



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Monika FILIPIČ

**KOEVOLUCIJA BAKTERIJ IN BAKTERIOFAGOV V  
BIOREAKTORJU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Monika FILIPIČ

**KOEVOLUCIJA BAKTERIJ IN BAKTERIOFAGOV V  
BIOREAKTORJU**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**COEVOLUTION OF BACTERIA AND BACTERIOPHAGE IN  
BIOREACTOR**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega seminarja imenovalaizr. prof. dr. Aleša Podgornika.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: izr. prof. dr. Aleš PODGORNIK  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Član: prof. dr. Polona JAMNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 6. 9. 2018

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 602.3/4:578.347(043.2)
- KG biotehnologija, koevolucija, bakteriofagi, bakterije, kemostat, rezistenca, bakteriofagna terapija
- AV FILIPIČ, Monika
- SA PODGORNIK, Aleš (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2018
- IN KOEVOLUCIJA BAKTERIJ IN BAKTERIOFAGOV V BIOREAKTORJU
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 19 str., 4 sl., 38 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Bakteriofagi so, kot ostali virusi, obligatorni intracelularni paraziti, ki okužijo in se razmnožuje le v bakterijski celici. Tako bakterije kot bakteriofagi se spreminjajo – bakterije postajajo odporne na bakteriofage, bakteriofagi pa spreminjajo infektivnost, da lahko napadajo odporne bakterije. Temu procesu pravimo koevolucija in se odraža v genotipskih in fenotipskih spremembah. Poznani sta dve vrsti koevolucije: »arms race dinamika« in nihajoča selekcijska dinamika. Bakterije imajo več mehanizmov, ki omogočajo odpornost. Lahko preprečijo pritrjevanje bakteriofagov na bakterijsko celico, preprečijo vstop bakteriofagne DNK v gostiteljsko celico, lahko režejo in uničijo bakteriofagne nukleinske kisline ali pa sprožijo celično smrt, ko jih bakteriofag okuži. Bakteriofag se odzove na spremembe in poveča infektivnost. Najboljši pogoji za koevolucijo se ustvarijo pri kontinuirnem procesu, saj traja dalj časa in so bakterije in bakteriofagi nenehno izpostavljeni eden drugemu, kar omogoči velik evlucijski pritisk. Na koevolucijo ima vpliv prisotnost oziroma odsotnost plazmidov v bakteriji, hitrost bakterijskih mutacij, mešanje in stresanje gojene populacije, migracije bakterij in bakteriofagov ter abiotski dejavniki, npr. razpoložljivost virov in nihanje temperature. Proces koevolucije se izkorišča tudi pri bakteriofagni terapiji.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 602.3/.4:578.347(043.2)
- CX biotechnology, coevolution, phage, bacteria, chemostat, resistance, phage therapy
- AU FILIPIČ, Monika
- AA PODGORNIK, Aleš (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2018
- TI COEVOLUTION OF BACTERIA AND BACTERIOPHAGE IN BIOREACTOR
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 19 p., 4 fig., 38 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Bacteriophages or phage are, like other viruses, obligate intracellular parasites which infect and replicate within bacterial cells. Bacteria and phages are changing – bacteria can evolve resistance to phage attack and defend themselves against phage infections and phage can increase infectivity against bacteria. This process is called coevolution and causes genetic and phenotypic changes. We know two types of coevolution: arms race dynamic and fluctuating selective dynamic. Bacteria have evolved a number of defense mechanisms against phages, including prevention of phage adsorption, prevention of phage DNA entry, cutting phage nucleic acid or initiation of cell death upon infection. Phages have been known to evolve mechanisms to evade bacteria defence and increase infectivity. Continuous processes have the best conditions for coevolution because bacteria and phage are in interaction long enough to start the process of coevolution. Plasmids, mutations rates, shaking growth culture, bacterial and phage migrations and abiotic factors like fluctuating environment affect the bacteria-phage coevolution. Bacteria-phage coevolution process is also exploited at bacteriophage therapy.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 ZNAČILNOSTI BAKTERIOFAGOV</b>	<b>2</b>
2.1 ŽIVLJENJSKI CIKEL BAKTERIOFAGOV	2
<b>3 KOEVOLUCIJA</b>	<b>4</b>
3.1 KOEVOLUCIJA BAKTERIJ IN BAKTERIOFAGOV	4
3.2 ASIMETRIJA EVOLUCIJSKEGA POTENCIALA	4
3.3 ARMS RACE IN NIHAJOČA SELEKCIJSKA DINAMIKA	5
<b>4 MEHANIZMI KOEVOLUCIJE BAKTERIJ IN BAKTERIOFAGOV</b>	<b>6</b>
4.1 PREPREČEVANJE ADSORPCIJE BAKTERIOFAGOV NA RECEPTOR	6
4.1.1 <b>Blokiranje bakteriofagnih receptorjev</b>	<b>6</b>
4.1.2 <b>Produkcija ekstracelularnega matriksa</b>	<b>6</b>
4.1.3 <b>Produkcija kompetetivnih inhibitorjev</b>	<b>6</b>
4.2 PREPREČEVANJA VSTOPA BAKTERIOFAGNE DNK V GOSTITELJSKO CELICO	6
4.2.1 <b>Sie sistem v gram pozitivnih celicah</b>	<b>6</b>
4.2.2 <b>Sie sistem v gram negativnih celicah</b>	<b>7</b>
4.3 REZANJE BAKTERIOFAGNIH NUKLEINSKIH KISLIN	7
4.3.1 <b>Restriksijsko-modifikacijski sistem</b>	<b>7</b>
4.3.2 <b>CRISPR sistem</b>	<b>8</b>
4.4 SPROŽENJE CELIČNE SMRTI PO INFEKCIJI	9
<b>5 GOJENJE BAKTERIOFAGOV</b>	<b>10</b>
<b>6 KOEVOLUCIJA V BIOREAKTORJU</b>	<b>11</b>
6.1 KOEVOLUCIJA V KONTINUIRNEM BIOREAKTORJU – KEMOSTATU	11
6.2 VPLIVI NA KOEVOLUCIJO	12
<b>7 POMEN KOEVOLUCIJE BAKTERIJ IN BAKTERIOFAGOV</b>	<b>13</b>
7.1 BAKTERIOFAGNA TERAPIJA	13
<b>8 ZAKLJUČEK</b>	<b>15</b>
<b>9 VIRI</b>	<b>16</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Replikacija bakteriofagov (Buckling in Brockhurst, 2012: 349).....	3
Slika 2: Prikaz arms race dinamike in nihajoče selekcijske dinamike (Buckling in Brockhurst, 2012: 347).....	5
Slika 3: Sie sistem v gram pozitivnih celicah. a) DNK vstopi v celico. b) Imm spremeni konformacijo membrane, DNK ne vstopi. c) Sp inaktivira lizosom bakteriofaga, zato ne more razgraditi peptidoglikana, DNK ne vstopi (Labrie, 2010: 320).....	7
Slika 4: Graf gostote bakteriofagov (rdeča črta) in bakterij (modra črta) v kemostatu. Puščica prikazuje čas, ko se pojavijo rezistenčne bakterije (Bohannan in Lenski, 2000: 367)...	11

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DNK - deoksiribonukleinska kislina

RNK - ribonukleinska kislina

AR - arms race

*E. coli* - *Escherichia coli*

Sie sistem - superinfekcijski izključitveni sistem (Superinfection exclusion system)

R-M sistem - restriksijsko-modifikacijski sistem (Restriction–modification systems)

HMC - hidrometilcitozin

CRISPR - Clustrered Interspaced Short Palindromic Repeats

Bp - bazni par

Abi - Abortive infection system

LPS - lipopolisaharid

## 1 UVOD

V tem diplomskem delu se bomo osredotočili na koevolucijo med bakterijami in bakteriofagi. Na začetku so predstavljeni bakteriofagi in njihov življenjski cikel, nato je opisana koevolucija in njeno delovanje, sledijo mehanizmi, ki omogočajo spreminjanje in prilagajanje bakterij in njihovih bakteriofagov. V drugem delu je na kratko predstavljeno splošno gojenje bakteriofagov, koevolucija v bioreaktorju ter dejavniki, ki spodbujajo oziroma omejujejo koevolucijo. Na koncu je opisan pomen koevolucijskih odnosov med bakterijami in bakteriofagi.

