

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол №__ засідання кафедри

від «__» _____ 2026 р.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЛІТИЧНИХ ЦІАНОФАГІВ ІЗ ПРИСНОВОДНИХ
ЕКОСИСТЕМ М.КИЄВА**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю Біологія
Борщевської Марії Юріївни
Науковий керівник від кафедри
д.б.н, проф. Будзанівська І.Г.

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ «Інституту біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом д.б.н, проф. Будзанівської І.Г.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Ціанобактерії та ціанофаги у прісноводних екосистемах: біологічні особливості та методи дослідження	6
1.1. Загальна характеристика прісноводних ціанобактерій: екологічна роль, біотехнологічне значення та ризики для здоров'я людини.....	6
1.1.1 Екологічні особливості прісноводних ціанобактерій.....	6
1.1.2. Цвітіння води та роль прісноводних ціанобактерій у його формуванні.....	8
1.1.3. Вплив ціанобактерій на здоров'я людини.....	10
1.1.4. Біотехнологічне застосування ціанобактерій.....	12
1.2. Класифікація та біологічна характеристика прісноводних ціанофагів.....	17
1.2.1. Таксономія та класифікація ціанофагів.....	17
1.2.2. Морфологічні особливості та будова ціанофагів.....	18
1.2.3. Особливості життєвого циклу ціанофагів.....	20
1.3. Методи ідентифікації та культивування ціанофагів.....	22
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень	25
2.1. Фізико-хімічна характеристика води.....	25
2.2. Методи виділення, очищення та концентрації ціанофагів.....	25
2.3. Трансмійна електронна мікроскопія для визначення морфології ціанофагів.....	26
2.4. Метод виділення нуклеїнових кислот.....	26
2.5 Полімеразна-ланцюгова реакція	27
2.6. Горизонтальний електрофорез в агарозному гелі.....	27
2.7. Секвенування та філогенетичний аналіз отриманих ампліконів.....	27
2.8. Статистична обробка результатів.....	28
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення	29
3.1. Виявлення та морфологічна характеристика ціанофагів у прісноводних екосистемах Києва.....	29

3.2. Молекулярний аналіз ціанофагів на основі аналізу гена <i>gp20</i>	37
3.3. Біоінформатичний аналіз отриманих ампліконів.....	39
ВИСНОВКИ.....	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	45

ВСТУП

Ціанофаги - це віруси, що інфікують ціанобактерії, а також виконують важливі екологічні функції у водних екосистемах. По-перше, вони регулюють чисельність і динаміку популяцій ціанобактерій, впливаючи на їх різноманіття та, відповідно, на функціонування екосистем у цілому. По-друге, ціанофаги беруть участь у біогеохімічних циклах: лізис бактеріальних клітин супроводжується вивільненням органічного вуглецю, азоту та фосфору, які стають доступними для інших мікроорганізмів, цей процес є важливою складовою мікробного харчового ланцюгу. По-третє, вони також сприяють еволюції ціанобактерій завдяки процесам горизонтального перенесення генів, трансдукції та лізогенії [46].

Особливе значення вони відіграють як перспективний підхід до боротьби із шкідливим цвітінням води, що спричинене ціанобактеріями. Порівняно з традиційними методами очищення води, таких як хімічна обробка або механічне видалення біомаси, ціанофаги є економічно доступними, екологічно безпечнішими та відносно простими у застосуванні. Вони також здатні інфікувати тільки певні штами ціанобактерій без значного впливу на інші компоненти екосистеми. Завдяки досягненням синтетичної біології відкривається значний потенціал для виявлення нових ціанофагів, їх модифікації та використання у біотехнологічних підходах до контролю цвітіння води [44].

Попри значний прогрес у дослідженні ціанофагів, більшість із них було ізольовано з морських екосистем. Наразі існує серйозний дисбаланс у дослідженнях: із понад 120 секвенованих геномів ціанофагів у 2021 році 90 становили морські віруси. Така нерівномірність зумовлена кількома чинниками. По-перше, домінуванням таких родів, як *Prochlorococcus* і *Synechococcus* у Світовому океані. По-друге, технічними труднощами культивування прісноводних ціанобактерій, зокрема представників роду *Microcystis*, що часто формують токсичні цвітіння. По-третє, значна частина досліджень традиційно зосереджена на океанографічних проектах, тоді як прісноводні екосистеми залишаються менш вивченими [45].

Таким чином, прісноводні ціанофаги залишаються недостатньо вивченими, особливо в Україні, де усі дані, що пов'язані із даною темою, залишаються обмеженими та представлені поодинокими роботами. Тож метою даного дослідження було виділити, ідентифікувати та охарактеризувати ціанофаги з прісноводних екосистем міста Києва.

