORF_825	85		30 ORF_864	113		30 ORF_974	70	
31 ORF_817	109		31 ORF_1326	75		31 ORF_1314	113		31 ORF_1302	68	
32 ORF_257	80		32 ORF_950	73		32 ORF_240	105		32 ORF_1334	62	
33 ORF_974	78		33 ORF_1002	68		33 ORF_871	102		33 ORF_1036	61	
34 ORF_950	69		34 ORF_968	67		34 ORF_819	98		34 ORF_1275	51	
35 ORF_1255	68		35 ORF_819	63		35 ORF_1237	81	-	-	-	
36 ORF_1264	63		36 ORF_1343	63		36 ORF_1002	78	-	-	-	
37 ORF_1293	63		37 ORF_1102	63		37 ORF_1285	77	-	-	-	
38 ORF_247	56		38 ORF_836	56		38 ORF_870	67	-	-	-	
39 ORF_968	55	-	-	-		39 ORF_1339	67	-	-	-	
40 ORF_1302	53	-	-	-		40 ORF_950	65	-	-	-	
-	-	-	-	-		41 ORF_1255	64	-	-	-	
-	-	-	-	-		42 ORF_1102	64	-	-	-	
-	-	-	-	-		43 ORF_260	63	-	-	-	
-	-	-	-	-		44 ORF_974	58	-	-	-	
-	-	-	-	-		45 ORF_850	58	-	-	-	
-	-	-	-	-		46 ORF_821	57	-	-	-	
-	-	-	-	-		47 ORF_941	55	-	-	-	
-	-	-	-	-		48 ORF_1103	50	-	-	-	

Tabela 21. Białka fagowe zidentyfikowane na podstawie profilu peptydów uzyskanego metodą spektrometrii mas

L.p.	ORF	Początek	Koniec	Wiekłość (pz)	Orientacja	Najbardziej podobna sekwencja w bazie Protein (NCBI)	Przewidywana funkcja	Punktacja (Mascot)
1	1343	649	933	285	odwrócona	-	-	174
2	1341	977	1516	540	odwrócona	-	-	394
3	1339	1458	3860	2403	odwrócona	YP_001504141,putative minor structural protein [Enterococcus phage phiEF24C]	Białko ogonka	229
4	1334	3940	7695	3756	odwrócona	AEW47208,putative minor structural protein 2 [Bacillus phage BCP78]	Oddziałujące z cukrowcami białko ogonka	297
5	1330	7709	9745	2037	odwrócona	AEW47211,putative tail fiber [Bacillus phage BCP78]	Białko włukienka ogonka	-
6	1326	9752	11896	2145	odwrócona	AEW47212,putative tail lysin 1 [Bacillus phage BCP78]	Lizyna związana z nóżką	449
7	1314	11998	15750	3753	odwrócona	-	-	1510
8	1311	15801	16391	591	odwrócona	AEW47214,hypothetical protein BCP78_0207 [Bacillus phage BCP78]	-	-
9	1309	16438	16845	408	odwrócona	YP_004957042,unnamed protein product [Bacillus phage W.Ph.]	-	490
10	1302	17623	18231	609	odwrócona	AEN89098,3D domain protein [Bacillus megaterium WSH-002]	Białko wiążące peptydoglikan zawierające domenę LysM	467
11	1298	18959	19384	426	odwrócona	AEW47220,hypothetical protein BCP78_0213 [Bacillus phage BCP78]	Białko rdzenia nóżki	4596
12	1296	19436	21151	1716	odwrócona	AEW47221,putative tail sheath protein [Bacillus phage BCP78]	Białko osłonki nóżki	59298
13	1293	21429	22301	873	odwrócona	AEW47223,hypothetical protein BCP78_0216 [Bacillus phage BCP78]	-	137
14	1290	22308	23015	708	odwrócona	AEW47224,hypothetical protein BCP78_0217 [Bacillus phage BCP78]	-	-
15	1288	22933	23778	846	odwrócona	AEW47225,hypothetical protein BCP78_0218 [Bacillus phage BCP78]	-	-
16	1285	23792	24691	900	odwrócona	AEW47226,hypothetical protein BCP78_0219 [Bacillus phage BCP78]	-	410
17	1283	24688	24933	246	odwrócona	-	-	739
18	1279	25015	26439	1425	odwrócona	AEW47228,putative major capsid protein [Bacillus phage BCP78]	główne białko kapsydu	75199

Tabela 22. Podsumowanie anotacji genomu i wyników spektrometrii mas

L.p.	ORF	Początek	Koniec	Wiekłość (pz)	Orientacja	Najbardziej podobna sekwencja w bazie Protein (NCBI)	Przewidywana funkcja	Punktacja (Mascot)
19	1275	26569	27528	960	odwrócona	-	-	880
20	1274	27533	28324	792	odwrócona	AEW47230,putative prohead protease [Bacillus phage BCP78]	Proteaza prokapsydu	399
21	1271	28441	30117	1677	odwrócona	AEW47232,putative portal protein [Bacillus phage BCP78]	Białko portalu	822
22	1264	31582	32148	567	odwrócona	ZP_08000016,hypothetical protein HMPREF1012_01050 [Bacillus sp. BT1B_CT2]	-	170
23	1255	33274	33675	402	odwrócona	-	-	109
24	209	34992	35597	606	prosta	YP_005148157,unnamed protein product [Clostridium sp. BNL1100]	-	-
25	210	35015	35128	114	prosta	-	-	354
26	213	35765	36085	321	prosta	AEW47009,putative DNA-binding protein 1 [Bacillus phage BCP78]	Białko wiążące DNA (pełna funkcja nie jest znana)	-
27	1239	36111	36347	237	odwrócona	-	-	414
28	1238	36370	36696	327	odwrócona	AEW47012,hypothetical protein BCP78_0005 [Bacillus phage BCP78]	-	327
29	1237	36723	37073	351	odwrócona	AEW47013,hypothetical protein BCP78_0006 [Bacillus phage BCP78]	-	81
30	224	38522	38947	426	prosta	AEW47018,hypothetical protein BCP78_0011 [Bacillus phage BCP78]	-	-
31	228	39560	39865	306	prosta	AEW47019,terminase large subunit [Bacillus phage BCP78]	Duża podjednostka terminazy	-
32	233	40224	41369	1146	prosta	AAS45252,large terminase [Bacillus phage 1102phi1-3]	Duża podjednostka terminazy	-
33	237	41491	42291	801	prosta	YP_001468455,gp75 [Listeria phage A511]	-	-

Tabela 22. Podsumowanie anotacji genomu i wyników spektrometrii mas c.d.

L.p.	ORF	Początek	Koniec	Wiekłość (pz)	Orientacja	Najbardziej podobna sekwencja w bazie Protein (NCBI)	Przewidywana funkcja	Punktacja (Mascot)
34	240	42278	42967	690	prosta	YP_004957267,unnamed protein product [Bacillus phage W.Ph.]	-	302
35	244	43352	44293	942	prosta	ADF97529,PlyM4 [uncultured phage]	amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa	2056
36	246	44482	45210	729	prosta	AEW47025,phoH-like protein [Bacillus phage BCP78]	Białko indukowane głodem podobne do białka PhoH	-
37	250	46290	47777	1488	prosta	AEW47027,hypothetical protein BCP78_0020 [Bacillus phage BCP78]		-
38	253	47863	48414	552	prosta	AEO93390,gp128 [Bacillus phage G]	-	-
39	257	48718	49683	966	prosta	BAI49171,hypothetical protein [Bacillus phage phiNIT1]	Syntaza tymidylanowa	184
40	260	49705	50340	636	prosta	AEW47030,putative adenylate kinase-like protein [Bacillus phage BCP78]	Białko podobne do kinazy adenylanowej	63
41	262	50337	50840	504	prosta	BAI49173,hypothetical protein [Bacillus phage phiNIT1]	Reduktaza dihydrofolianu	-
42	283	55981	57759	1779	prosta	BAI49175,hypothetical protein [Bacillus phage phiNIT1]	Związane z wirionem białko podobne do liazy pektyn	-
43	290	57831	58535	705	prosta	BAC65290,poly-gamma-glutamate hydrolase [Bacillus phage phiNIT1]	hydrolaza kwasu poli-γ-glutaminowego	295
44	1103	59734	60054	321	odwrócona	-	-	50
45	1102	60115	60510	396	odwrócona	-	-	64
46	1062	68155	68697	543	odwrócona	-	-	311
47	1046	71740	72594	855	odwrócona	ZP_07627413, bacterial transferase hexapeptide repeat protein [Prevotella amnii CRIS 21A-A]	Acylotransferaza zawierająca powtórzenia heksapeptydu	-
48	1036	75487	75963	477	odwrócona	AEW47127,hypothetical protein BCP78_0120 [Bacillus phage BCP78]	-	61

Tabela 22. Podsumowanie anotacji genomu i wyników spektrometrii mas c.d.

L.p.	ORF	Początek	Koniec	Wiekłość (pz)	Orientacja	Najbardziej podobna sekwencja w bazie Protein (NCBI)	Przewidywana funkcja	Punktacja (Mascot)
49	1035	75978	76700	723	odwrócona	AEW47128,hypothetical protein BCP78_0121 [Bacillus phage BCP78]	-	-
50	1016	79941	82169	2229	odwrócona	AEW47107,putative DNA translocase stage III sporulation protein [Bacillus phage BCP78]	Białko wiążące DNA (pełna funkcja nie jest znana)	-
51	1012	82289	83650	1362	odwrócona	AEW47108,hypothetical protein BCP78_0101 [Bacillus phage BCP78]	-	-
52	1011	83413	83982	570	odwrócona	AEW47109,hypothetical protein BCP78_0102 [Bacillus phage BCP78]	-	-
53	1006	85234	86280	1047	odwrócona	AEW47113,hypothetical protein BCP78_0106 [Bacillus phage BCP78]	-	-
54	996	88204	88389	186	odwrócona	-	-	78
55	979	92736	93371	636	odwrócona	AEW47119,hypothetical protein BCP78_0112 [Bacillus phage BCP78]	-	227
56	974	94986	95840	855	odwrócona	AEW47129,hypothetical protein BCP78_0122 [Bacillus phage BCP78]	-	78
57	973	95840	96370	531	odwrócona	AEW47131,hypothetical protein BCP78_0124 [Bacillus phage BCP78]	-	-
58	972	96478	97065	588	odwrócona	AEW47132,hypothetical protein BCP78_0125 [Bacillus phage BCP78]	-	-
59	971	97137	97859	723	odwrócona	AEW47133,hypothetical protein BCP78_0126 [Bacillus phage BCP78]	-	-
60	965	99307	99921	615	odwrócona	AEW47141,hypothetical protein BCP78_0134 [Bacillus phage BCP78]	-	-
61	959	100579	101934	1356	odwrócona	YP_001468528,gp148 [Listeria phage A511]	Białko wiążące DNA (pełna funkcja nie jest znana)	270

Tabela 22. Podsumowanie anotacji genomu i wyników spektrometrii mas c.d.