Koevolucija je proces, prisoten v naravnem okolju in pomeni vzajemno prilagajanje dveh vrst, ki sta v medsebojni interakciji, v našem primeru so to bakterije in bakteriofagi. Prvi jo je omenjal že Charles Darwin, ko je opazoval interakcije med cvetovi orhideje *Angraecum sesquipedale* in moljem *Xanthopan morgani praedicta* (Arditti in sod., 2012). Kmalu po odkritju bakteriofagov in njihovem delovanju, so ugotovili, da je koevolucija prisotna tudi med tema dvema organizmoma.

Bakteriofagi so virusi, ki okužujejo bakterijske celice in se, tako kot ostali virusi, lahko razmnožujejo le v gostiteljski celici. So vrstno specifični, kar pomeni, da lahko okužijo le bakterijsko celico, ki ima na svoji površini izpostavljen določen receptor.

Razmnoževalni virusni cikel poteče v petih korakih: pritrjevanje virusa na gostiteljsko celico, vstop virusne nukleinske kisline v celico, sinteza virusnih nukleinskih kislin in proteinov, izgradnja in pakiranje novih virusov ter celična liza in izpust novih virionov v okolje. Bakterije imajo mehanizme, ki preprečijo razmnoževanje virusa na različnih korakih. Lahko preprečijo pritrjevanje bakteriofagov na bakterijsko celico, preprečijo vstop bakteriofagne DNK v gostiteljsko celico, lahko režejo in uničijo bakteriofagne nukleinske kisline ali pa po bakteriofagni infekciji sprožijo celično smrt (Labrie in sod., 2010). Bakteriofagi na takšne fenotipske spremembe odgovarjajo s spremembami, ki omogočajo ponovno okužbo celice.

Takšne spremembe in prilagajanje obeh organizmov je vodilo koevolucije – tako v *in vivo* ter *in vitro* pogojih. Koevolucijo je lažje spremljati v bioreaktorju, kjer imamo kontrolirane pogoje in v okolju ni ostalih organizmov, ki bi potencialno lahko preprečili koevolucijo in omogočili sobivanje brez interakcij. V laboratorijskih pogojih nam najlažje spremljanje koevolucije omogoča kemostat, saj proces v njem traja dalj časa kot v zaprtem bioreaktorju in je tudi izpostavljenost bakterij in bakteriofagov daljša.



## 2 ZNAČILNOSTI BAKTERIOFAGOV

Bakteriofagi so, kot ostali virusi, obligatorni intracelularni paraziti, ki okužijo in se razmnožuje le v bakterijski celici (Madigan in sod., 2015). Večina jih je sestavljena iz glave, vratu ter repa. Delijo se v skupine glede na njihovo morfologijo, vsebnost nukleinskih kislin (DNK ali RNK), specifičnega gostitelja, okolje, kjer živijo ter glede na življenjski cikel (lizogeni ali litični) (Wittebole in sod., 2014). Virion je virusni delec, ki je zmožen okužiti celico. V notranjosti vsebuje genetski material v obliki enoverižne ali dvoverižne RNK oziroma DNK verige v ciklični ali linearni obliki, obdaja ga proteinska kapsida. Virion lahko vsebuje encime, ki so pomembni za infekcijo bakterij in razmnoževanje v njej (Madigan in sod., 2015).

Bakteriofagi za razmnoževanje nujno potrebujejo živo gostiteljsko celico, saj se v njej sintetizirajo esencialne komponente za izgradnjo novih virionov. Praviloma okužijo le specifično vrsto ali celo samo specifičen sev bakterij. Vrsto in sevno specifičnost določajo beljakovinske in ogljikohidratne površinske strukture na bakterijskih celicah, ki jih bakteriofag izkorišča za receptorje, na katere se pritrdijo (Bratkovič in Preželj, 2008). Pomembna je tudi razporeditev receptorjev na celični steni, njihova številčnost in gostota. Receptorji na gram negativnih in gram pozitivnih bakterijah so drugačni (Rakhuba in sod., 2010).

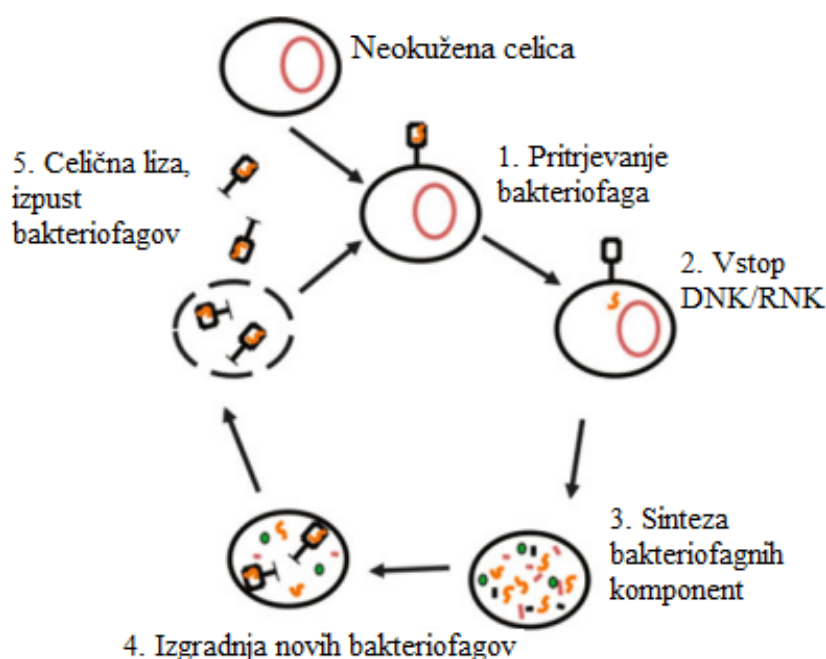
### 2.1 ŽIVLJENJSKI CIKEL BAKTERIOFAGOV

Replikacija virusov poteče v petih korakih: pritrdjevanje virusa na gostiteljsko celico, vstop virusne nukleinske kisline v celico, sinteza virusnih nukleinskih kislin in proteinov, izgradnja in pakiranje novih virusov ter celična liza in izpust novih virionov v okolje.