РОЗДІЛ 1

ЦІАНОБАКТЕРІЇ ТА ЦІАНОФАГИ У ПРІСНОВОДНИХ ЕКОСИСТЕМАХ: БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1.1. Загальна характеристика прісноводних ціанобактерій: екологічна роль, біотехнологічне значення та ризики для здоров'я людини

Ціанобактерії - це велика група водних фотосинтезуючих мікроорганізмів. Їхній вік оцінюється приблизно у 3,5 млрд років. Їх також називають синьо-зеленими водоростями, що пов'язано зі здатністю утворювати слизові сильно-зелені плівки на поверхні води. Цей колір утворюється завдяки наявності у ціанобактерій синього пігменту фікоціаніну, який разом з хлорофілом а та іншими пігментами використовується для поглинання світла під час фотосинтезу [1].

1.1.1. Екологічні особливості прісноводних ціанобактерій

Ціанобактерії від інших прокаріотів відрізняє здатність до кисневого фотосинтезу. Вони характеризуються різноманітністю морфологічних форм, включаючи нитчасті, колоніальні та одноклітинні організми. Нитчасті форми часто утворюють спеціалізовані клітини: акінети, або спочиваючі, стійкі клітини та гетероцисти, клітини, що здійснюють фіксацію азоту. Основними структурними компонентами клітини є клітинна стінка, тилакоїдні мембрани, відповідальні за фотосинтез, а також, у деяких видів, газові вакуолі, що забезпечують регуляцію плавучості [21].

Ціанобактерії трапляються майже в усіх водних екосистемах, а також у ґрунтах. Але найбільша їхня кількість присутня саме у прісних водоймах: річках, озерах, ставках, водосховищах [9]. Ціанобактерії як таксономічна група характеризуються високою здатністю до колонізації різноманітних середовищ існування завдяки численним адаптаціям до екстремальних умов довкілля. Зокрема, для них властива стійкість до підвищених концентрацій міді та цинку, толерантність до умов із

низьким вмістом кисню та наявністю вільного сульфідів, висока витривалість до УФ-В та УФ-С випромінювання, а також до підвищених температур [5].

Ціанобактерії мають вагомe значення у біогеохімічних циклах: вони формують основу трофічних ланцюгів у водних екосистемах, а також забезпечують продукцію кисню та фіксацію вуглецю [21]. Ціанобактерії, зокрема азотфіксуючі види, такі як *Anabaena* і *Nostoc*, відіграють ключову роль у азотному циклі шляхом перетворення атмосферного азоту на біодоступні форми для інших організмів. Цей механізм є особливо важливим у середовищах із дефіцитом поживних речовин, таких як прісноводні озера та естуарії [29]. Крім того, ціанобактерії беруть участь у фосфорному циклі, поглинаючи розчинений фосфор, який часто є лімітуючим фактором первинної продукції у водних екосистемах [21]. Таким чином, їхня діяльність забезпечує регуляцію кругообігу біогенних речовин і підтримання продуктивності водних екосистем.

Кількість видів ціанобактерій і досі залишається предметом наукових дискусій. За сучасними оцінками, вона може сягати близько 8000 видів, однак наразі ідентифіковано та класифіковано 5185 видів, що належать до порядків *Chroococcales*, *Gloeobacterales*, *Nostocales*, *Oscillatoriales*, *Pleurocapsales*, *Spirulinales* та *Synechococcales* [4].

В Україні за сучасними узагальненими даними станом на 2022 рік налічується 766 видів ціанобактерій, що належать до 150 родів [9]. З них прісноводні форми складають 66,3% від загальної кількості. Найпоширенішими прісноводними ціанобактеріями в Україні є представники родів *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Oscillatoria* та *Nostoc*. Серед них особливе значення мають *Microcystis flos-aquae*, *Microcystis viridis* та *Dolichospermum spiroides* відомі як збудники масового «цвітіння» води [9].

1.1.2. Цвітіння води та роль прісноводних ціанобактерій у його формуванні

Масове поширення ціанобактерій у водних екосистемах стало глобальною екологічною проблемою у цілому світі. Для України найбільш характерним його проявом є синьо-зелене цвітіння води, основною причиною якого виступає антропогенна евтрофікація. Евтрофікація проявляється у зміні прозорості та забарвлення води внаслідок інтенсивного розвитку фітопланктону. Вода втрачає прозорість, набуває мутно-зеленого відтінку, а за значної концентрації біомаси формується щільна зелена поверхнева плівка [10].

Хоча евтрофікація може відбуватися природним шляхом, антропогенна діяльність значно прискорює цей процес. До основних чинників належать промислові та побутові стоки, надходження з сільськогосподарських угідь добрив, багатих на азот і фосфор, використання мийних засобів із вмістом фосфатів, а також перетворення річок на водосховища шляхом спорудження гідротехнічних споруд [10, 11]. Надлишок біогенних елементів стимулює прискорений ріст фотоавтотрофних організмів, зокрема ціанобактерій. Наприклад, у ході досліджень у басейні річки Ірпінь було виявлено позитивну кореляцію між чисельністю ціанобактерій та вмістом амонійного азоту, нітритів і фосфатів у воді [13].