L.p.	ORF	Początek	Koniec	Wiekłość (pz)	Orientacja	Najbardziej podobna sekwencja w bazie Protein (NCBI)	Przewidywana funkcja	Punktacja (Mascot)
62	952	102263	103285	1023	odwrócona	AEW47157,hypothetical protein BCP78_0150 [Bacillus phage BCP78]	-	-
63	956	102435	102548	114	odwrócona	-	-	67
64	945	104307	105020	714	odwrócona	AEW47160,putative sigma factor [Bacillus phage BCP78]	Czynnik sigma	-
65	944	104923	105279	357	odwrócona	AEW47161,hypothetical protein BCP78_0154 [Bacillus phage BCP78]	-	-
66	941	105326	106555	1230	odwrócona	ACU27400,recombination repair protein [Bacillus phage Bcp1]	Rekombinaza podobna do rekombinazy A	411
67	939	106619	107869	1251	odwrócona	AEW47165,hypothetical protein BCP78_0158 [Bacillus phage BCP78]	-	488
68	936	107969	108454	486	odwrócona	AEW47168,hypothetical protein BCP78_0161 [Bacillus phage BCP78]	-	-
69	933	108553	109257	705	odwrócona	AEW47169,putative DNA polymerase 2 [Bacillus phage BCP78]	Polimeraza DNA podobna do polimerazy I	-
70	931	109622	110158	537	odwrócona	-	-	116
71	930	110092	110199	108	odwrócona	-	-	8307
72	921	110233	112920	2688	odwrócona	AEW47169,putative DNA polymerase 2 [Bacillus phage BCP78]	Polimeraza DNA podobna do polimerazy I	-
73	929	110283	110417	135	odwrócona	-	-	444
74	917	113265	114023	759	odwrócona	AEW47172,hypothetical protein BCP78_0165 [Bacillus phage BCP78]	-	-
75	914	114524	115120	597	odwrócona	YP_001843367,phosphoesterase [Lactobacillus fermentum IFO 3956]	fosfoesteraza	-
76	911	115769	116005	237	odwrócona	ZP_09077123,hypothetical protein PelgB_21842 [Paenibacillus elgii B69]	-	-

Tabela 22. Podsumowanie anotacji genomu i wyników spektrometrii mas c.d.

L.p.	ORF	Początek	Koniec	Wiekłość (pz)	Orientacja	Najbardziej podobna sekwencja w bazie Protein (NCBI)	Przewidywana funkcja	Punktacja (Mascot)
77	909	115995	116588	594	odwrócona	ADY24959,hypothetical protein YBT020_29026 [Bacillus thuringiensis serovar finitimus YBT-020]	-	-
78	906	117199	118179	981	odwrócona	EHA30663,hypothetical protein BSSC8_22480 [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SC-8]	Podjednostka beta Reduktazy rybonukleotydowej	114
79	898	118428	119810	1383	odwrócona	YP_001486871,nrdE gene product [Bacillus pumilus SAFR-032]	Podjednostka alfa Reduktazy rybonukleotydowej	-
80	897	120007	120537	531	odwrócona	AEB63782,HNH endonuclease family protein [Bacillus amyloliquefaciens LL3]	HNH „homing” endonukleaza	-
81	894	120577	121374	798	odwrócona	ZP_07999929,bsu nrdEB intein containing protein [Bacillus sp. BT1B_CT2]	Zawierające inteinę Białko podobne do podjednostki beta reduktazy dihydrofolianu	-
82	892	121337	121753	417	odwrócona	ZP_03591761, ribonucleotide reductase stimulatory protein [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]	Białko stymulujące działanie reduktazy rybonukleotydów	-
83	890	121850	122398	549	odwrócona	AEB23471,hypothetical protein BAMTA208_06480 [Bacillus amyloliquefaciens TA208]	-	-
84	888	122411	122764	354	odwrócona	-	-	238
85	873	125127	125708	582	odwrócona	AAV53357,gp54 [Listeria phage P100]	Rezolwaza	-
86	868	126405	127022	618	odwrócona	AEW47185,putative deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase [Bacillus phage BCP78]	Difosfaraza deoksyurydyno-5'trifosforanu	80
87	866	127094	128164	1071	odwrócona	AEW47188,putative DNA primase [Bacillus phage BCP78]	DNA prymaza	-
88	860	128791	130695	1905	odwrócona	AEW47190,putative exonuclease [Bacillus phage BCP78]	Egzonukleaza podobna do nukleazy SbcC	-

Tabela 22. Podsumowanie anotacji genomu i wyników spektrometrii mas c.d.

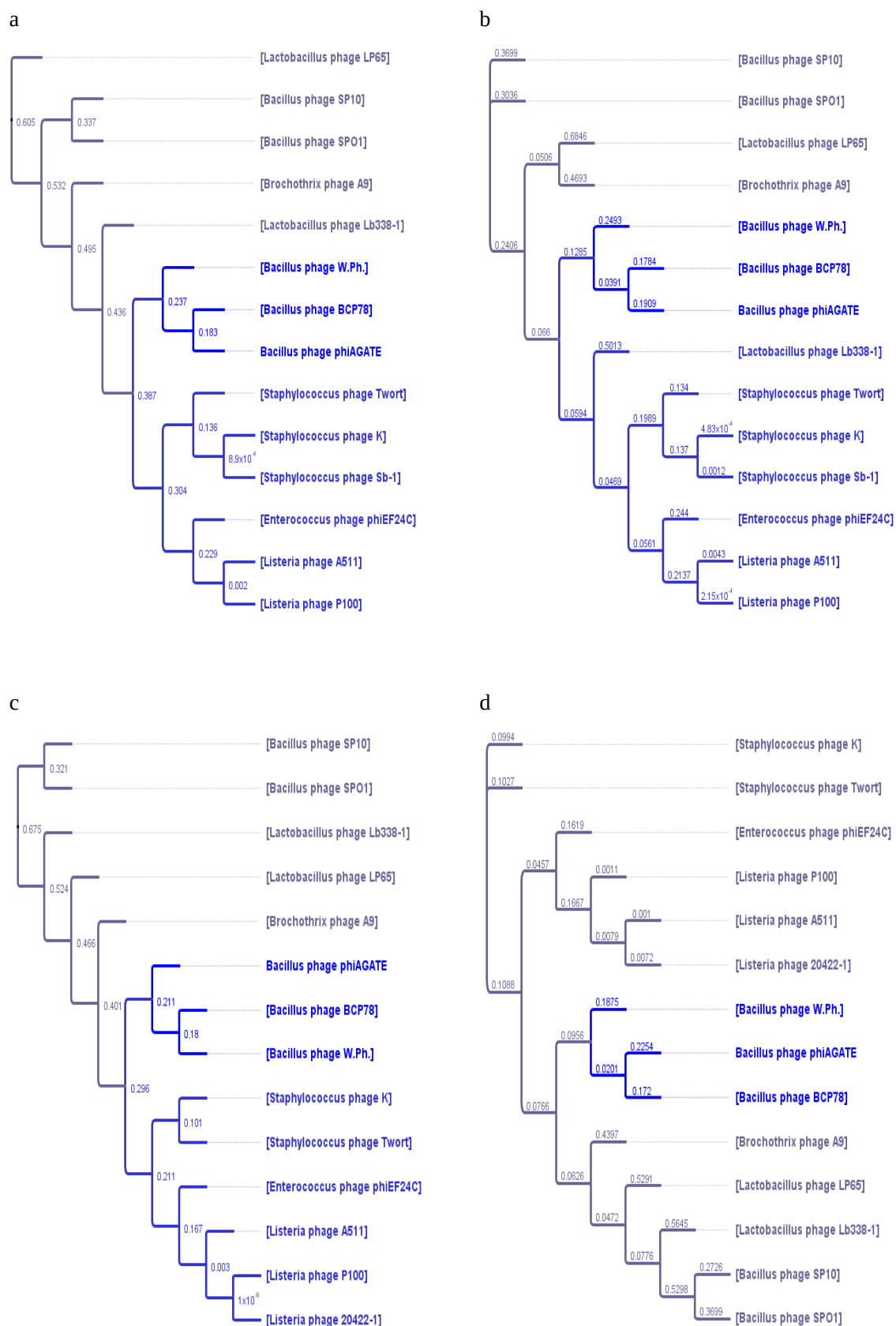
L.p.	ORF	Początek	Koniec	Wiekłość (pz)	Orientacja	Najbardziej podobna sekwencja w bazie Protein (NCBI)	Przewidywana funkcja	Punktacja (Mascot)
89	856	131037	132113	1077	odwrócona	AEW47191,putative nuclease SbcCD D subunit [Bacillus phage BCP78]	Egzonukleaza typu SbcD	-
90	850	132094	133590	1497	odwrócona	AEW47192,putative DNA helicase [Bacillus phage BCP78]	DNA prymaza/helikaza	58
91	853	132993	133154	162	odwrócona	-	-	148
92	845	133609	135309	1701	odwrócona	AEW47194,putative transcriptional regulator [Bacillus phage BCP78]	Czynnik transkrypcyjny	-
93	836	135626	138682	3057	odwrócona	YP_238583,ORF006 [Staphylococcus phage Twort]	ATP-zależna helikaza DNA biorąca udział w rekombinacji (UvsW)	56
94	839	137838	137963	126	odwrócona	-	-	102
95	838	138066	138185	120	odwrócona	-	-	67
96	826	139134	142619	3486	odwrócona	AEW47198,putative adsorption associated tail protein [Bacillus phage BCP78]	Związana z zjadliwością glikozylaza zawierająca powtórzenia BNR	5965
97	832	139214	139339	126	odwrócona	-	-	178
98	825	142634	143182	549	odwrócona	YP_001468485,gp105 [Listeria phage A511]	Białko strukturalne (pełna funkcja nie jest znana)	481
99	821	143269	144658	1389*	odwrócona	AAV53338,gp35 [Listeria phage P100]	-	621
100	819	144674	145720	1047	odwrócona	AEW47200,baseplate J family protein [Bacillus phage BCP78]	Białko płytki ogonka z rodziny J	746
101	817	145734	146474	741	odwrócona	AEW47201,putative baseplate protein [Bacillus phage BCP78]	Białko biorące udział w składaniu płytki ogonka	529
102	816	146471	147031	561	odwrócona	AEW47202,hypothetical protein BCP78_0195 [Bacillus phage BCP78]	-	681

Tabela 22. Podsumowanie anotacji genomu i wyników spektrometrii mas c.d.