Pritrdjevanje virusa na gostiteljsko celico je ključni korak pri specifičnosti bakteriofagov. Virion ima na površini enega ali več proteinov, ki se vežejo na bakterijske receptorje. Če so receptorji spremenjeni ali mutirani, se virus ne more vezati in ne pride do pritrditve in okužbe bakterije. Receptorji so lahko beljakovinske, ogljikohidratne, lipidne ali lipoproteinske strukture, ki imajo poleg receptorske vloge tudi vlogo pri delovanju bakterijske celice (Madigan in sod., 2015).

Vstop virusne nukleinske kisline v celico je posledica pritrdjevanja virusa, ki spremeni tako površino virusa kot površino bakterijske celice. Če penetracija v celico ni uspešna, virus ne more nadaljevati svojega življenjskega cikla (Rakhuba in sod., 2010). V celico vstopi le bakteriofagna nukleinska kislina, kapsida pa ostane na zunanji strani celice. Če ima bakteriofag rep (npr. T4 bakteriofag), se nukleinska kislina prenese preko repnega kanalčka (Madigan in sod., 2015).

Kdaj se začne sinteza virusnih nukleinskih kislin in proteinov je odvisna od vrste virusa – ali je virus litični ali lizogeni. Litični virusi povzročijo izražanje zgodnjih bakteriofagnih genov, ki preusmerijo delovanje celice v sintezo virusne DNK ali RNK in proteinov. Sledi izgradnja in pakiranje novih virusov ter celična liza, ki omogoči izpust novih bakteriofagov. Lizogeni virusi svoj genetski material vgradijo v bakterijski kromosom, kjer ostane daljše časovno obdobje in se podvaja kot del kromosoma, dokler se ne inducira litični cikel. Virusni genetski material se v lizogenem ciklu lahko s transdukcijo prenaša tudi med celicami (Wittebole in sod., 2014).



Slika 1: Replikacija bakteriofagov (Buckling in Brockhurst, 2012: 349)

### 3 KOEVOLUCIJA

Koevolucija je vzajemno prilagajanje dveh vrst, navadno gostitelja in parazita, ki sta v ekološki interakciji. Odraža se v genotipskih in fenotipskih spremembah skozi časovno obdobje – spreminja se gostiteljska odpornost na parazita ter infektivnost parazita (Scanlan, 2017).

#### 3.1 KOEVOLUCIJA BAKTERIJ IN BAKTERIOFAGOV

Bakterijsko-bakteriofagna koevolucija igra pomembno vlogo v genotipski in fenotipski raznovrstnosti znotraj populacije. Bakterijsko-bakteriofagni sistemi so zelo dinamični in posledično je tudi koevolucija v takih sistemih hitra. Posledica koevolucije je ohranjanje bakterijske oziroma sevne raznolikosti v genomih, v populaciji, med populacijami ter v združbi. Bakteriofagi med bakterijami spodbujajo horizontalni prenos genov in vplivajo na bakterijski fenotip. Bakterije razvijejo odpornost na bakteriofag z *de novo* mutacijami ali z drugimi mehanizmi, s katerimi se branijo okužbe bakteriofaga. Mutacije lahko vsebujejo modifikacije elementov na površini bakterije, na katere se pritrdijo virusi (Koskella in Brockhurst, 2014).

»Host range mutacija« je mutacija, ki bakterijam omogoči rezistenco in bakteriofagu prepreči infekcijo. Temu sledi razvitje mutacije v bakteriofagu, kar omogoča drugačen način infekcije. Cikel se ponavlja (Koskella in Brockhurst, 2014). »Host range« je poimenovanje za spekter sevov bakterij, ki jih bakteriofag lahko okuži (Hall in sod., 2011b).

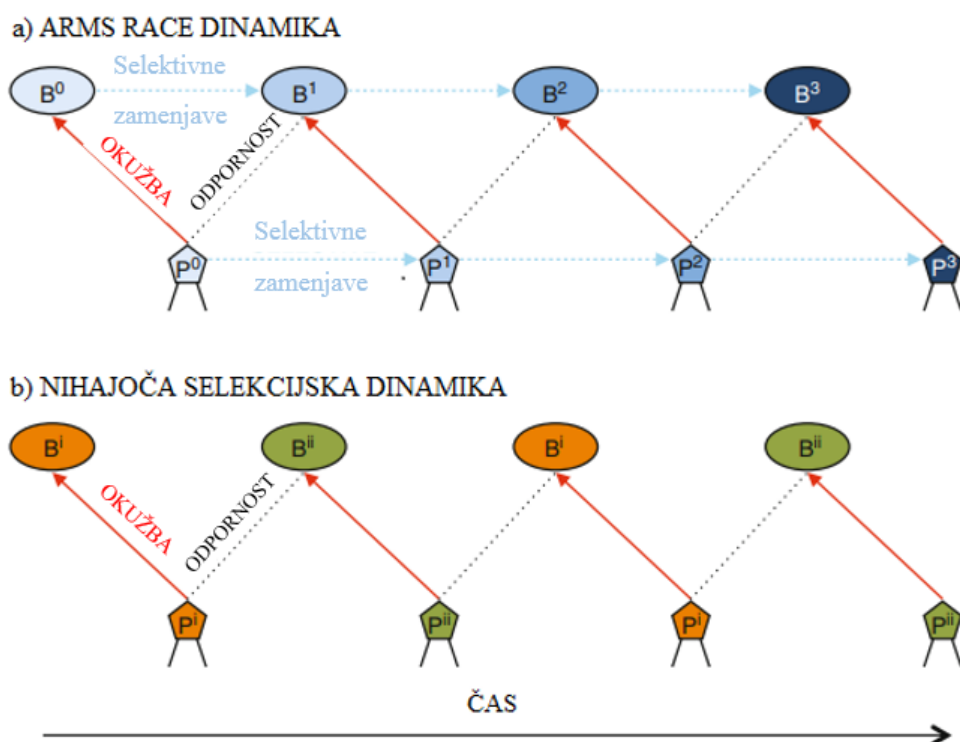
#### 3.2 ASIMETRIJA EVOLUCIJSKEGA POTENCIALA

Evolucijski potencial je odvisen od mutacij, migracij in rekombinacij. Ni zadostna le hitrost le-teh, ampak je pomembna tudi številčnost, zato evolucijski potencial temelji na velikosti populacije (Gandon in Michalakis, 2002). Med bakterijami in bakteriofagi je prisotna asimetrija evolucijskega potenciala. Bakterije imajo večji evolucijski potencial kot bakteriofagi, saj lahko odpornost razvijejo enostavneje. Veliko bakterijskih mutacij vodi do spremembe ali izgube receptorja, mutacije pri bakteriofagu pa so zahtevnejše, saj se mora prilagoditi tako, da se je zmožen vezati na drugačen receptor (Koskella in Brockhurst, 2014). Bakterije imajo večje populacije, hitrejše stopnjo mutacije in večji genom, kar jim omogoča večji evolucijski potencial, saj imajo več možnih tarčnih genov, ki lahko mutirajo, da pride do rezistence. Velikost populacije bakteriofagov je odvisna od bakterijske – če bakterija razvije rezistenco, se bakteriofagi ne morejo vezati nanje in posledično je preprečena reprodukcija bakteriofagov, kar pomeni, da se njihova populacija manjša. K temu pripomore tudi slabši evolucijski potencial (Dennehy, 2012).