Масове розмноження ціанобактерій у природних водоймах негативно впливає на якість води, що надходить на водоочисні споруди. Інтенсивний розвиток фітопланктону, зокрема ціанобактерій, призводить до погіршення органолептичних та фізико-хімічних показників води, що проявляється зміною кольору, запаху і смаку, підвищенням каламутності та рівня рН. Зокрема, за підвищених значень рН спостерігається більша різноманітність ціанобактерій із переважанням нефіксуєючих форм азоту, зокрема *Microcystis* spp., тоді як азотфіксуєючі види домінують за нижчих значень рН [11]. Економічні витрати, пов'язані з шкідливими ціанобактеріальними цвітіннями, можуть бути значними та впливати на обмеження рекреаційного використання водойм, рибальства, а також на зниження вартості прибережної нерухомості. У перспективі ця проблема може також призвести до серйозних криз у сфері водопостачання питної води [14].

Вагому роль у розвитку цвітіння відіграють і наслідки глобальних змін клімату: підвищена температура води, зростання концентрації атмосферного CO₂ та зміни режиму ультрафіолетового випромінювання. Додатково, морфометричні та гідрологічні особливості водного об'єкту також відіграють роль у формуванні цвітіння: глибина водойми, швидкість течії та наявність заток [11].

Поряд із вищезазначеними чинниками, суттєве значення у формуванні цвітіння відіграють фізіологічні та морфофункціональні адаптації власне ціанобактерій. Деякі представники родів *Microcystis*, *Dolichospermum*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon* та *Cylindrospermopsis* мають газові вакуолі, які забезпечують плавучість і вертикальне переміщення у водній товщі, що дає їм змогу ефективно конкурувати з іншими водоростями за світло [53]. Ця особливість надає їм і іншу вагому перевагу, оскільки в умовах стратифікованих водойм вони можуть концентруватися у щільні маси та здійснювати вертикальні міграції: підніматися до поверхневих шарів із високою освітленістю для максимізації фотосинтезу та опускатися в глибші, менш освітлені зони [11].

Додатковою конкурентною перевагою є здатність окремих родів фіксувати та асимілювати молекулярний азот за умов низьких концентрацій нітратів і амонію у воді, що дозволяє підтримувати ріст навіть за дефіциту доступних форм азоту [51]. Великі колоніальні форми ціанобактерій з газовими вакуолями, зокрема *Microcystis*, також характеризуються зниженою схильністю до осідання та меншою доступністю для зоопланктону порівняно з дрібними одноклітинними фітопланктонними організмами, це в свою чергу також сприяє формуванню масових цвітіння [52]. Крім того, деякі види ціанобактерій продукують алелопатичні сполуки, які пригнічують розвиток рослин та інших водоростей [51].

Інтенсивні цвітіння супроводжуються значними змінами фізико-хімічних параметрів води. Зокрема, активний фотосинтез призводить до виснаження розчиненого CO₂ та підвищення рівня рН, що додатково сприяє домінуванню ціанобактерій. Підвищені значення рН можуть бути токсичними для деяких видів риб та інших гідробіонтів [50].

На етапі відмирання біомаси відбувається інтенсивне споживання кисню в процесі мінералізації органічної речовини, що може призводити до гіпоксії або аноксії і, як наслідок, масової загибелі риби [12]. Додатково негативний вплив пов'язаний із накопиченням аміаку, що утворюється під час розкладання біомаси. Наприклад, під час колапсу цвітіння *Anabaena circinalis* у озері Окічобі у Флориді низький вміст кисню та підвищена концентрація аміаку стали причиною загибелі великої кількості молюсків та інших безхребетних [12].

Додаткову загрозу становить продукція токсинів окремими видами ціанобактерій. Ці токсини можуть спричиняти широкий спектр біологічних ефектів: алелопатичний вплив на інший фітопланктон, накопичення токсинів у тканинах безхребетних та риб [52]. Це, у свою чергу, призводить до зниження виживаності, росту та репродуктивної здатності цих організмів. Зафіксовано також зниження виживаності, росту та репродуктивної здатності молюсків, а накопичення токсинів у тканинах двостулкових молюсків може становити небезпеку для водяних гризунів та їхніх хижаків. Описані випадки масової загибелі водоплавних птахів, пов'язані з цвітінням *Microcystis* [51].

1.3. Вплив ціанобактерій на здоров'я людини

Згідно з даними ВООЗ, 59% ціанобактерій, що спричиняють цвітіння води у світі, є токсичними. Водночас важливо зазначити, що ціанобактерії не здатні до розмноження в організмі людини і не є інфекційними агентами, а їхній негативний вплив пов'язаний саме з продукцією токсинів [6].