V.18. Analiza filogenetyczna na podstawie przewidywanej sekwencji głównego białka kapsydu oraz białka portalu

Na podstawie porównania przewidywanej sekwencji głównego białka kapsydu i białka portalu z podobnymi sekwencjami pochodzącymi z innych fagów opracowano cztery dendrogramy obrazujące relacje filogenetyczne w grupie bakteriofagów spokrewnionych z Φ AGATE.

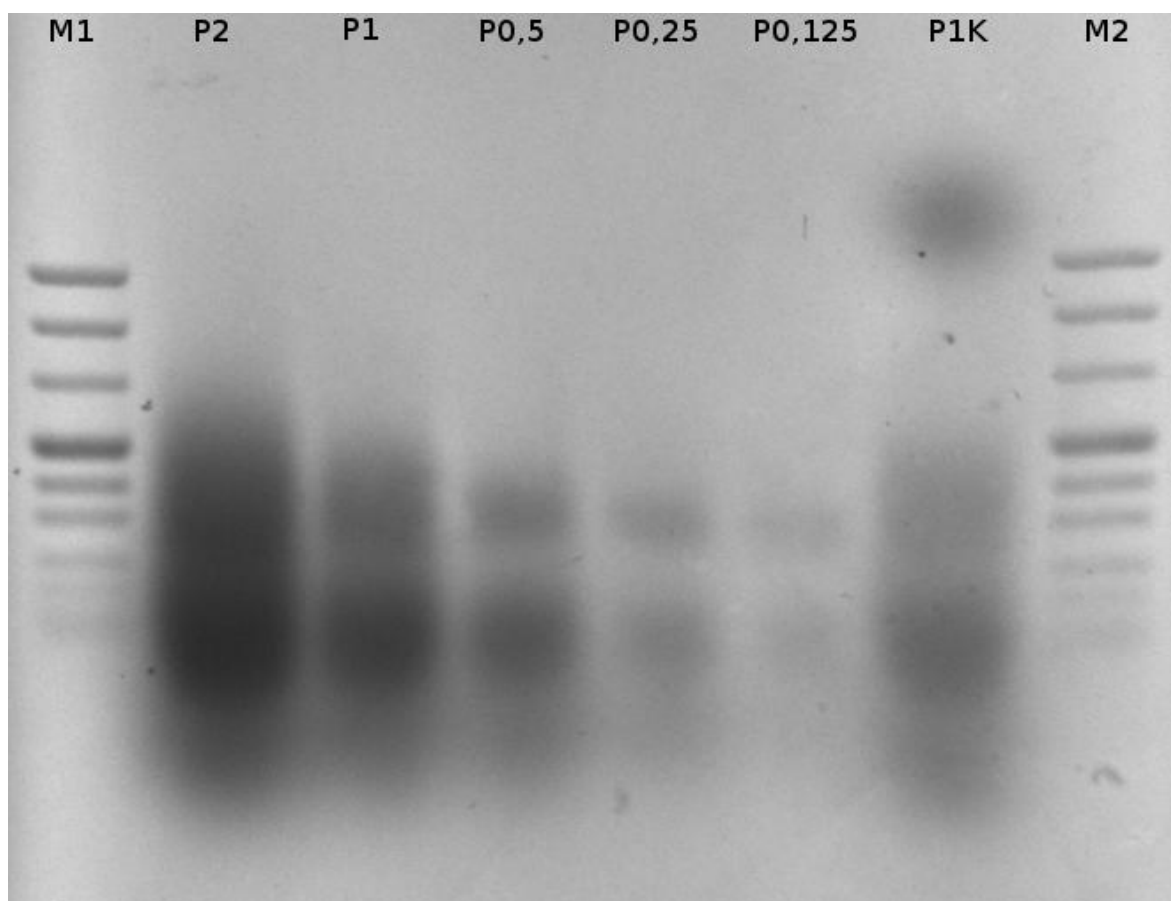
We wszystkich topologiach uzyskanych dendrogramów bakteriofag Φ AGATE formował gałąź wraz fagami BCP78 oraz W.ph. *Bacillus cereus*. W większości z nich, Φ AGATE lokalizował w obrębie większej grupy, do której należą bakteriofagi A511 oraz P100 *Listeria monocytogenes*, phiEF24C *Enterococcus faecalis*, a także Twort i K zakażające *Staphylococci*.



Ryc. 10. Dendrogramy otrzymane na podstawie analizy sekwencji białka portalu metodami UPGMA (a) i Neighbour-Joining (b) i głównego białka płaszczka tymi samymi metodami (odpowiednio c i d) [96]

V.19. Izolacja kwasu poli- γ -glutaminowego z kultur bakteryjnych

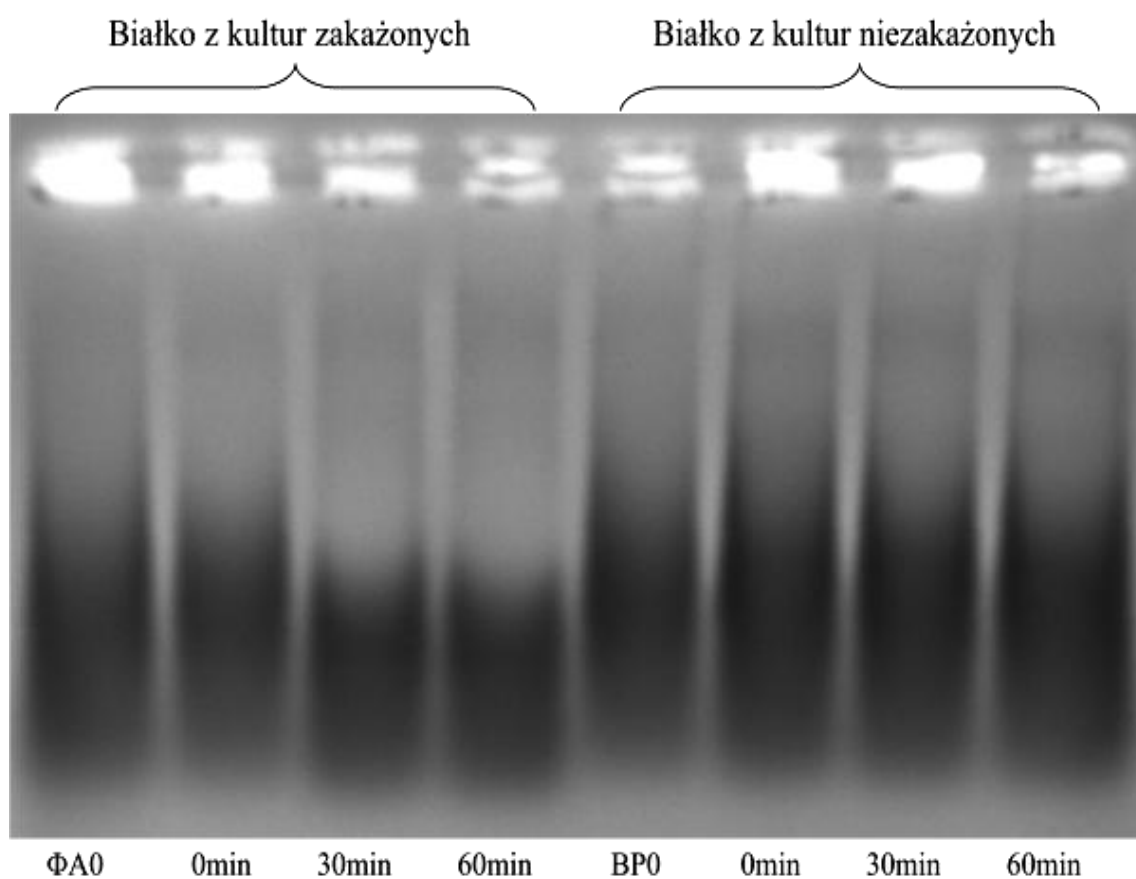
Izolację γ PGA przeprowadzono według procedury opisanej w punkcie IV.12.35. Średnia mokra masa osadu uzyskanego w trakcie izolacji kwasu poli- γ -glutaminowego wynosiła 3,72 mg na mililitr pierwotnej kultury, a jego sucha masa wynosiła 1,3 mg/ml. Po rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym i barwieniu błękitem metylenowym polimer był widoczny w żelu w ilości 250 μ g. Jego trawienie proteinazą K spowodowało jedynie niewielkie zmiany w obrazie elektroforetycznym wyizolowanego polimeru z czego można wnioskować, iż jest on nieznacznie zanieczyszczony białkami. Typowy obraz elektroforetycznego rozdziału oczyszczonego γ PGA przedstawia rycina 11.