### 3.3 ARMS RACE IN NIHAJOČA SELEKCIJSKA DINAMIKA

»Arms race dinamika« (v nadaljevanju AR dinamika) je značilna za koevolucijo med bakterijami in bakteriofagi. Narekuje zamenjavo genotipa, kar se odraža v neprestanih izboljšavah v obeh populacijah tekom sobivanja (Dennehy, 2012). Značilna je za kratkotrajne poskuse, nihajoča selekcijska dinamika pa se obdrži tudi daljše časovno obdobje. AR dinamika usmerja razvoj bakterij in bakteriofagov k vedno večji rezistenci gostiteljev oziroma infektivnosti patogenov. Prevladuje usmerjena selekcija in zaporedne selektivne zamenjave, ki vodijo do kopičenja genov za odpornost pri bakterijah ali genov za virulenco pri bakteriofagih. Gostitelji so odporni na vse pretekle genotipe parazitov, paraziti pa so zmožni okužiti vse pretekle genotipe gostiteljev (Betts in sod., 2014).

AR dinamika se ne more nadaljevati v neskončno, saj zahteva vedno nove mutacije in adaptacije, to pa predstavlja velik energijski vložek za bakterijo oziroma bakteriofaga. Zato se skozi daljše časovno obdobje pojavljajo nihanja – temu pravimo nihajoča selekcijska dinamika. Infektivnost parazitov in odpornost gostiteljev se sprva hitro spreminja, narašča, a s časom se stanje umiri in stabilizira; AR dinamika se umirja, kljub temu pa se fenotipska raznolikost ohranja; začne se nihajoča selekcijska dinamika, poimenovana tudi »Red Queen dinamika« (Hall in sod., 2011b). Značilna so nihanja v prisotnosti genov za odpornost in za virulenco, kar povzroča povprečno in nespremenljivo infektivnost ter odpornost (Betts in sod., 2014).



Slika 2: Prikaz arms race dinamike in nihajoče selekcijske dinamike (Buckling in Brockhurst, 2012: 347)

## **4 MEHANIZMI KOEVOLUCIJE BAKTERIJ IN BAKTERIOFAGOV**

### **4.1 PREPREČEVANJE ADSORPCIJE BAKTERIOFAGOV NA RECEPTOR**

Bakteriofag mora prepoznati specifične strukture na površini gostiteljske celice, ki se med seboj razlikujejo po sestavi celične membrane in stene. Bakterije so razvile številne ovire, ki preprečujejo adsorpcijo bakteriofaga na gostitelja. Lahko jih razdelimo v tri skupine: blokiranje bakteriofagnih receptorjev, produkcija ekstracelularnega matriksa in produkcija kompetitivnih inhibitorjev (Labrie in sod., 2010).

#### **4.1.1 Blokiranje bakteriofagnih receptorjev**

Mehanizem blokiranja bakteriofagnih receptorjev temelji na bakterijskem modificiranju receptorjev. Bakteriofagi se prilagodijo in prepoznavajo nove ali drugačne receptorje. Bakterija *Staphylococcus aureus* proizvaja protein A, ki, če je vezan na površino bakterijske celice, prekrije bakteriofagne receptorje in tako prepreči vezavo nanje (Nordström in Forsgren, 1974).

#### **4.1.2 Produkcija ekstracelularnega matriksa**

Produkcija ekstracelularnega matriksa lahko bakterijo ščiti pred neugodnimi okoljskimi razmerami, v nekaterih primerih pa zagotavlja fizično prepreko med celičnim receptorjem in bakteriofagom. Bakteriofagi so se prilagodili in lahko zaznajo ekstracelularne polimere ter jih razgradijo z encimi. Poznani so encimi dveh vrst, ki razgrajujejo ekstracelularni matriks, in sicer hidrolaze in liaze (Labrie in sod., 2010).

#### **4.1.3 Produkcija kompetitivnih inhibitorjev**

Molekule, ki so naravno prisotne v celičnem okolju lahko delujejo kot kompetitivni inhibitor in se vežejo se na receptorje ter preprečijo vezavo bakteriofagu (Labrie in sod., 2010).

### **4.2 PREPREČEVANJA VSTOPA BAKTERIOFAGNE DNK V GOSTITELJSKO CELICO**

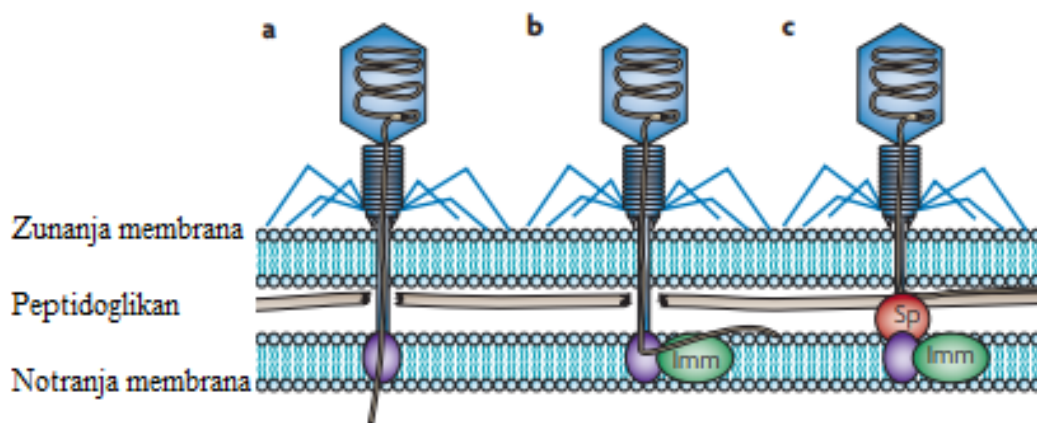
Sie sistem oziroma superinfekcijski izključitveni sistem sestavljajo proteini, ki blokirajo vstop DNK. Ti proteini naj bi bili zasidrani v membrani ali povezani z membranskimi komponentami. Sie sistem je tudi pomemben za interakcije med bakteriofagi, zato so jih našli tudi v bakteriofagih (Labrie in sod., 2010).

#### **4.2.1 Sie sistem v gram pozitivnih celicah**

Sie sistem se razlikuje po delovanju v gram pozitivnih in gram negativnih bakterijah. Sie sistem v gram negativnih bakterijah deluje tudi v Coliphagu T4, ki je specifičen za *E. coli*. Je

dobro okarakteriziran bakteriofag, ki vsebuje dva Sie sistema: imm in sp, ki hitro preprečita vstop bakteriofagne DNK v notranjost celice. Protein imm je protein kodirajoči gen, ki povzroči spremembo konformacije površine na membrani, tako da virusna DNK ne vstopi v gostiteljsko celico, ampak ostane v periplazmi in se razgradi. Protein sp je protein kodirajoči gen, ki povzroča hitro lizo bakteriofaga in omogoča preživetje bakterije.

Mehanizma delujeta ločeno in imata različne načine delovanja. Protein imm spremeni konformacijo površine, kamor se bakteriofag pritrdi. Lokaliziran je na membrani in za delovanje mora biti nujno povezan z drugimi membranskimi proteini. Protein sp inaktivira aktivnost lizosoma bakteriofaga, zato je preprečena razgradnja peptidoglikanov bakterijske celične stene in posledično vstopa DNK v bakterijo ni. Lizosom je v bakteriofagu lociran v vratu in v celično steno gostitelja naredi luknje (Lu in Henning, 1994).