Ціанотоксини - це внутрішньоклітинні сполуки ціанобактерій, що вивільняються у воду переважно під час старіння клітин, їх загибелі та лізису або внаслідок процесів водоочищення, зокрема при застосуванні альгіцидів [2]. Їх зазвичай класифікують як вторинні метаболіти, однак їхня точна роль у процесах росту, розвитку та репродукції ціанобактерій досі не повністю з'ясована. Існує гіпотеза, що ці сполуки сформувалися в ході еволюції як механізм конкурентної взаємодії, спрямований на пригнічення інших видів у середовищі існування.

Водночас припускається, що вони можуть виконувати і певні фізіологічні функції, зокрема брати участь у підтриманні клітинного гомеостазу, засвоєнні заліза або міжклітинній сигналізації [2].

Токсини ціанобактерій поділяють на три основні групи залежно від механізму їх дії: нейротоксини, що уражають нервову систему; гепатотоксини, які негативно впливають на клітини печінки; та дерматотоксини, що спричиняють ушкодження шкіри [22]. Поширеними гепатотоксинами є мікроцистини (MCs) та циліндроспермопсини (CYNs), тоді як анатоксини та сакситоксини (SXTs) належать до поширених нейротоксинів. Ліпополісахариди та лінгбіятоксин належать до дерматотоксинів і разом з іншими токсинами можуть спричинити інтоксикацію [36].

Приміром, одним з найбільш вивчених механізмів гепатотоксичності ціанотоксинів є пригнічення серин/треонінових протеїнфосфатаз, що впливає на регуляцію гіперфосфорилування клітинних білків [22].

Загалом 37 видів ціанобактерій, зареєстрованих на території України, внесені до переліку токсичних [9]. Більшість із них стабільно фіксується у водоймах України протягом тривалого часу, що свідчить про їх стабільну присутність у гідроекосистемах. Водночас деякі види мають обмежену історію спостережень. Так, згадки про *Anabaena lappronica* датуються лише першою половиною XX століття. Нещодавно були вперше зафіксовані два нових види, що вважаються токсичними. Зокрема, *Microcystis botrys* Teiling виявлено у затоці Оболонь м. Київ, а *Dolichospermum sigmoideum* (Nygaard) — у планктоні плавневих озер Кучурганського водосховища в Одеській області [9].

Захворювання пов'язані зі споживанням питної води, що містить ціанотоксини характеризуються низкою симптомів, включаючи біль у животі, блювоту, діарею, слабкість, сильне запалення ротової порожнини та шлунково-кишкового тракту, подразнення шкіри та слизової оболонки очей, носа та горла, симптоми, подібні до астми, м'язовий тремор, нудоту, поколювання в кінчиках пальців та пальцях ніг, затуманення зору, головний біль, запаморочення, лихоманку, гіпоксію, ціаноз, параліч та зупинку дихання або серця, що може призвести до смерті [3]. Такі наслідки можуть виникати протягом кількох хвилин або днів після впливу, залежно

від типів та концентрації ціанотоксинів, шляху(ів) впливу, маси тіла та віку уражених осіб [3].

Мікроцистини є найбільш поширеними ціанотоксинами в навколишньому середовищі та можуть міститися у значних кількостях у біомасі ціанобактерій, а саме до 1% сухої маси [23]. За своєю структурою дані токсини належать до родини моноциклічних гептапептидів, характерною особливістю яких є наявність незвичайної β -амінокислоти. Було виявлено, що мікроцистини можуть брати участь у канцерогенезі. У низці експериментів на тваринах було продемонстровано вплив мікроцистинів на підвищену проліферацію клітин і зміни у процесах цитокінезу. Епідеміологічні дослідження, проведені в Китаї, показали зв'язок між підвищеною частотою раку печінки та колоректального раку і споживанням води з джерел, забруднених мікроцистинами або ціанобактеріями, що їх продукують [23].

1.4. Біотехнологічне застосування ціанобактерій

Ціанобактерії мають великий потенціал у сучасній біотехнології завдяки їхній здатності до швидкого росту, фотосинтезу, фіксації атмосферного азоту та синтезу широкого спектра біологічно активних сполук. Це дозволяє використовувати ці мікроорганізми у різних галузях, зокрема у виробництві біопалива та біопластиків, харчовій промисловості, біоремедіації, а також у медичній і фармацевтичній біотехнології. У цьому розділі розглянуто основні напрями практичного застосування ціанобактерій [8].