Ryc. 11. Rozdział elektroforetyczny kwasu poli- γ -glutaminowego z kultur zawiesinowych *Bacillus pumilus*. W ścieżkach rozdzielano odpowiednio: 1 μ g markera puc8 (M1 i M2), 2mg (P2), 1mg (P1), 500 μ g (P0,5), 250 μ g (P0,25) kwasu poli- γ -glutaminowego oraz 1mg tego polimeru po 10 minutach trawienia 30 μ g proteinazy K.

V.20. Testy aktywności hydrolazy kwasu poli- γ -glutaminowego

Hydrolizę otrzymanego γ PGA przeprowadzono według Kimury i Itoh (patrz IV.12.37) [98]. W próbach podanych działaniu białka z kultur zakażonych widoczne jest przesunięcie smugi kwasu poli- γ -glutaminowego w kierunku mniejszych mas cząsteczkowych względem kontroli. Przesunięcie takie nie wystąpiło w przypadku prób poddanych działaniu białka z kultur niezakażonych fagiem. Aktywności hydrolazy kwasu poli- γ -glutaminowego jest więc związana z obecnością faga w czasie kultury.



Ryc. 12. Test aktywności hydrolazy kwasu Poli- γ -Glutaminowego Φ A0 oraz BP0 to próby kontrolne, które zostały pobrane z każdej mieszaniny przed podaniem białka.

VI. Dyskusja

VI.1. Izolacja bakterii tlenowych, fakultatywnie beztlenowych i aerotolerancyjnych z wody Jeziora Góreckiego

Badania rozpoczęto od wyselekcjonowania taksonów bakterii licznie występujących i istotnych dla funkcjonowania ekosystemu Jeziora Góreckiego. Warto zwrócić uwagę, że wyizolowano jedynie bakterie tlenowe, fakultatywnie beztlenowe i aerotolerancyjne, które szybko rosną na pożywce WPCA. W przyszłości uzyskane informacje należałoby uzupełnić o dane na temat bakterii beztlenowych. W jeziorze eutroficznym to one mogą stanowić grupę dominującą. W tym kontekście to właśnie stężenie tlenu w strefie pomiędzy 6, a 16 metrem w profilu pionowym wydaje się być wyjaśnieniem niskiego miana jakie uzyskiwano z posiewów prób pochodzących z tej głębokości.

Wiele z poczynionych w trakcie badań obserwacji jest zgodnych z danymi literaturowymi dostępnymi na temat mikroflory jezior eutroficznych. Bakterie z rodzajów *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* czy *Bacillus* są często opisywane jako naturalna mikroflora jezior eutroficznych [101].

Nieco bardziej zaskakujące było odnalezienie w próbach wody bakterii z rodzaju *Deinococcus*, gdyż rodzaj ten kojarzony jest zwykle z ekstremalnymi warunkami środowiskowymi. Dane literaturowe wskazują jednak, że istnieje grupa *Deinococci* związana z siedliskami słodkowodnymi [102, 103].

Berg wraz z współpracownikami udowodnili, że wiele bakterii z wymienionych wyżej rodzajów ma wpływ na liczebność i strukturę populacji cyjanobakterii (które stanowią główną część fitoplanktonu jeziora Góreckiego). Wszystkie testowane przez nich izolaty *Bacillus* przyspieszały lub hamowały namnażanie się sinic. Obserwowano także wzmożony wzrost cyjanobakterii na skutek oddziaływań, z niektórymi bakteriami z rodzajów *Aeromonas* i *Pseudomonas*. Jedyny testowany izolat z rodzaju *Deinococcus* miał dwoisty wpływ na sinice (hamował wzrost jednego badanego szczepu, a przyspieszał drugiego) [104, 105].

Niektóre bakterie z rodzajów *Bacillus* oraz *Pseudomonas* (rodzaje, które stanowiły odpowiednio 25,71% i 14,76% zidentyfikowanych izolatów z Jeziora Góreckiego) mają także zdolność do denitryfikacji i solubilizacji organicznych i nieorganicznych związków fosforu [106]. Rola takich mikroorganizmów w ekosystemie jest tym ważniejsza, że w

wielu zbiornikach eutroficznych właśnie fosfor jest czynnikiem limitującym produkcję biomasy.

Część zidentyfikowanych w trakcie wykonywania pracy gatunków bakterii może być patogenna dla ludzi (jak np. *Pseudomonas aeruginosa*) i innych organizmów (np. *Aeromonas hydrophilla* dla ryb i płazów) [107].

VI.2. Izolacja bakteriofaga Φ AGATE

Do izolacji bakteriofagów wykorzystano kultury wzbogaceniowe. Z wody Jeziora Góreckiego wyizolowano dwa bakteriofagi, które nazwano: Φ AGATE i phd2B. Tylko Φ AGATE został wybrany do dalszych badań. Po naniesieniu zawiesiny cząstek fagowych na warstwę bakterii rosnącą na podłożu stałym tworzył on łysinki, w obrębie których nie obserwowano żadnego wzrostu komórek gospodarza. Sugeruje to, że przynajmniej w opisanych w tej rozprawie warunkach, bakteriofag Φ AGATE jest fagiem bezwzględnie lityczny.

VI.3. Identyfikacja gospodarza

Identyfikacja gospodarza użytego do izolacji faga Φ AGATE prowadzona była trzema niezależnymi metodami; techniką amplifikacji i sekwencjonowania regionu 16S rDNA, metodą testów biochemicznych z wykorzystaniem gotowego, komercyjnie dostępnego zestawu oraz na podstawie profilu peptydów uzyskanego techniką spektrometrii mas. W związku z tym, że używany zestaw do biochemicznej identyfikacji przeznaczony był jedynie dla bakterii Gramm ujemnych, konieczna była modyfikacja procedury przeprowadzona według pracy Logan'a i Berkeley'a [93].

Wyniki otrzymane za pomocą wszystkich technik pozwoliły ustalić, że gospodarz faga Φ AGATE, izolat BP, należy do gatunku *Bacillus pumilus*. Jedynym budzącym wątpliwości rezultatem był negatywny wynik testu na zdolność fermentacji glukozy. Szczególnie interesujące okazały się natomiast wyniki spektrometrii LC-ESI-MS/MS całkowitego białka bakteryjnego. Porównanie otrzymanego profilu peptydów z bazą NR Protein (NCBI) pozwoliło na jednoznaczne zaklasyfikowanie badanego izolatu do gatunku. Udało się to, pomimo, że przed eksperymentem LC-ESI-MS/MS białka podlegały jedynie minimalnemu frakcjonowaniu (wysalanie w dwóch różnych stężeniach siarczanu amonu,

ekstrakcja fenolem i strącanie acetonem). Otrzymana identyfikacja pokrywała się z uzyskaną na podstawie pełnej sekwencji 16S rDNA. Podobne podejście do identyfikacji bakterii było wykorzystywane już wcześniej [108, 109, 110], a dane uzyskane w czasie badań wskazują, że taka niewymagająca dużego nakładu pracy procedura pozwala na identyfikacji przynajmniej niektórych bakterii.

Osobny problem stanowi identyfikacja gospodarza drugiego z bakteriofagów. Wyniki testów biochemicznych oraz analiza sekwencji 16S rDNA nie pozwoliły na jednoznaczne zaklasyfikowanie go do żadnego ze znanych gatunków. Białka z tego izolatu nie badano za pomocą spektrometrii mas, a identyfikacje za pomocą pozostałych technik nie są ze sobą zgodne. Powodem może być nieprzygotowanie komercyjnie dostępnych testów do rozróżniania izolatów środowiskowych (są one produkowane z myślą o bakteriach izolowanych od ludzi i innych zwierząt). Możliwe jest także, że gospodarz faga phd2B jest zbyt odległy ewolucyjnie od znanych gatunków z rodzaju *Enterobacter*. Pełna identyfikacja tej bakterii wymaga dalszych badań, wykraczają one jednak poza ramy tej rozprawy.

VI.4. Określenie zakresu gospodarzy infekowanych przez wyizolowanego faga ΦAGATE

Wśród badanych bakterii jedyną (poza gospodarzem wykorzystanym do izolacji) permissywną względem faga ΦAGATE był pozyskany z Jeziora Góreckiego izolat zaklasyfikowany (na podstawie sekwencji 16S rDNA) do grupy *Bacillus cereus*. W skład tej grupy wchodzi gatunki: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* oraz *B. weihenstephanensis*. ΦAGATE nie infekował jednak szczepów *B. cereus* ani *thuringiensis* pochodzących z kolekcji. Być może w zakresie jego gospodarzy znajdują się tylko niektóre z tych gatunków lub szczepów z grupy *B. cereus*. W przyszłości warto by poszerzyć zakres testów swoistości o zdefiniowane szczepy pochodzące z renomowanych kolekcji (ATTC czy PCM w IITD PAN).

VI.5. Charakterystyka i znaczenie gospodarza

Fag Φ AGATE zakaża izolaty *Bacillus pumilus* - najczęściej identyfikowanych bakterii w Jeziorze Góreckim. Wydaje się, że możemy mieć do czynienia ze zjawiskiem "zabijania zwycięzcy". Rzeczywiście, wyniki prowadzonych przeze mnie badań wykazują, że bakterie z tego gatunku nie są obserwowane w Jeziorze Góreckim tak często, jak przed uzyskaniem pierwszych izolatów bakteriofaga (dane własne, niepublikowane).

Rola *B. pumilus* w ekosystemie zbiornika eutroficznego nie jest całkiem jasna. Jest on prawdopodobnie jednym z ważniejszych destruentów występujących w Jeziorze Góreckim. Bakterie *B. pumilus* nie są zdolne do nityfikacji (co potwierdza negatywny wynik testu redukcji azotanów), dane literaturowe wskazują jednak, że mogą solubilizować i rozkładać nieprzyswajalne dla większości innych organizmów organiczne związki fosforu [111].