Slika 3: Sie sistem v gram pozitivnih celicah. a) DNK vstopi v celico. b) Imm spremeni konformacijo membrane, DNK ne vstopi. c) Sp inaktivira lizosom bakteriofaga, zato ne more razgraditi peptidoglikana, DNK ne vstopi (Labrie, 2010: 320)

#### 4.2.2 Sie sistem v gram negativnih celicah

Mehanizem sistema Sie je bil v gram pozitivnih bakterijah dokazan malokrat. Našli so ga pri bakteriji *Lactococcus lactis*, ki se uporablja v industrijski procesih fermentacije mleka. Sie<sub>2009</sub> gen je lociran na lizogenem modulu bakteriofaga Tuc2009, ki je specifičen za bakterije rodu *Lactococcus*. Sie<sub>2009</sub> naj bi bil lokaliziran v membrani in naj bi preprečeval prenos DNK v bakterijsko celico (McGrath in sod., 2002). Sie sistem je bil najden tudi v bakteriofagu bakterije *Streptococcus thermophilus* (Labrie in sod., 2010).

### 4.3 REZANJE BAKTERIOFAGNIH NUKLEINSKIH KISLIN

#### 4.3.1 Restriksijsko-modifikacijski sistem

Rezanje bakteriofagnih nukleinskih kislin izvaja restriksijsko-modifikacijski sistem oziroma R-M sistem, ki temelji na proteinih, razdeljenih v štiri skupine. R-M sistem ščiti bakterijo

pred vdorom bakteriofagne DNK in deluje na vso znotrajcelično DNK. Ko nemetilirana bakteriofagna DNK vstopi v območje R-M sistema, jo bodo prepoznali restriksijski encimi in jo hitro uničili. Če pa jo DNK restriktaze ne prepoznajo in vstopi v celico, se bakteriofag vgradi v bakterijsko DNK in nukleinska kislina bakteriofaga se v enem celičnem ciklu s pomočjo bakterijskih metilaz specifično metilira in se izogne restrikciji, saj je restriksijski encimi ne prepoznajo več (Labrie in sod., 2010).

Obstajajo štiri skupine R-M sistemov, razlikujejo se glede na kompleksnost encimskega kompleksa in mehanizem delovanja. Najpogostejši je sistem tipa II. Encimi prepoznajo enostavna in simetrična zaporedja in režejo DNK na stalnih mestih, glede na njihovo prepoznavno mesto. Endonukleaze in metilaze so v različnih molekulah, potreben je le  $Mg^{2+}$  kot kofaktor. Sistem tipa I je kompleksna molekula, ki vsebuje 3 podenote; endonukleaza, metilaza in prepoznavna enota, sistem III pa dve enoti; endonukleazo in metilazno-prepoznavna enota. Z mutacijami se lahko R-M sistem izgubi ali spremeni. Bakteriofagi so razvili obrambne mehanizme, da se izognejo restrikciji (Krüger in Bickle, 1983).

Sistem vsebujeta dva encima: restriksijski encim in metilazo. Usoda DNK je odvisna od hitrosti delovanja teh dveh encimov. Restriktaza je navadno bolj aktivna, zato se bakteriofagna DNK uniči. Če pa se metilira, jo restriktaza ne zazna več in lahko nemoteno vstopa v celice, ki imajo enak R-M sistem kot originalna bakterija. Ko pa enkrat inficira celico z drugačnim R-M sistemom, je bakteriofagna DNK zanj nemetilirana in jo restriktaza spet prepozna. Bakteriofagi so razvili odpornost na R-M sistem: pomanjkanje prepoznavnih mest za restriksijske encime/endonukleaze zaradi točkovnih mutacij. Zaporedje vsebuje namesto citozina, ki ga prepozna restriktaza, nenavadno bazo, hidrometilcitozin (HMC). Bakterije so se skozi koevolucijo prilagodile in lahko zaznavajo modificirane bakteriofagne DNK molekule (Labrie in sod., 2010).

#### 4.3.2 CRISPR sistem

Nedavno odkrita CRISPR zaporedja igrajo pomembno funkcijo v zagotavljanju odpornosti na bakteriofage. Lokus CRISPR (Clustred Interspaced Short Palindromic Repeats) vsebuje kratke »spacer« sekvence, ki so lahko dolge med 29 in 31 bp, vendar največkrat obsegajo 30 bp (Deveau in sod., 2007). Spacer sekvence se prilegajo določenim zaporedjem na bakteriofagnih nukleinskih kislinah, imenovanih »proto-spacer« sekvence, ki jih ciljajo in razgradijo (Buckling in Brockhurst, 2012). Po okužbi bakteriofaga, bakterija vgradi novo »spacer« sekvenco, prilegajočo bakteriofagnemu zaporedju in s pomočjo *cas* gena razvije rezistenco proti bakteriofagu. Odstranjevanje in dodajanje spacer sekvenc spreminja odpornost bakterije na parazita (Barrangou in sod., 2007). Bakteriofagi lahko dosežejo odpornost na CRISPR obrambni sistem, in sicer z mutacijami, rekombinacijami in spremembami v proto-spacer sekvencah (Deveau in sod., 2007).

#### 4.4 SPROŽENJE CELIČNE SMRTI PO INFEKCIJI

Bakterijska celica po infekciji povzroči celično smrt in tako blokira bakteriofagno replikacijo in pred okužbo zavaruje ostale celice v koloniji. Temu mehanizmu pravimo Abi – »Abortive infection system«. Sistem je sestavljen iz dveh komponent: toksična komponenta, ki povzroči smrt celice in protistrupna komponenta, ki v celici zadržuje toksični del, dokler ga celica ne uporabi. Bakteriofagi so razvili kodirajoče sekvence za ekspresijo komponent, ki so podobne protistrupnim komponentam v bakterijski celici. S tem je omogočeno podvojevanje virusov, saj se toksične komponente v bakteriji ne sprožijo, ker jih zadržujejo protistrupnim komponentam podobni proteini (Blower in sod., 2012).