Ціанобактерії розглядаються як перспективні кандидати для виробництва біопалива та біорозкладних пластиків завдяки здатності до фіксації атмосферного азоту та поглинання CO_2 , який використовується ними як джерело вуглецю для росту навіть у несприятливих кліматичних умовах, зокрема на малородючих ґрунтах і в солоних водах [7]. Висока швидкість росту, значний вміст, а саме ~20–50% сухої маси нейтральних ліпідів, що відкладаються в ліпідних тілах, присутніх у цитозолі; а також синтез різноманітних біологічно активних метаболітів роблять

ціанобактерії перспективною альтернативою традиційним підходам із використанням сировини. [7]

У виробництві біопалива ціанобактерії розглядаються як ефективні платформи для синтезу енергетично цінних сполук. Вони здатні продукувати триацилгліцерини (TAG) та діацилгліцерини (DAG), що можуть використовуватися як попередники біодизеля. Крім того, за допомогою метаболічної інженерії генетично модифіковані штами, зокрема *Synechocystis* sp. PCC 6803, здатні синтезувати біоетанол, ізобутанол, етилен, 1-бутанол, біоводень та інші види біопалива безпосередньо з CO₂ та світла [7].

Деякі види ціанобактерій, такі як *Synechococcus* і *Synechocystis*, можуть виробляти лактат і сукцинат, які є важливими хімічними речовинами у виробництві біопластиків. Полігідроксикарбонати, синтезовані ціанобактеріями, характеризуються термостійкістю та фізичними властивостями, подібними до традиційних пластиків нафтового походження [8].

Каротиноїди, що містяться в ціанобактеріях, зокрема зеаксантин, бета-каротин, кантаксантин і ностоксантин використовуються у харчових добавках, барвниках та кормах для тварин [15]. Обсяги виробництва цих метаболітів постійно зростають: комерційно вони доступні у формі таблеток, гранул та капсул. Крім того, відомо, що ціанобактерії використовуються як повноцінний харчовий продукт або як дієтичні добавки, такі як мінерали, амінокислоти, білки, складні цукри, вуглеводи, фікоціанін, активні ферменти, незамінні жирні кислоти та хлорофіл [15].

Однією з найбільш відомих і широко використовуваних у біотехнології ціанобактерій є *Spirulina*. Вона є цінним джерелом біологічно активних речовин, зокрема β-каротину, рибофлавіну, вітаміну B12 та тіаміну, які широко застосовуються як харчові добавки [15]. Завдяки високому вмісту білка (до 60% сухої маси), а також широкому амінокислотному комплексу, що включає всі незамінні амінокислоти: лейцин, ізолейцин, валін, триптофан, метіонін, фенілаланін, лізин і треонін, *Spirulina* вважається повноцінним харчовим продуктом. Її білки мають високу біологічну цінність (близько 75%) і добру засвоюваність (83–90%), що зумовлено відсутністю жорсткої целюлозної клітинної стінки та наявністю легко

руйнівної муреїнової оболонки. Крім того, *Spirulina* є джерелом вітамінів групи В, а також вітамінів С і Е, що забезпечує її виражені антиоксидантні властивості.

Крім традиційного використання у харчовій промисловості, *Spirulina* розглядається як перспективний об'єкт для застосування в умовах космічних місій. Дослідження показали, що вона може ефективно функціонувати в біореґенеративних системах життєзабезпечення завдяки високій фотосинтетичній активності та здатності утилізувати відходи життєдіяльності, зокрема сполуки азоту з сечі. Експерименти в умовах, наближених до марсіанських (знижений тиск, висока концентрація CO_2 , використання реголіту як субстрату), продемонстрували здатність окремих штамів ціанобактерій рости та формувати біомасу. Зокрема, встановлено, що *Spirulina* може ефективно культивуватися в умовах підвищеного вмісту CO_2 та навіть за умов мікрогравітації, що покращує транспорт поживних речовин і сприяє її росту. Це свідчить про високий потенціал цієї ціанобактерії для використання у довготривалих космічних місіях, зокрема для забезпечення організму необхідними поживними речовинами [15].

Ціанобактерії є перспективними об'єктами для застосування у біоремедіації, наприклад, для очищення ґрунтів, стічних вод і деградації органічних забруднювачів. Забруднення води, спричинене антропогенною діяльністю, становить серйозну екологічну проблему. У цьому контексті численні дослідження підтверджують ефективність використання ціанобактерій для очищення стічних вод різного походження. Системи на основі фотосинтезуючих прокаріотів розглядаються як альтернатива традиційним методам, зокрема активному мулу. У цьому випадку використання спеціально підібраних штамів та контрольованих біотехнологічних процесів дозволяє ефективно застосовувати ціанобактерії для очищення довкілля [7].