Podczas testów oddziaływań antagonistycznych zaobserwowano działanie hamujące *B. pumilus* względem izolatu o sekwencji 16S rDNA podobnej do *Pseudomonas fluorescens*. Dane literaturowe wskazują, że możemy mieć do czynienia nie tyle z działaniem bakteriobójczym czy bakteriostatycznym, co z hamowaniem tworzenia biofilmu. Morskie izolaty *B. pumilus* (S6-15, S8-07) hamują formowanie biofilmów *Pseudomonas aeruginosa*, a nawet rozbijają dojrzałe filmy [112, 113, 114]. Wyizolowany z wody szczep WAPB4 wytwarza także pumilicynę 4 - bakteriocynę aktywną przeciwko innym bakteriom z rodzaju *Bacillus*, a także *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *faecium* [115]. *B. pumilus* wykorzystuje się też jako biofungicyd [116, 117].

Warto zaznaczyć, że o ile *B. pumilus* nie jest wykorzystywany w przemyśle tak szeroko jak *Bacillus subtilis* to niektóre szczepy z tego gatunków stanowią źródło cennych enzymów. Ksyłanaza, alkaliczna proteaza czy liaza pektanu (co ciekawe sekwencja podobna do znanych genów kodujących ten enzym znajduje się także w genomie faga), izolowane z tej bakterii znalazły swoje zastosowanie w przemyśle spożywczym i garbarskim [118, 119, 120].

B. pumilus jest również zdolny do syntezy niebiałkowego polipeptydu: kwasu poli- γ -glutaminowego. Podobny polimer produkowany przez *Bacillus subtilis* jest wykorzystywany w przemyśle kosmetycznym [121].

Mimo, że *B. pumilus* nie jest uznawany za bakterię chorobotwórczą, może syntezować toksyny. Jest też jednym z organizmów biorących udział w psuciu się wielu produktów żywnościowych, a sporadycznie odnotowuje się przypadki zakażeń u ludzi [122, 123, 124, 125].

Bacillus pumilus jest organizmem nie tylko uwikłanym w gęstą sieć powiązań ekologicznych, ale i ważnym z gospodarczego punktu widzenia. Poznanie zakażających tę bakterię fagów może mieć znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne.

VI.6. Bakteriofagi zakażające *Bacillus pumilus*

Ilość prac dostępnych na temat fagów *B. pumilus* jest stosunkowo niewielka, w porównaniu do analogicznej literatury na temat *B. subtilis* czy *B. cereus*. Wśród znanych wirusów infekujących tę bakterię są fagi PMJ1 i PMB1. Mogą one powodować konwersję przywracającą zdolność tworzenia endospor mutantom *B. pumilus*, które ją utraciły [126]. PMJ1, a także odkryty niezależnie od niego fag 702phi1-1 zaklasyfikowane zostały do rodziny *Myoviridae* [127]. Znane są również zakażające *B. pumilus* fagi z rodziny *Siphoviridae* (np. PBP1) i *Podoviridae* [128]. Przedstawicielem tej ostatniej grupy jest Φ 29. Choć był on wyizolowany jako fag zakażający *B. subtilis* to infekuje szerokie spektrum *Bacilli*, w tym niektóre szczepy *B. pumilus*. Istnieją też doniesienia o odkryciu nowych bakteriofagów, jak fag 31 czy NP-5, lecz wirusy te są wciąż słabo scharakteryzowane [129]. Wiadomo również, że w genomach środowiskowych izolatów *B. pumilus* występują aktywne profagi [130]. W chwili powstania pracy bakteriofag Φ 29 jest jedynym infekującym tę bakterię fagiem szerzej opisanym pod względem molekularnym [131].

VI.7. Morfologia faga Φ AGATE

Otrzymane mikrografie elektronowe faga Φ AGATE ujawniły, iż jego wirion posiada symetrię złożoną, charakterystyczną dla rzędu *Caudovirales*. Na podstawie otrzymanego obrazu można wykluczyć przynależność do rodziny *Podoviridae*, gdyż wirusy z tej grupy nie mają długich ogonków, a długość ogonka Φ AGATE wynosi około 200nm. Do ustalenia czy bakteriofag należy do rodziny *Myoviridae*, czy też *Siphoviridae* konieczne byłoby stwierdzenie czy ogonek faga jest kurczliwy (a więc utrwalenie fagów wraz z ich gospodarzami). Gdyby udało się uchwycić moment adsorpcji i skurczu ogonka, byłby to ostateczny dowód na przynależność faga do rodziny *Myoviridae* (na co wskazują dane proteomiczne i genomiczne omówione w rozdziale VI.12).

VI.8. Analiza wielkości fragmentów powstałych w wyniku trawienia restrykcyjnego genomowego DNA faga ΦAGATE

Obserwowany w żelu rozkład fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia genomu faga ΦAGATE enzymami *KpnI* i *SalI* różnił się w pewnym stopniu rozkładu przewidywanego *in silico*, na podstawie danych genomowych. Jednym z możliwych wyjaśnień takiego stanu rzeczy jest słaba zdolność rozdzielcza 1% żelu agarozowego względem długich fragmentów DNA i słaba widoczność fragmentów bardzo krótkich przy wizualizacji bromkiem etydy. Wydaje się jednak, że nieobecność niektórych z przewidywanych prążków, o wielkości pomiędzy 1 - 10kbp nie da się uzasadnić w tak prosty sposób. Być może mamy do czynienia z modyfikacją DNA uniemożliwiającą cięcie w niektórych miejscach rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. Modyfikacje takie wstępują na przykład u fagów T4 *Escherichia coli* czy SPO1 *Bacillus subtilis*. Zablockowanie możliwości cięcia mogłoby być także wynikiem działania komórkowych metylaz gospodarza. Istnieją dowody, że *B. pumilus* posiada aktywny system restrykcji/modyfikacji [38, 132, 133].

VI.9. Sekwencjonowanie genomu

Reakcje sekwencjonowania faga ΦAGATE przeprowadzone metodami Sangera oraz 454 dały wzajemnie zgodne i uzupełniające się wyniki. Pokrycie sekwencji 52,9 razy pozwala wnioskować, że otrzymane dane sekwencyjne są wiarygodne.

VI.10. Anotacja genomu faga

W obrębie genomu faga, stosując program Geneious, zidentyfikowano 1345 otwartych ramek odczytu. Większość to prawdopodobnie sekwencje, które jedynie przypadkowo spełniają nałożone na program kryteria. Wykorzystując strategię przewidywania na podstawie homologii (podobieństwa) udało się zidentyfikować 81 potencjalnych genów. Większość (53 geny) była podobna do genomu faga BCP78 *B. cereus*, część wykazywała jednak podobieństwo do sekwencji pochodzących z innych fagów, w tym Φ NIT1 *B. subtilis* (3) i A511 *Listeria monocytogenes* (3) lub bakterii z rodzaju *Bacillus* (8). Taka "mozaikowa" struktura genomu pojawia się u wielu fagów i jest konsekwencją horyzontalnego transferu genów. Na podstawie informacji zawartych w bazach danych wybrano możliwą funkcję dla 46 produktów przewidywanych genów. Były wśród nich zarówno białka enzymatyczne jak i strukturalne. Zidentyfikowano sekwencje, których produkty są najprawdopodobniej zaangażowane w replikację fagowego materiału genetycznego (polimeraza DNA), rekombinację (rekombinaza A, rezolwaza), biosyntezę nukleotydów (reduktaza dihydrofolianu), a także składanie wirionu (główne białko kapsydu). Warto zaznaczyć, że wśród tej ostatniej grupy występowało charakterystyczne dla fagów z rodziny *Myoviridae* białko osłonki ogonka. W genomie występuje sekwencja podobna do białka indukowanego głodem fosforanowym. Dostępność tego pierwiastka może więc być czynnikiem ekologicznym silnie wpływającym na fizjologię faga.

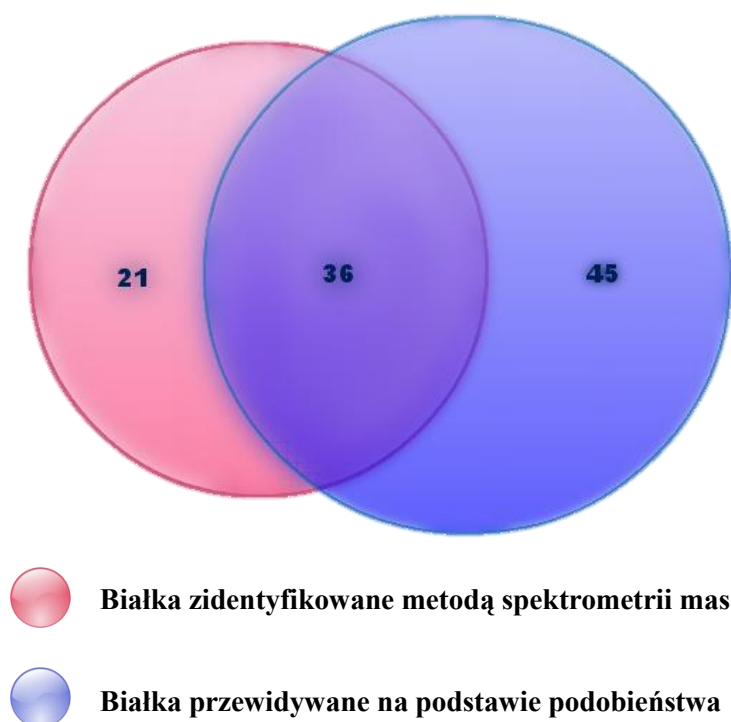
Pod względem aplikacyjnym interesujące wydają się białka zaangażowane w degradację ściany komórkowej (aż trzy potencjalne lizyny) i składników otoczki bakteryjnej (hydrolaza PGA, glikozylaza zawierająca powtórzenia BNR czy białko podobne do liazy pektanu). Być może, któraś z tych sekwencji znajdzie swoje zastosowanie, jako czynnik przeciwbakteryjny lub przeciwdziałający powstawaniu biofilmów.

Analiza ułożenia przewidywanych genów w genomie faga Φ AGATE ujawniła, że są one zorganizowane w regiony funkcjonalne. Interpretacja tego faktu wydają się jasna, jeśli weźmie się pod uwagę, iż geny *Myoviride* są zwykle eksprymowane jako operony [137]. Spostrzeżenie to potwierdziła analiza wykonana za pomocą programu FGENESB, który zlokalizował liczne operony w obrębie całego genomu.