## 5 GOJENJE BAKTERIOFAGOV

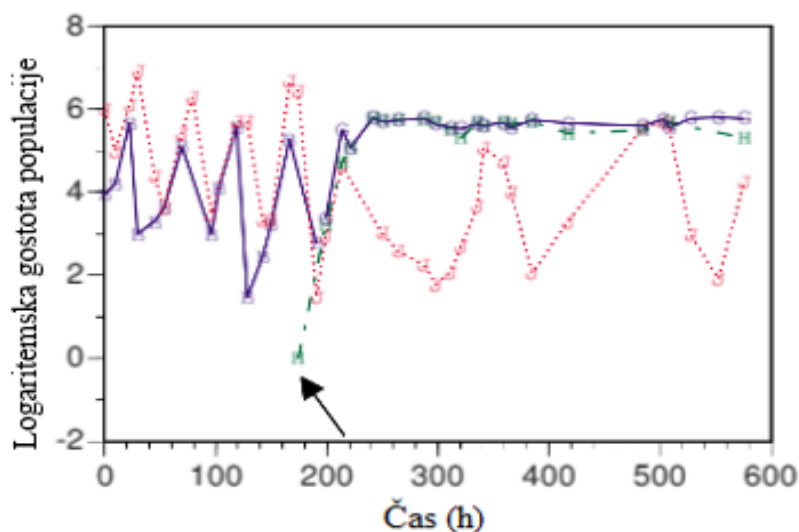
Bakteriofage se najpogosteje goji v zaprtem bioreaktorju z enkratnim polnjenjem (batch proces), ki s sabo prinaša dobre in slabe strani. Dobre lastnosti zaprtega procesa so, da so titri bakteriofagov visoki, bakteriofagi so robustni, kontrola je enostavna in ni problemov s predolgimi zadrževalnimi časi v bioreaktorju. Slabe strani takšnega gojenja so, da je časovno in energetsko neučinkovit, saj porabimo veliko časa, energije, delovne sile in sredstev za zagon in zaključek bioprocesa ter za ponovno sterilizacijo bioreaktorja (Sauvegeau in Cooper, 2010). Da bi se izognili slabostim zaprtega gojenja bakteriofagov, so razvili kontinuirni proces v kemostatu. V kemostatu je težko vzdrževati stabilnost in konsistentnost, pogoste so tudi okužbe kulture. Stabilnost je mogoče doseči le, če je vzpostavljeno ravnovesje med stopnjo proizvodnje bakteriofaga in stopnjo pretoka oziroma hitrostjo redčenja. Pri preveliki hitrosti redčenja se lahko bakterijske celice prehitro izpirajo iz bioreaktorja, kar vodi do zmanjšanja produktivnosti bakteriofagov. Če je hitrost redčenja prepočasna pa bakterijske celice ostanejo v bioreaktorju dolgo in pride do koevolucije in razvitja rezistence. Dobra lastnost kontinuirnega procesa je, da dobimo več produkta na enoto časa, saj med pripravljalnimi in zaključnimi procesi poteče več časa kot pri zaprtem procesu (Sauvegeau in Cooper, 2010).

Boljša različica kontinuirnega procesa je dvostopenjski kontinuirni proces. Vsebuje dva bioreaktorja, ki sta med sabo povezana. V prvem se kultivira samo bakterijska kultura, drug pa vsebuje bakterije in bakteriofage. Cikel se začne, ko sveže celice iz prvega bioreaktorja napolnijo drugega. Ustvarili so tudi dvostopenjski kontinuirni proces s samoreciklažo, ki zagotavlja semi-kontinuirno žetev bakteriofagov, kar poveča proizvodnjo produkta na enoto časa. Izkoristek je bil v vsaki žetvi večji kot v zaprtem sistemu (Sauvegeau in Cooper, 2010).

## 6 KOEVOLUCIJA V BIOREAKTORJU

### 6.1 KOEVOLUCIJA V KONTINUIRNEM BIOREAKTORJU - KEMOSTATU

Že zgodnji poskusi so dokazali, da so mikroorganizmi v kontinuirnih procesih bolj dovzetni za mutacije. V kemostatu so bakterije in bakteriofagi nenehno izpostavljeni eden drugemu in posledično je evlucijski pritisk velik, kar poveča frekvenco mutacij tako pri bakterijah kot pri bakteriofagih. Zato so kemostati nepogrešljivi pri preučevanju bakterijsko-bakteriofagne koevolucije. Ravno to pa je glavni razlog, da kemostati niso primerni za dolgoročno gojenje bakteriofagov (Mizoguchi in sod., 2002).



Slika 4: Graf gostote bakteriofagov (rdeča črta) in bakterij (modra črta) v kemostatu. Puščica prikazuje čas, ko se pojavijo rezistenčne bakterije (Bohannon in Lenski., 2000: 367)

Preučevanje bakteriofaga PP07 in *E. coli* v kontinuirni kulturi je pokazalo, da se najprej pri bakterijah pojavi rezistenca in posledično se koncentracija bakterij v bioreaktorju poveča. Bakterije spremenijo obliko kolonije, ekspresijo proteinov LPS in OmpC, ki delujeta kot receptor za bakteriofag. Bakteriofagi se prilagodijo na spremembe in lahko lizirajo tudi spremenjene bakterije. V kontinuirnem bioreaktorju se bakterije in bakteriofagi prilagajajo eden na drugega in adaptirajo, kar se razvija v AR dinamiko (Mizoguchi in sod., 2002).

Z uporabo bakteriofagnega koktejla pri kontinuirnem gojenju, lahko podaljšamo čas, ko pride do rezistence bakterij. Koktejl bakteriofagov ponavadi vsebuje 3 različne bakteriofage, ki specifično delujejo na bakterijsko celico. Koktejl bakteriofagov EP16, SP22 in PP17 so gojili v kontinuirni anaerobni kulturi z *E. coli* kot laboratorijski model sesalskega prebavnega trakta. Na začetku se je povišala koncentracija bakterij, ki je s časoma upadla. Ravnovesje med bakteriofagi in bakterijami so dosegli po 30-ih urah (Kunisaki in Tanji, 2010).

V kontinuirnem bioreaktorju pa lahko, zaradi nastanka biofilmov na stenah bioreaktorja, pride tudi do stabilnega stanja, kjer ni interakcij med bakterijami in bakteriofagi (Dennehy, 2012).

## 6.2 VPLIVI NA KOEVOLUCIJO

Na koevolucijo ima vpliv prisotnost oziroma odsotnost plazmidov v bakteriji, hitrost bakterijskih mutacij, mešanje in stresanje gojene populacije, migracije bakterij in bakteriofagov ter abiotski dejavniki, npr. razpoložljivost hranil in nihanje temperature.

Plazmidi omejujejo koevolucijo bakterij in bakteriofagov. Povzročijo, da bakterija s plazmidom počasneje razvijejo odpornost proti bakteriofagu kot bakterija brez plazmida in na drugi strani bakteriofag razvije šibkejšo virulenco, kot če bi bil gojen v pogojih brez plazmida. Do tega pride, ker vzdrževanje plazmida v bakteriji zahteva energijo in posledično je razvoj odpornosti energijsko še potratnejši (Harrison in sod., 2015).

Z večanjem produktivnosti oziroma s krajšanjem generacijskih časov bakterij se bakterije in bakteriofagi spreminjajo hitreje in posledično je tudi koevolucija hitrejša. Z večjo produktivnostjo se poveča velikost populacije in z njo je na razpolago več možnosti za različne genetske variacije za razvitje različnih rezistenc in infektivnosti. S tem se posledično zviša tudi stopnja koevolucije.

Tudi z občasnim mešanjem in stresanjem ter z visoko vsebnostjo hranil lahko zvišamo stopnjo koevolucije (Lopez-Pascua in Buckling, 2008). Okolje z visoko vsebnostjo hranil omogoča visoko gostoto bakterij in bakteriofagov, kar privede do večje stopnje srečevanja bakterij in bakteriofagov ter posledično več mutacij (Buckling in Brockhurst, 2012).

Vpliv na koevolucijo imajo tudi migracije bakterij in bakteriofagov. Istočasne migracije bakterij in bakteriofagov stopnjujejo pojavnost odpornosti pri bakterijah in virulentnosti pri bakteriofagih. Migracije le bakteriofagov povečajo infektivnost in območje infekcije, torej lahko okužijo širši spekter bakterij, medtem ko migracije samo bakterij nimajo vpliva na večanje ali zmanjšanje rezistence (Vogwill in sod., 2008). Migracije iz območij z veliko interakcij, lahko zvišajo hitrost koevolucije v območjih, z malo interakcijami, medtem ko migracije v obratni smeri upočasnijo koevolucijo (Vogwill in sod., 2009).