Для прикладу, такі роди ціанобактерій, як *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Aphanocapsa* та *Westiellopsis* характеризуються здатністю до видалення азотовмісних і фосфатних іонів із води [20]. Водночас деякі штами *Spirulina* містять різноманітні функціональні групи, такі як карбоксильні, гідроксильні, сульфатні тощо. Вони відіграють важливу роль у зв'язуванні металів. Зокрема нещодавно було

досліджено біосорбцію цинку та нікелю штамми *Spirulina indica*, *Spirulina maxima* та *Spirulina platensis* [20]. Відомо, що застосування пестицидів негативно впливає на ґрунтові екосистеми, проте ціанобактерії мають здатність до акумулювання та детоксикації цих сполук. Попередні дослідження показали, що *Synechocystis* sp., *Westiellopsis prolifica*, *Nostoc hatei* та *Anabaena sphaerica* здатні розкласти органофосфатні та органохлорні інсектициди у водному середовищі [26, 27].

Попри значний потенціал, практичне використання ціанобактерій для очищення стічних вод має певні обмеження, одним із яких є складність відокремлення біомаси від очищеної води [49]. Для подолання цієї проблеми застосовують іммобілізацію клітин у різних матрицях, таких як агароза, карагенан, хітозан, альгінат і поліуретанова піна. Іммобілізовані ціанобактерії, як правило, демонструють вищу ефективність у видаленні важких металів порівняно з вільноживучими формами. Зокрема, іммобілізація *Anabaena doliolum* підвищувала здатність до видалення іонів міді та заліза на 45% і 23% відповідно [23]. Подібно, ефективність поглинання азотовмісних і фосфорних сполук зростала в іммобілізованих культурах *Chlorella* та *Anabaena* [23].

У природних умовах ціанобактерії часто утворюють симбіотичні асоціації з іншими аеробними або анаеробними мікроорганізмами. Зокрема, ціанобактеріальні мати, що включають *Oscillatoria*, *Synechocystis* і *Pleurocapsa*, сприяють деградації вуглеводнів, присутніх у нафті. Хоча самі ціанобактерії безпосередньо не розкладають вуглеводні сполуки, вони забезпечують бактерії що розкладають нафту киснем і поживними речовинами, тим самим стимулюючи цей процес [50]. Також було розроблено консорціум, що включає *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Chroococcus* та нафторозкладну бактерію *Burkholderia ceracia*, який ефективно застосовувався у біореакторах для деградації нафтових сполук [51].

Ціанобактерії продукують велику кількість вторинних метаболітів, що мають протипухлинні, протизапальні та антимікробні властивості. Саме тому ці мікроорганізми привертають значну увагу дослідників завдяки потенціалу використання даних біологічно активних сполук у медицині та фармацевтичній індустрії [17].

Багато досліджень присвячені вивченню біоактивних сполук ціанобактерій як потенційних протипухлинних агентів. Наприклад, бізелінгбіазид (*Biselyngbyaside*), отриманий із *Lyngbya* sp.. Зокрема, бізелінгбіазид А проявляє цитотоксичність щодо клітин HeLa S3 з $IC_{50} = 0,1$ мкг/мл. Інші похідні (В, С, Е та F) мають антипроліферативний ефект у клітинах HeLa та HL-60, тоді як бізелінгбіазид С індукує стрес ендоплазматичного ретикулума та апоптоз [16]. Кристофіцин, виділений із *Nostoc* sp., є потужним протипухлинним агентом, що інгібує формування мікротрубочок і проявляє активність проти різних солідних пухлин, включаючи мультирезистентні клітинні лінії. Його IC_{50} становить менше 50 пМ [18].

Також виявлено сполуки з високою антибактеріальною активністю проти різних видів бактерій. Зокрема, карбамідоциклофан F (*Carbamidocyclophane F*), отриманий із *Nostoc* sp., проявляє активність проти *Mycobacterium tuberculosis* із мінімальною інгібуючою концентрацією (MIC) 0,8 μ М. Скитоскалараол (*Scytoscalarol*) із *Scytonema* sp. має MIC 110 μ М, тоді як бромонаіндолон (*Bromoanaindolone*), продукується *Anabaena constricta*, ефективний проти *Bacillus cereus* (MIC 128 μ г/мл). [18]

Крім того, вторинні метаболіти ціанобактерій знаходять застосування в косметології [19]. У одному дослідженні оцінювали їхній антивіковий потенціал за здатністю нейтралізувати супероксид-аніон-радикал ($O_2^{\bullet-}$), знижувати активність ферментів MMP, таких як еластази та гіалуронідази, інгібувати тирозиназу, що запобігає синтезу меланіну, а також блокувати УФ-В випромінювання - що є визначенням сонцезахисного фактору, SPF. Наприклад, деякі види роду *Leptolyngbya* продемонстрували чудові результати у антивіковому застосуванні. Зокрема, *L. boryana* LEGE 15486 показала високий SPF (19 при 200 мкг/мл), значну здатність до нейтралізації супероксид-аніону ($IC_{50} = 99,50$ мкг/мл) і інгібування тирозинази ($IC_{25} = 784$ мкг/мл), що свідчить про її ефективність у захисті від фотоіндукованого старіння шкіри. А *L. ectocarpi* LEGE 11479 виявилася більш ефективною в інгібуванні MMP (гіалуронідаза, $IC_{50} = 863$ мкг/мл; еластаза, $IC_{50} = 391$ мкг/мл), що робить її перспективною для запобігання втраті щільності дерми [19].