VI.11. Identyfikacja białek fagowych metodą tandemowej spektrometrii mas

W celu ustalenia, czy przewidywane geny rzeczywiście ulegają ekspresji przeprowadzono analizę profilu peptydów metodą tandemowej spektrometrii mas. Część materiału do eksperymentu LC-ESI-MS/MS, przygotowano za pomocą prostej procedury wysalania białek siarczanem amonu, część natomiast strącano za pomocą PEG 8000, aby zagęścić białka związane z cząstkami fagowymi (dalsze oczyszczanie było takie samo: ekstrakcja fenolem i strącanie acetonem).

Na podstawie danych genomowych, drogą translacji *in silico* przygotowano bazę danych zawierającą potencjalne produkty wszystkich otwartych ramek odczytu zawartych w genomie faga Φ AGATE. Porównanie profili peptydów, uzyskanego podczas spektrometrii mas, ze stworzoną bazą pozwoliło na potwierdzenie ekspresji 57 sekwencji kodujących białka. 36 z nich zostało wcześniej przewidzianych na podstawie podobieństwa, natomiast 21, to produkty ekspresji ramek odczytu niewykazujących znaczącego podobieństwa do znanych sekwencji. Mamy więc do czynienia z nowymi, nieznanymi genami. Liczba potencjalnych genów w genomie faga Φ AGATE rośnie zatem z 81 do 102.



Ryc. 13. Diagram obrazujący zależność między zbiorem białek przewidzianych na podstawie podobieństwa i zidentyfikowanych metodą spektrometrii mas

Na podstawie otrzymanych profili peptydów potwierdzono obecność wielu białek strukturalnych w lizatach fagowych. Szczególnie pomocne w tym względzie okazały się dane pochodzące z analizy próby strąconej PEG 8000, gdzie białka te występowały w znacznych ilościach. Potwierdzono także obecność większości enzymów związanych z degradacją ściany komórkowej i otoczki bakteryjnej w tym trzech przewidywanych lizyn i hydrolazy PGA. Warto zauważyć, że wśród otrzymanych identyfikacji niewiele było polipeptydów związanych z replikacją genomu fagowego i biosyntezą nukleotydów. Są to zwykle białka wczesne, ich brak można więc wyjaśnić tym, że uległy degradacji w trakcie końcowych etapów namnażania się faga i nie były już obecne w badanych lizatach. Aby potwierdzić tę hipotezę należałoby przeprowadzić podobny eksperyment z wykorzystaniem białka izolowanego z kultur w różnych fazach zakażenia fagowego.

VI.12. Analiza filogenetyczna

Nawet przy bardzo łagodnych parametrach (wartość oczekiwana nie większa niż 100) algorytm blastn znalazł w bazie nr (non redundant) nucleotide (NCBI) podobne sekwencje wirusowe tylko dla 4,46% genomu nowo odkrytego faga. Bakteriofagiem, który wykazuje największe podobieństwo sekwencji DNA do Φ AGATE jest BCP78 *Bacillus cereus* [134].

Główne białko kapsydu i białka portalu faga Φ AGATE (uznawane za markery taksonomiczne [135, 136]) również były najbardziej podobne do odpowiadających im sekwencji BCP78. Porównanie wykonane algorytmem MUSCLE pozwoliło ustalić podobieństwo między nimi na 66,5% (w przypadku białka kapsydu) i 69% (w przypadku portalu). W genomie faga Φ AGATE występują jednak potencjalne geny, których obecności nie stwierdzono u BCP78 jak np. gen kodujący hydrolazę kwasu poli- γ -glutaminowego.

Wraz z danymi na temat morfologii i ekologii faga (nowa nisza ekologiczna, inny gospodarz), informacje otrzymane na podstawie analizy sekwencji, pozwalają stwierdzić, że fag Φ AGATE należy do nowego, nieznanego dotychczas gatunku (spełnia kryteria demarkacji postawione przez ICTV [137]). W najbliższym czasie propozycja jego wyróżnienia powinna zostać przedstawiona do akceptacji komitetu.

Wszystkie bakteriofagi, o sekwencjach głównego białka kapsydu i białka portalu przypominających te, występujące u Φ AGATE, należą do rodziny *Myoviridae*. Uzasadnione jest więc twierdzenie, że także fag Φ AGATE należy do tej rodziny. W

większości uzyskanych dendrogramów Φ AGATE lokalizował się w obrębie większej grupy, do której należą fagi BCP78 i W.ph *Bacillus cereus*, A511 oraz P100 *Listeria monocytogenes*, phiEF24C *Enterococcus faecalis*, a także bakteriofagi Twort i K zakażające *Staphylococci*. Poza niesklasyfikowanymi jeszcze BCP78, W.ph i SP10 fagi te należą do rodzaju wirusów podobnych do SPO1 (Według bazy Taxonomy - UniProt). Warto więc rozważyć włączenie także tych fagów, wraz z Φ AGATE, do tego właśnie rodzaju.

VI.13. Aktywności hydrolazy kwasu poli- γ -glutaminowego

W lizatach fagowych potwierdzono aktywność hydrolazy γ PGA. Aktywność tę badano względem polimeru izolowanego z kultur gospodarza (izolatu BP *Bacillus pumilus*). Otrzymany wynik jest interesujący, ponieważ γ PGA wykorzystywany jest w przemyśle (gdzie zwykle poddawany jest obróbce w celu obniżenia masy cząsteczkowej), i stanowi czynnik wirulencji niektórych bakterii z typu *Firmicutes*. Wiadomo, że otoczka zbudowana z tego polimeru chroni *Bacillus anthracis* przed rozpoznaniem przez układ odpornościowy, wiązaniem się przeciwciał i fagocytozą, [138 139]. Również *Staphylococcus epidermidis* syntezuje γ PGA i także on jest chroniony przed fagocytozą [140]. Kwas poli- γ -glutaminowy jest również czynnikiem biorącym udział w adhezji i tworzeniu biofilmów przez niektóre bakterie z rodzaju *Bacillus* [141, 142]. Być może hydrolaza kwasu γ PGA mogłaby znaleźć zastosowanie do rozbijania biofilmów tworzonych przez te mikroorganizmy.

Pełna ocena potencjału użytkowego tego enzymu wymaga przeprowadzenia testu jego aktywności względem izolatów kwasu poli- γ -glutaminowego uzyskiwanych z innych bakterii. Dobrym punktem wyjścia do dalszych badań byłaby analiza składu γ PGA izolowanego z kultur *B. pumilus*, gdyż u różnych mikroorganizmów obserwowano różne proporcje budujących go enancjomerów kwasu glutaminowego, a także niewielkie ilości innych aminokwasów [143].

VII. Podsumowanie:

- Odkryto nowy gatunek bakteriofaga, fag Φ AGATE *Bacillus pumilus*.
- Scharakteryzowano jego gospodarza; bakterię *Bacillus pumilus* z Jeziora Góreckiego.
- Uzyskano sekwencję genomu faga Φ AGATE.
- W genomie faga Φ AGATE przewidziano obecność 102 genów, dla 46 ustalono potencjalną funkcję.
- Na podstawie profili peptydów, otrzymanych metodą spektrometrii mas, potwierdzono ekspresję 57 ze 102 przewidywanych genów.
- Zidentyfikowano białka potencjalnie zaangażowane w degradację ściany komórkowej (lizyny) i składników otoczki bakteryjnej (hydrolazę γ PGA). Być może, znajdą one swoje zastosowanie, jako czynnik przeciwbakteryjny lub przeciwdziałający powstawaniu biofilmów.
- Potwierdzono aktywność jednego z tych białek - hydrolazy γ PGA

VIII. Wnioski końcowe:

- W funkcjonowanie ekosystemu jeziora eutroficznego zaangażowane są bakteriofagi.
- Przykładem takiego bakteriofaga może być fag Φ AGATE *Bacillus pumilus*, infekujący jedną z najczęściej obserwowanych w jeziorze Góreckim bakterii.
- W genomach fagów, izolowanych z ekosystemu jeziora eutroficznego, występują potencjalnie użyteczne sekwencje, jak np. geny kodujące enzymy zaangażowane w degradację ściany komórkowej lub składników otoczki bakteryjnej.

Bibliografia

1. Friedman SD, Genthner FJ, Gentry J, Sobsey MD, Vinjé J. Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family Leviviridae). *J Virol.* 2009 .
2. Krupowic, Mart. Evolutionary Genomics of Prokaryotic Viruses. s.l. : Dissertation presented to the Faculty of Biosciences University of Helsinki, 2010.
3. Sun M, Serwer P. The conformation of DNA packaged in bacteriophage G. *Biophys J.* 1997.
4. Goździcka-Józefiak A. *Wirusologia molekularna, skrypt do wykładów*. Poznań : Wydawnictwo naukowe UAM, 2004.
5. Schaechter M. *Desk Encyclopedia of Microbiology.* : Academic Press, 2009.
6. Abedon ST. *Bacteriophage Ecology: Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses.* Nowy Jork : Cambridge University Press, 2008.
7. Wilson GG, Murray NE. Restriction and Modification Systems. *Annu. Rev. Genet.* . 1991.
8. Sabour PM, Griffiths M. *Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens.* Washington, DC : ASM Press, 2010.
9. D, Nelson. Phage taxonomy: we agree to disagree. *J Bacteriol.* 2004.
10. Mc Grath S, Van Sinderen D. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology.* Norfolk : Caister Academic Press, 2007.
11. Ackermann HW. Bacteriophage taxonomy. *Viruses of Prokaryotes. Tom I.* Boca Raton : CRC Press, 1987.
12. Ackermann HW. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol.* 152, 2007, Vol. 2.
13. Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol.* 154, 2003, Tom 4.
14. ICTV. *Viruses sorted according to general host categories.* [Online] [Zacytowano: 2012 02 3.] <http://www.mcb.uct.ac.za/tutorial/ICTV%20Species%20Lists%20by%20host.htm>.
15. Cann AJ. *Principles of Molecular Virology (edycja standardowa).* Waltham, Massachusetts : Academic Press, 2001.
16. Mahy BWJ, van Regenmortel MHV. *Desk Encyclopedia of General Virology.* Waltham, Massachusetts : Academic Press, 2009.
17. ICTV. Virus Taxonomy: 2009 Release. [Online] [Zacytowano: 01 03 2012.] <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>.
18. Expasy. ViralZone. [Online] [Zacytowano: 25 02 2012.] <http://viralzone.expasy.org>.
19. King A, Lefkowitz E, Adams MJ. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Amsterdam : Elsevier, 2011.
20. NCBI. Taxonomy (baza danych). [Online] [Zacytowano: 08 03 2012.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.
21. Okafor N. *Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems.* Berlin : Springer, 2011.
22. Tidona C, Darai G. *The Springer Index of Viruses.* Nowy Jork : Springer, 2011.
23. Kim SH, Lee JS, Cho YH. Genome diversification by a Pf1 phage-derived genomic island in *Pseudomonas aeruginosa*. *niepublikowane (NCBI).* 2003.