Vpliv na koevolucijo imajo tudi nihanja pogojev v okolju. Nihanja dostopnosti in odsotnosti hranilnih snovi prizadenejo predvsem bakterijsko populacijo (Harrison in sod., 2013), medtem ko nihanje temperature v okolju prizadene populacijo bakteriofagov. Nihanje temperature med 28 °C in 32 °C pri nizkih frekvencah (temperatura se spreminja po 4 oziroma 8 dneh) je povzročila nastajanje območji z malo interakcijami, kar je posledično upočasnilo koevolucijo, saj je visoka temperatura onesposobila bakteriofage. Poleg tega višja temperatura povzroči spreminjanje bakterijskih proteinov na celični steni, ki služijo kot bakteriofagni receptorji. Nihanje temperature med 28 °C in 32 °C pri visokih frekvencah (temperatura se spreminja vsake 2 dni) pa je povzročila nastanek območji z mnogimi interakcijami in posledično visoko stopnjo koevolucije (Duncan in sod., 2017).

## 7 POMEN KOEVOLUCIJE BAKTERIJ IN BAKTERIOFAGOV

### 7.1 BAKTERIOFAGNA TERAPIJA

Bakteriofagna terapija je ena izmed najobetavnejših alternativ antibiotikom. Po desetletjih množične uporabe antibiotikov, so bakterije razvile rezistenco proti njimi. Odporni sevi se pojavljajo vse pogosteje in pri okužbah s takimi sevi, pridobljenih zlasti v bolnišnicah, antibiotiki pogosto ne delujejo učinkovito (Örmälä in Jalasvuori, 2013). Ena izmed možni rešitev bi lahko bila bakteriofagna terapija, ki kot protimikrobno sredstvo uporablja bakteriofage, ki delujejo tarčno specifično in ne uničijo naravno prisotnih mikroorganizmov v telesu, se pa, za razliko od antibiotikov, prilagajajo skupaj z bakterijami (Chan in sod., 2013). Največji problem učinkovitosti bakteriofagne terapije je, da bakterije v laboratorijskih pogojih zelo hitro razvijejo rezistenco proti njim. Skrb vzbujajoči so pomisleki, da lahko po dolgoročni uporabi bakteriofagne terapije pričakujemo enak rezultat kot pri antibiotikih – neučinkovitost zaradi nezmožnosti okužbe rezistentnih bakterij (Örmälä in Jalasvuori, 2013).

Nekateri vidijo rešitev v uporabi bakteriofagnih koktejllov, ki vsebujejo tri vrste bakteriofagov, ki specifično delujejo na isto bakterijo. S tem bi se zmanjšalo in upočasnilo pojavljanje odpornih bakterij in povečala bi se litična učinkovitost bakteriofagov. Za akumulacijo dovolj mutacij, ki bi povzročile odpornost bakterije proti trem bakteriofagom, je potrebno več časa, vendar se sčasoma vseeno pojavi (Gu in sod., 2012).

Velika razlika v uporabi antibiotikov in bakteriofagov je, da se bakteriofagi lahko odzivajo na spremembe odpornosti bakterij (Betts in sod., 2013), kar prispeva k večji virulenci. To je bilo dokazano na več patogenih, vključujoč tudi človeške: *E. coli*, *Serratia marcescens* in *Staphylococcus aureus*. To se zgodi, če bakterijske mutacije spremenijo virulentne faktorje ali pa je zmanjšano število bakterij, ker se energija usmeri v nastajanje mutacij in manj v reprodukcijo (Scanlan in sod., 2015). Za hitrejšo adaptacijo bakteriofagov na mutirane gostitelje, so poskusili s preadaptacijskimi *in vitro* poskusi. Bakterijo *Pseudomonas aeruginosa* in njen bakteriofag so gojili v serijskih pasajah in opazovali vpliv bakteriofagov na začetno bakterijsko kulturo. Bakteriofagi so se razlikovali po času, ko so bili izpostavljeni koevoluciji z bakterijo oziroma preadaptaciji. Rezultati so pokazali, da so bakteriofagi, ki so bili dalj časa izpostavljeni preadaptaciji, povečali spekter sevov bakterij, ki jih lahko okužijo (Hall in sod., 2011a) in povečali virulenco (Betts in sod., 2013).

Bakteriofagna terapija ima potencial za zdravljenje človeških in živalskih bakterijskih okužb, na trgu pa so že bakteriofagi, ki delujejo kot biokontrolno sredstvo pri proizvodnji hrane (Chan in sod., 2013). Uporabljajo se za izboljšanje varnosti pri proizvodnji hrane in za zmanjšanje kontaminacij z bakterijami *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* in *Salmonella*.

Da se bakteriofag lahko uporablja v živilski industriji kot biokontrolno sredstvo, njegov genom ne sme vsebovati kodirajočih genov za virulenčne faktorje, mora biti striktno virulenten in brez zmožnosti, da se njegov genom vgradi v bakterijskega, imeti mora širok spekter delovanja – okužiti mora veliko sevov tarčne bakterijske vrste.

Za preprečevanje kontaminacij med produkcijo sira, se uporablja bakteriofagni koktejl 3 bakteriofagov iz družine *Caudovirales* (Haddad in sod., 2016).

## 8 ZAKLJUČEK

Tudi če so bakterije in njihovi bakteriofagi majhni in za veliko ljudi nezanimivi, igrajo še kako pomembno vlogo v našem vsakdanjem življenju. In tako kot ostali organizmi, se tudi ta dva organizma prilagajata eden drugemu, kar imenujemo koevolucija. Prvi korak naredijo bakterije s tem, da razvijejo odpornost proti bakteriofagu. Lahko preprečijo vezavo na receptorje, lahko preprečijo vstop bakteriofagne DNK v celico ali pa DNK po vstopu uničijo. Bakteriofagi odgovorijo s svojimi prilagoditvami, ki omogočijo okužbo spremenjene bakterije.

Koevolucijo najlažje spremljamo v kontinuirnem bioreaktorju, kjer sta bakterija in bakteriofag dovolj dolgo skupaj, da se začneta spreminjati. Vendar se v različnih okoljih pod različnimi pogoji različno odvija. Koevolucijo pospešuje večja produktivnost oziroma krajši generacijski časi bakterij, mešanje in stresanje kulture ter visoka vsebnost hranil v okolju. Bakterije s plazmidi pa, zaradi prevelike potrate energije, ki je potrebna za vzdrževanje plazmidov, koevolucijo zavirajo, saj ostane premalo energije za »host range« mutacije. Tudi migracije bakterij in bakteriofagov lahko spodbudijo ali zavrejo koevolucijo, učinek je odvisen od smeri migracije.

Koevolucija je pomemben proces s stališča ohranjanja raznolikosti med obema vrstama in s stališča novih aplikacij. V ospredju je bakteriofagna terapija, ki velja za glavno alternativo antibiotikom. Prav zaradi možnosti prilagajanja bakteriofagov in ne samo bakterij, ima velik potencial, da bo nekoč nadomestila uporabo antibiotikov oziroma se bo z njo zdravilo bakterijske okužbe, ki se z antibiotiki ne zdravijo uspešno.

Bakteriofagna terapija ni uporabna le za zdravljenje človeških bakterijskih okužb, ampak tudi za živalske. V uporabi pa so že bakteriofagi, ki služijo preprečevanju kontaminacij pri proizvodnji hrane.