2.1. Класифікація та біологічна характеристика прісноводних ціанофагів

2.1.1. Таксономія та класифікація ціанофагів

Термін «ціанофаги» використовується для позначення вірусів, які інфікують ціанобактерії. Ціанофаги зазвичай є ДНК-вмісними вірусами [26]. Дані віруси мають лінійний дволанцюговий геном, укладений у білковий капсид, а також хвостову структуру, яка забезпечує розпізнавання та прикріплення до клітини-господаря. Розміри їхніх геномів можуть значно варіювати: приблизно від 100 до 200 кб, а також вони містять різноманітні гени, пов'язані з реплікацією, розпізнаванням господаря та іншими функціями [29].

Ціанофаги зазвичай поділяють на три родини: *Myoviridae*, *Podoviridae* і *Siphoviridae* [24]. Протягом останніх десятиліть більшість досліджень була зосереджена на морських системах, що призвело до ідентифікації великої кількості морських ціанофагів, які переважно інфікують представників родів *Prochlorococcus* і *Synechococcus*. Натомість прісноводні ціанофаги залишаються значно менш дослідженими, незважаючи на те, що перший прісноводний подоціанофаг LPP-1, який інфікує нитчасті ціанобактерії, було описано ще у 1963 році. У зв'язку з цим необхідні подальші дослідження для глибшого розуміння їх біології та потенційного застосування, зокрема у контролі «цвітіння» води [34].

Родина *Myoviridae* включає ціанофаги, виділені переважно із морських зразків, тоді як *Podoviridae* та *Siphoviridae* представлені у більшості представниками, поширеними у прісноводних екосистемах. Міовіруси та сифовіруси зазвичай мають літичний тип життєвого циклу, тоді як подовіруси часто характеризуються лізогенним циклом із інтеграцією їхнього геному в геном клітини-господаря. Представники всіх трьох родин здатні інфікувати як одноклітинні, так і нитчасті ціанобактерії [25].

Прісноводні ціанофаги раніше класифікували на три основні групи залежно від таксономічної належності їхніх організмів-господарів [25]. Група LPP, що належить до ціаноподовірусів, здатна інфікувати нитчасті ціанобактерії родів *Lyngbya*,

Phormidium і *Plectonema*; такі фаги є одними з найпоширеніших у прісноводних екосистемах. Інші ціанофаги поділяють на групи А, AN, N і NP, які інфікують *Anabaena*, *Nostoc* і *Plectonema*, а також на групи AS і SM, що уражають *Anacystis*, *Synechococcus* і *Microcystis*. У номенклатурі ціанофагів існує певна плутанина, зумовлена некоректною ідентифікацією їхніх господарів. Наприклад, фаги SM-1, SM-2 та MA 1 спочатку були описані як літичні щодо *Microcystis aeruginosa*, однак згодом було встановлено, що штам *M. aeruginosa* NRC-1, чутливий до SM-1 і SM-2, насправді належить до роду *Synechococcus*. У зв'язку з цим класифікацію ціанофагів за спектром господарів не слід вважати коректним підходом [25].

2.2.2. Особливості будови ціанофагів

Ціанофаги мають типову для бактеріофагів будову, що включає ікосаедричний капсид, який містить генетичний матеріал, та хвостову структуру, що відповідає за розпізнавання клітини-господаря і введення вірусної ДНК [31]. Завдяки стрімкому розвитку кріоелектронної мікроскопії упродовж останніх років було визначено структуру капсидів низки бактеріофагів. Отримані дані дозволили краще зрозуміти процеси збірки та дозрівання віріонів. Загалом оболонка капсиду формується з пентамерних і гексамерних капсомерів основного капсидного білка, який має характерну складку типу НК97 [34]. У деяких бактеріофагів наявні додаткові білки капсиду, так звані цементні білки, що локалізуються на зовнішній поверхні та забезпечують підвищення стабільності вірусної оболонки [34]. Крім того, окремі фаги містять специфічні поверхневі білки, що забезпечують розпізнавання рецепторів клітини-господаря, наприклад, високоімуногенний білок Нос у фага Т4 [34].