24. Garrett RA, Klenk HP. *Archaea: Evolution, Physiology, and Molecular Biology*. Oxford : Blackwell Publishing, 2007.
25. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 28, 2004, Tom 2.
26. Liu YM, Zhang QY, Yuan XP, Li ZQ and Gui JF. Seasonal variation of virioplankton in a eutrophic shallow lake. *Hydrobiologia*. 560, 2006.
27. Sigeo, D. *Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. Chichester : Wiley. , 2005.
28. Poindexter JS, Leadbetter ER. *Methods and Special Applications in Bacterial Ecology Tom 3, Cyklu: Bacteria in Nature*. Berlin : Springer, 1986.
29. Meinhard S, Byung CC, Farooq A. Significance of bacterial biomass in lakes and the ocean: comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar Ecol Progr.* 86 , (1992).
30. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 1998, Tom 12.
31. Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev.* . 64, 2000 Mar, Tom 1.
32. .Abedon ST. Bacteriophage Ecology Group (BEG) News. [Online] [Zacytowano: 15 04 2012.] <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/bgnws007.htm#submissions>.
33. Kerr B, Neuhauser C, Bohannan BJ, Dean AM. Local migration promotes competitive restraint in a host-pathogen 'tragedy of the commons'. *Nature*. 442, 2006, Tom 7098.
34. Bull JJ, Badgett MR, Wichman HA. Big-benefit mutations in a bacteriophage inhibited with heat. *Mol Biol Evol.* . 17, 2000 Jun, Tom 6.
35. Tuomi P, Fagerbakke KM, Bratbak, Heldal M. Nutritional enrichment of a microbial community: The effects on activity, elemental composition, community structure and virus production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 1994, Tom 2.
36. Winter C, Bouvier T, Weinbauer MG, Thingstad TF. Trade-offs between competition and defense specialists among unicellular planktonic organisms: the "killing the winner" hypothesis revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74, 2010, Tom 1.
37. Waldor MK, Friedman DI, Adhya SL. *Phages. Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*. Washington D.C. : ASM press, 2006.
38. Villarreal LP. *Viruses and the Evolution of Life*. Washington DC : ASM Press, 2005.
39. Lehnherr H, Maguin E, Jafri S, Yarmolinsky MB. Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained. *J Mol Biol.* 233, 1993 , Tom 3.
40. Dubois JY, Kouwen TR, Schurich AK, Reis CR, Ensing HT, Trip EN, Zweers JC, van Dijk JM. Immunity to the bacteriocin sublancin 168 Is determined by the SunI (YolF) protein of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* . 53, 2009, Tom 2.
41. Mahony J, McGrath S, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes. *Appl Environ Microbiol.* 74, 2008, Tom 20.
42. Iida S, Meyer J, Bächli B, Stålhammar-Carlemalm M, Schrickel S, Bickle TA, Arber W. DNA restriction--modification genes of phage P1 and plasmid p15B. Structure and in vitro transcription. *J Mol Biol.* 165, 1983, Tom 1
43. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* . 68, 2004, Tom 3.
44. American Society for Microbiology. A Glossary defining some terms for bacteriophage biology. [Online] [Zacytowano: 12 03 2012.] <http://www.asm.org/division/m/blurbs/glossary/lexicon.html>.

45. Weinbauer MG, Höfle MG. Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. *Appl Environ Microbiol.* 64, 1998, Tom 2.
46. Peduzzi P, Weinbauer MG. Effect of concentrating the virus-rich 2 – 200 nm size fraction of seawater on the formation of algal flocs (marine snow). *Limnology and Oceanography.* 38, 1993.
47. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage Therapy, . *Antimicrob. Agents Chemothe.* 45, 2001.
48. Morello E, Sausseureau E, Maura D, Huerre M, Touqui L, Debarbieux L. .Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PLoS One.* 6, 2011, Tom 2.
49. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, Balloy V, Touqui L. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis.* 201, 2010, Tom 7.
50. Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by O25b:H4-ST131 *E. coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother.* na., 2012, Tom na.
51. Hung CH, Kuo CF, Wang CH, Wu CM, Tsao N. Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 55, 2011, Tom 4.
52. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care.* 18, 2009, Tom 6.
53. Wright A, Hawkins CH, Anggard EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol.* 34, 2009, Tom 4.
54. Slopek S, Weber-Dabrowska M, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. . *Arch Immunol Ther Exp.* 35, 1987.
55. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Minireview: Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 2001, Tom 3.
56. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 1, 2011, Tom 2.
57. Chhibber S, Kumari S. Application of Therapeutic Phages in Medicine. [aut. książki] Ipek Kurtböke. *Bacteriophages.* : InTeO, 2012 .
58. Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 1996, Tom 8.
59. Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science.* 294, 2001 , Tom 5549.
60. Hermoso JA, García JL, García P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol.* 10, 2007 , Tom 5.
61. Gu J, Xu W, Lei L, Huang J, Feng X, Sun C, Du C, Zuo J, Li Y, Du T, Li L, Han W. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Clin Microbiol.* 49, 2011, Tom 1.
62. Schmelcher M, Powell AM, Becker SC, Camp MJ, Donovan DM. Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Appl Environ Microbiol.* 78, 2012 , Tom 7.
63. Hanlon GW, Denyer SP, Olliff CJ, Ibrahim LJ. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 67, 2001, Tom 6.

64. Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*. 144, 1998.
65. Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104, 2007, Tom 27.
66. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*. 418, 2002, Tom 6900.
67. Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. PlyPH, a Bacteriolytic Enzyme with a Broad pH Range of Activity and Lytic Action against *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 188, 2006, Tom 7.
68. Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol*. 186, 2004, Tom 14.
69. Daugelavicius R, Cvirkaite V, Gaidelyte A, Bakiene E, Gabrenaite-Verkhovskaya R, Bamford DH. Penetration of enveloped double-stranded RNA bacteriophages phi13 and phi6 into *Pseudomonas syringae* cells. *J Virol*. 79, 2005, Tom 8.
70. Pastagia M, Euler C, Chahales P, Fuentes-Duculan J, Krueger JG, Fischetti VA. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 55, 2011, Tom 2.
71. Takác M, Blási U. Phage P68 virion-associated protein 17 displays activity against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 49, 2005, Tom 7.
72. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 2001, Tom 7.
73. Nelson D, Schuch R, Chahales P, Zhu S, Fischetti VA. PlyC: a multimeric bacteriophage lysin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103, 2006, Tom 28.
74. Cheng Q, Nelson D, Zhu S, Fischetti VA. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 49, 2005, Tom 1.
75. Domenech M, García E, Moscoso M. In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob Agents Chemother*. 55, 2011, Tom 9.
76. Biolabs, New England. New England Biolabs Enzymes Database (baza danych). [Online] [Zacytowano: 03 01 2012.] <http://www.neb.com/>.
77. Bowen RA, Austgen L, Rouge M. Restriction Endonucleases and DNA Modifying Enzymes. [Online] [Zacytowano: 02 03 2012.] <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/contrib.html>.
78. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the third edition*. Nowy Jork : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
79. Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ P. *Phage display: A laboratory manual*. Nowy Jork : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
80. Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid*. 43, 2000, Tom 1.
81. Information, National Center for Biotechnology. Nucleotide (baza danych). [Online] [Zacytowano: 21 04 2001.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>.
82. Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. *Chem Rev*. 97, 1997, Tom 2.
83. Park J, Labaer J. Rozdział 3.20: Recombinational cloning. [aut. książki] Ausubel FM (red). *Current protocols in molecular biology*. Nowy Jork : brak nazwiska, 2006.
84. Gibson RM, Errington J. A novel *Bacillus subtilis* expression vector based on bacteriophage phi 105. *Gene*. 121, 1992, Tom 1.