V prihodnje je pričakovati vedno več raziskav v smeri bakteriofagne terapije, ki bi bila uporabna za zdravljenje človeških in živalskih bakterijskih okužb. Predvsem je potrebno dokazati, da na dolgi rok uporabe rezultat ne bo isti kot pri antibiotikih, ki na rezistentne bakterije nimajo več učinka. Pri tem je nadvse pomembno poznavanje koevolucijskih odnosov med povzročitelji bolezni, bakterijami ter med protimikrobnih sredstvi, bakteriofagi.

## 9 VIRI

- Arditti J., Elliott J., Kitching I. J., Wasserthal L. T. 2012. 'Good Heavens what insect can suck in' – Charles Darwin, *Angraecum sesquipedale* and *Xanthopan morgani praedicta*. Botanical Journal of the Linnean Society, 169: 403-432
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D., Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 318, 23: 1709-1712
- Betts A., Vasse M., Kaltz O., Hochberg M. E. 2013. Back to the future: evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Evolutionary Applications, 6, 7: 1054-1063
- Betts A., Kaltz O., Hochberg. 2014. Contrasted coevolutionary dynamics between a bacterial pathogen and its bacteriophages. PNAS, 111, 30: 11109-11114
- Blower T. R., Evans T. J., Przybilski R., Fineran P. C., Salmond G. P. C. 2012. Viral Evasion of a Bacterial Suicide System by RNA-Based Molecular Mimicry Enables Infectious Altruism. PLOS Genetics, 8, 10. doi: 10.1371/journal.pgen.1003023: 12 str.
- Bratkovič T., Preželj A. 2008. Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. Farmacevtski vestnik, 59: 129-134
- Bohannon B. J. M. in Lenski R. E. 2000. Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. Ecology Letters, 3: 362-377
- Buckling A. in Brockhurst M. 2012. Bacteria-virus coevolution. V: Evolutionary systems biology. Soyer O. S. (ur.). Springer: 347-370
- Chan B. K., Abedon S. T., Loc-Carrillo C. 2013. Phage cocktails and the future of phage therapy. Future Microbiology, 8, 6: 769-783
- Dennehy J. J. 2012. What can phages tell us about host-pathogen coevolution? International Journal of Evolutionary Biology, 2012, 396165, doi: 10.1155/2012/396165: 12 str.
- Deveau H., Barrangou R., Garneau J. E., Labonté J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D. A., Horvath P., Moineau S. 2007. Phage Response to CRISPR-Encoded Resistance in *Streptococcus thermophilus*. Journal of Bacteriology, 190, 4: 1390-1400

- Duncan A. B., Dusi E., Jacob F., Ramsayer J., Hochberg M. E., Kaltz O. 2017. Hot spots become cold spots: coevolution in variable temperature environments. *Journal of Evolutionary Biology*, 2017, 30: 55-65
- Gandon S., Michalakis Y. 2002 Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 451-462
- Gu J. , Liu X., Li Y., Han W., Lei L., Yang Y., Zhai H., Gao Y., Song J., Lu R., Sun C., Feng X. A Method for Generation Phage Cocktail with Great Therapeutic Potential. *PLoS ONE*, 7, 3, doi: 10.1371/journal.pone.0031698: 8 str.
- Haddad L. E., Roy J., Khaill G. E., St-Gelais D., Champagne C. P., Labrie S., Moineau S. 2016. Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production. *International Journal of Food Microbiology*, 217: 7-13
- Hall A. R., Scanlan P. D., Buckling A. 2011a. Bacteria-Phage Coevolution and the Emergence of Generalist Pathogens. *The American Naturalist*, 177, 1: 44-53
- Hall A. R., Scanlan P. D., Morgan A. D., Buckling A. 2011b. Host-parasite coevolutionary arms races give way to fluctuating selection. *Ecology Letters*, 14: 635-624
- Harrison E., Laine A., Hietala M., Brockhurst M. A. 2013. Rapidly fluctuating environments constrain coevolutionary arms races by impeding selective sweeps. *Proceedings of the Royal Society B*, 280, 1764, doi: 10.1098/rspb.2013.0937: 9 str.
- Harrison E., Truman J., Wright R., Spiers A. J., Paterson S., Brockhurst A. 2015. Plasmid carriage can limit bacteria - phage coevolution. *Biology Letters*, 11, 8, doi: 10.1098/rsbl.2015.0361: 4 str.
- Koskella B., Brockhurst M. A. 2014. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 5: 916-931
- Krügler D. H., Bickle T. A. 1983. Bacteriophage Survival: Multiple Mechanisms for Avoiding the Deoxyribonucleic Acid Restriction System of Their Hosts. *Microbiological Reviews*, 47, 3: 345-360
- Kunisaki H., Tanji Y. 2010. Intercrossing of phage genomes in a phage cocktail and stable coexistence with *Escherichia coli* O157:H7 in anaerobic continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1533-1540



- Labrie S. J., Samson J. E., Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews. Microbiology*, 8, 5: 317-328
- Lopez-Pascua L. D. C., Buckling A. 2008. Increasing productivity accelerates host-parasite coevolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 21: 853-860
- Lu M., Henning U. 1994. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *ScienceDirect*, 2, 4: 137-139
- Madigan M., Martinko J., Bender K., Buckley D., Stahl D. 2015. *Brock biology of microorganisms*. 14th edition. Harlow, Pearson Education Limited: 991 str.
- Mizoguchi K., Morita M., Fischer C. R., Yoichi M., Tanji Y., Unno H. 2002. Coevolution of Bacteriophage PP01 and *Escherichia coli* O157:H7 in Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1: 170-176
- McGrath S., Fitzgerald G. F., Sinderen D. 2002. Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Molecular Microbiology*, 43, 2: 509-520
- Nordström K., Forsgren A. 1974. Effect of Protein A on Adsorption of Bacteriophages to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Virology*, 14, 2: 198-202
- Örmälä A., Jalasvuori M. 2013. Phage therapy: Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? *Bacteriophage*, 3, 1: doi: 10.4161/bact.24219: 4 str.
- Rakhuba D. V., Kolomiets E. I., Szwajcer Dey E., Novik G. I. 2010. Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Polish Journal of Microbiology*. 59, 3: 145-155
- Sauvageau D. in Cooper D. G. 2010. Two-stage, self-cycling process for the production of bacteriophages. *Microbial Cell Factories*, 9, 81: doi: 10.1186/1475-2859-9-81: 10 str.
- Scanlan P., Buckling A., Hall A. R. 2015. Experimental evolution and bacterial resistance: (co)evolutionary costs and trade-offs as opportunities in phage therapy research. *Bacteriophage*, 5, 2, doi: 10.1080/21597081.2015.1050153: 4 str.
- Scanlan P. D. 2017. Bacteria-Bacteriophage Coevolution in the Human Gut: Implications for Microbial Diversity and Functionality. *Trends in Microbiology*, 25, 8: 614-623

Vale P. F., Little T. J. 2010. CRISPR-mediated phage resistance and the ghost of coevolution past. *Proceedings of the Royal Society B*, 277: 2097-2103

Vogwill T., Fenton A., Brockhurst M. A. 2008. The impact of parasite dispersal on antagonistic host-parasite coevolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 21: 1252-1258

Vogwill T., Fenton A., Buckling A., Hochberg M. E., Brockhurst M. A. 2009. Source population act as coevolutionary pacemakers in experimental selection mosaics containing hotspots and coldspots. *The American Naturalist*, 173, 5: 171-176

Wittebole X., De Roock S., M Opal S. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5, 1: 226-235