85. Weinberg RA, De Ciechi PA, Obukowicz M. A chromosomal expression vector for Escherichia coli based on the bacteriophage Mu. *Gene*. 126, 1993 , Tom 1.
86. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 228, 1985 , Tom 4705.
87. Singleton P. *Dictionary of DNA and Genome Technology*. 2 ed. Chesterton : Wiley, 2010.
88. Lutzoni F. Primers, 16S ribosomal DNA - François Lutzoni's Lab. [Online] [Zacytowano: 03 12 2011.] <http://www.lutzonilab.net/primers/page604.shtml>.
89. Burchardt L, Goździcka-Józefiak A, Messyas B, Gąbka M, Lamentowicz Ł, Rybak A, Dondajewska R. Wpływ gradientu temperatury i żyzności wody na strukturę fitoplanktonu Jeziora Góreckiego (Wielkopolski Park Narodowy) w okresie zlodzenia zimowego. [aut. książki] Kaczmarek L, Lorenc M, Dondajewska M (red.) Walna B. *Wielkopolski Park Narodowy w badaniach przyrodniczych*. Poznań-Jezioro : Wydawnictwo Naukowe UAM, 2009.
90. Messyas B., Stefaniak K. Struktura wiosennego i letniego fitoplanktonu Jeziora Góreckiego. [aut. książki] Kaczmarek L, Walna B (red.) Kostrzewski A. *Stan i przemiany środowiska przyrodniczego Wielkopolskiego Parku Narodowego. 15 lat stacji Ekologicznej UAM w Jeziorach*. Poznań - Jezioro : Wydawnictwo Naukowe UAM, 2004.
91. Pelechata A, Walna B, Pelechaty M, Kaczmarek L, Ossowski P, Lorenc M. Sezonowa dynamika zbiorowiska glonów i sinic planktonowych Jeziora Góreckiego na tle cech fizyczno-chemicznych wód powierzchniowych i stopnia rozwoju makrofytów. [aut. książki] Kaczmarek L, Lorenc M, Dondajewska R (red.) Walna B. *Wielkopolski Park Narodowy w badaniach przyrodniczych*. Poznań-Jezioro : Wydawnictwo Naukowe UAM, 2009.
92. Kolendowicz L, Hanke J, Kaczmarek L, Lorenc M. Zmiany poziomu wody Jeziora Góreckiego (Wielkopolski Park Narodowy). [aut. książki] Pociąg-Karteczka J (red.) Partyka J. *Wody na obszarach chronionych*. . Kraków : Instytut Geografii i Gospodarki Przestrzennej UJ, Ojcowski Park Narodowy, Komisja Hydrologiczna PTG, 2008.
93. Logan NA, Berkeley RC. Identification of Bacillus strains using the API system. *J Gen Microbiol*. 130, 1984, Tom 7.
94. Roth J. Single Primer ("Semi-Random") PCR. [Online] [Zacytowano: 22 08 2012.] <http://rothlab.ucdavis.edu/protocols/semirandom.html>.
95. I j J, Braam J. Restriction Site Extension PCR: A Novel Method for High-Throughput Characterization of Tagged DNA Fragments and Genome Walking. *PLoS One*. 5, 2010, Tom 5.
96. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A. *Geneious v5.6*. [http://www.geneious.com] : Biomatters Ltd, 2012.
97. Goto A, Kunioka M. Biosynthesis and hydrolysis of poly(g-glutamic acid) from Bacillus subtilis IFO3335. *Biosci Biotech Biochem* . 56, 1992.
98. Kimura K, Itoh Y. Characterization of poly-gamma-glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of Bacillus subtilis encapsulated with poly-gamma-glutamate. *Appl Environ Microbiol*. 69, 2003, Tom 5.
99. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25, 1997, Tom 17.
100. *FGENSEB: Bacterial Operon and Gene Prediction*. [http://linux1.softberry.com/berry.phtml] : SoftBerry, 2012.
101. Goel PK. *Water Pollution: Causes, Effects and Control*. New Delh : New Age International, 1997.
102. Song J, Yang SJ, Cho JC. "Bring to lab" of 19 novel species among 60 isolates retrieved from a freshwater pond. *J Microbiol Biotechnol*. 17, 2007, Tom 1.

103. Im WT, Jung HM, Ten LN, Kim MK, Bora N, Goodfellow M, Lim S, Jung J, Lee ST. *Deinococcus aquaticus* sp. nov., isolated from fresh water, and *Deinococcus caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58, 2008.
104. Berg K. Heterotrophic Bacteria Associated with Cyanobacteria in Recreational and Drinking Water. Dissertation presented to the Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki Helsinki : brak nazwiska, 2009.
105. Berg KA, Lyra C, Sivonen K, Paulin L, Suomalainen S, Tuomi P, Rapala J. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J.* 3, 2009, Tom 3.
106. Singh A, Parmar N, Kuhad RC Springer. *Soil Biology: Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*,. Berlin : brak nazwiska, 2010.
107. Hazen TC, Fliermans CB, Hirsch RP, Esch GW. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 36, 1978, Tom 5.
108. Fox A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: Past, present, and future. *J Clin Microbiol.* 44, 2006, Tom 8.
109. Rabih E. Jabbour, Mary M. Wade, Samir V. Deshpande, Mi. Comparative Proteomics of Tandem Mass Spectrometry Analyses for Bacterial Strains Identification and Differentiation. [aut. książki] Prasain JK. *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, ISBN: 978-953-51-0141-3. Slavka Krautzecka : InTech, 2012 .
110. Vaidyanathan S, Kell DB, Goodacre R. Flow-injection electrospray ionization mass spectrometry of crude cell extracts for high-throughput bacterial identification. *J Am Soc Mass Spectrom.* 13, 2002, Tom 2.
111. Satyanarayana T, Johri B, Prakash A. Nowy Jork : Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology, 2012.
112. Nithya C, Aravindraja C, Pandian SK. *Bacillus pumilus* of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria. *Res Microbiol.* 161, 2010, Tom 4.
113. Nithya C, Begum MF, Pandian SK. Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiol Biotechnol.* 88, 2010, Tom 1.
114. Nithya C, Devi MG, Karutha Pandian S. A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in gram-positive and gram-negative species. *Biofouling.* 27, 2011, Tom 5.
115. Aunpad R, Na-Bangchang K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr Microbiol.* 55, 2007 , Tom 4.
116. Stith JC, Rosenthal E. *Marijuana Garden Saver: Handbook for Healthy Plants*. San Francisco : Quick American Archives, 2008.
117. Huang X, Zhang N, Yong X, Yang X, Shen Q. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiol Res.* 167, 2012, Tom 3.
118. Ouattara HG, Reverchon S, Niamke SL, Nasser W. Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation. *Food Microbiol.* 28, 2011, Tom 1.
119. Nagar S, Gupta VK, Kumar D, Kumar L, Kuhad RC. ^Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37, 2010 , Tom 1.
120. Wan MY, Wang HY, Zhang YZ, Feng H. Substrate specificity and thermostability of the dehairing alkaline protease from *Bacillus pumilus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 159, 2009 , Tom 2.
121. Schneerson R, Kubler-Ki. Poly(γ -D-glutamic acid) protein conjugates induce IgG antibodies in mice to the capsule of *Bacillus anthracis*: a potential addition to the anthrax vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 2003, Tom 15.

122. Pepe O, Blaiotta G, Moschetti G, Greco T, Villani F. Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria.[^]. *Appl Environ Microbiol.* 69, 2003 , Tom 4.
123. milk., Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic. Nieminen T, Rintaluoma N, Andersson M, Taimisto AM, Ali-Vehmas T, Seppälä A, Priha O, Salkinoja-Salonen M. *Vet Microbiol.* . 124, 2007, Tomy 3-4.
124. Kimouli M, Vrioni G, Papadopoulou M, Koumaki V, Petropoulou D, Gounaris A, Friedrich AW, Tsakris A. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *J Med Microbiol.* 61, 2012, Tom 4.
125. Tena D, Martinez-Torres JA, Perez-Pomata MT, Sáez-Nieto JA, Rubio V, Bisquert J. Cutaneous infection due to *Bacillus pumilus*: report of 3 cases. *Clin Infect Dis.* 44, 2007 , Tom 4.
126. Keggins KM, Nauman RK, Lovett PS. Sporulation-converting bacteriophages for *Bacillus pumilus*. *J Virol.* 27, 1978 , Tom 3.
127. Hardies, S.C. and Serwer,P. Genomic survey of *Bacillus pumilus* phage 702phi1-1. *Nieopublikowano* (NCBI). 2002.
128. Lovett PS. . PBP1: a flagella specific bacteriophage mediating transduction in *Bacillus pumilus*. *Virology.* 13, 1972, Tom 1.
129. Imai, K. NP-5, Characterization of two bacteriophages for *Bacillus pumilus*. The virulent phage 31 and the temperate phage.. *IFO Res Commun.* 14, 1969, Tom 5.
130. JH, Pau. RESEARCH - VIROMICS - Lysogeny in Marine *Bacillus*. [Online] [Zacytowano: 03 05 2012.] <http://www.marine.usf.edu/microbiology/viromics-lysogeny-bacillus.shtml> .
131. Meijer WJ, Horcajadas JA, Salas M. Phi29 family of phages. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65, 2001, Tom 2.
132. Stankevicius K, Lubys A, Timinskas A, Vaitkevicius D, Janulaitis A. Cloning and analysis of the four genes coding for Bpu10I restriction-modification enzymes. *Nucleic Acids Res.* 26, 1998 , Tom 4.
133. Huang LH, Farnet CM, Ehrlich KC, Ehrlich M. Digestion of highly modified bacteriophage DNA by restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 10, 1982 , Tom 5.
134. Lee JH, Shin H, Son B, Ryu S. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* bacteriophage BCP78. *J Virol.* 68, 2012 , Tom 1.
135. Webby R, Kalmakoff J. Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses. *Arch Virol.* 143, 1998, Tom 10.
136. Sullivan MB, Coleman ML, Quinlivan V, Rosenkrantz JE, Defrancesco AS, Tan G, Fu R, Lee JA, Waterbury JB, Bielawski JP, Chisholm SW. Portal protein diversity and phage ecology. *Environ Microbiol.* 10, 2008 , Tom 10.
137. ICTV. ICTVdB Index of Viruses. [Online] [Zacytowano: 2012 05 04.] <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Ictv>.
138. Ezzell JW, Welkos SL. The capsule of *Bacillus anthracis*, a review. *J Clin Invest.* 115, 1999 , Tom 3.
139. Candela T, Fouet A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology.* 60, 2006, Tom 5.
140. Kocianova S, Vuong C, Yao Y, Voyich JM, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest.* 115, 2005, Tom 3.
141. Liu J, He D, Li XZ, Gao S, Wu H, Liu W, Gao X, Zhou T. Gamma-polyglutamic acid (gamma-PGA) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C06 promoting its colonization on fruit surface. *Int J Food Microbiol.* . 15, 2010, Tom 124.
142. Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate. *Microbiology.* 152, 2006.
143. Stanley NR, Lazazzera BA. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly-gamma-dl-glutamic acid production and biofilm formation. *Mol Microbiol.* 57, 2005, Tom 4.