Іншим ключовим структурним елементом бактеріофагів є хвостовий апарат. Його будову було детально охарактеризовано у ціанофага А-1(L), де він включає три основні структурні компоненти: шийку, скоротливий хвіст та базальну платівку з хвостовими фібрилами. Шийка сформована кількома білковими комплексами і

виконує функцію з'єднання капсиду з хвостом, а також утворює канал для транспорту вірусної ДНК під час інфекції. Хвіст має складну організацію і складається з внутрішньої трубки, побудованої з кільцеподібно організованих білкових субодиниць, та зовнішньої скоротливої оболонки. Така структура забезпечує механізм ін'єкції генетичного матеріалу у клітину-господаря шляхом скорочення хвостової оболонки. На дистальному кінці хвоста розташована багатокomпонентна базальна платівка, яка виконує ключову роль у процесі інфікування. Вона містить центральний шип та периферичні білкові комплекси, до яких прикріплені довгі та короткі хвостові фібрили. Ці структури забезпечують розпізнавання рецепторів клітини-господаря та прикріплення фага, що є критичним етапом початку інфекційного процесу [35].

У фагів родин *Myoviridae* і *Siphoviridae* довжина хвоста визначається білком TMP, вивільнення якого з трубки може ініціювати вихід геномної ДНК. Проте повна структура TMP наразі не встановлена. У одному дослідженні було визначено структуру трьох С-кінцевих спіральних ділянок TMP, які подібні до відповідних структур у фагів *Staphylococcus aureus* 80α та *Escherichia coli* (T5 і λ) [35]. Ці ділянки взаємодіють із білками базальної платівки, такими як центральний шип і хаб. Загалом TMP формував шестикратний спіральний пучок, що узгоджується з попередніми даними для інших ціанофагів. Відсутність частини сегментів TMP у даному випадку може бути пов'язана з протеолітичним розщепленням під час формування хвоста [35].

На відміну від бактеріофагів, які зазвичай характеризуються вузькою специфічністю до господаря на рівні одного роду, ціанофаги часто здатні інфікувати представників кількох родів ціанобактерій [49]. Як було зазначено вище, специфічність фага до господаря зазвичай визначається його хвостовим апаратом, зокрема білками зв'язування з рецепторами (RBPs), які входять до складу хвостових фібрил і/або хвостових шипів. На початковому етапі інфекції RBPs розпізнають і зв'язуються з різними рецепторами на поверхні клітини-господаря, такими як ліпополісахариди або білки зовнішньої мембрани. Таким чином, створення химерних RBPs або внесення мутацій у ділянки зв'язування з рецепторами дозволяє

змінювати спектр господарів фага. Зокрема, шляхом заміни доменів гетерологічних RBPs було отримано численні химерні фаги зі зміненим спектром інфікування, а використання методу мутагенезу дозволило створити бібліотеки фагів із варіабельною специфічністю [49].

2.2.3. Особливості життєвого циклу ціанофагів

Вибір між літичним і лізогенним життєвими циклами фагів визначається певними умовами. Тип життєвого циклу залежить від умов навколишнього середовища та рівня інфікування клітини фагом. Лізогенний профаг характеризується високою стабільністю в геномі клітини-господаря, але за несприятливих умов для клітини цей стабільний профаг може швидко переходити до літичного циклу. Отже, вибір між літичним і лізогенним шляхами розвитку значною мірою залежить від фізіологічного стану клітини, зокрема її забезпеченості світлом, макроелементами та наявності стресових чинників. Важливу роль у регуляції цього процесу відіграють білки CI та Cro, які функціонують як генетичний перемикач [49].

Окрім літичного та лізогенного циклів, у взаємодії бактеріофага з клітиною-господарем виділяють також стан псевдолізогенії. У цьому випадку нуклеїнова кислота фага може тривалий час перебувати всередині клітини без активної експресії, не інтегруючись у геном і не реплікуючись. Такий стан зазвичай виникає за несприятливих умов середовища, зокрема при дефіциті поживних речовин, і завершується після їх нормалізації. Вважається, що псевдолізогенія є адаптивним механізмом, який забезпечує збереження фагів у природних екосистемах за умов уповільненого росту прокаріотичних клітин [31].

Є низка важливих факторів, які впливають на інфекційність ціанофагів. Першим таким фактором є температура. Кілька досліджень показали, що популяції ціанофагів збільшувалися з сезонним підвищенням температури води і що їхня стабільність, як правило, відповідала стабільності ціанобактерій при температурі води до 50 °C [37]. Зокрема, при температурах до 40 °C 85 % ціанофагів залишалися

вірулентними, тоді як при 45 °C вірулентними залишалися лише 55 % ціанофагів, а при 50 °C або вище — менше ніж 0,001 %. Ціанобактерії, як правило, мають високий темп росту, коли температура води підвищується від 15 °C до 29 °C. [38].

Другим фактором є концентрації макроелементів, зокрема фосфору, азоту та CO₂, що впливають як на ріст ціанобактерій, так і на динаміку їх популяцій. Метаболічний стан хазяїна має вирішальне значення для вірусної інфекції та розмноження, оскільки він впливає на адсорбцію, реплікацію, літичну активність та виживання фага [39]. Важливо зазначити, що продуктивність ціанобактерій також тісно пов'язана з концентрацією позаклітинних поживних речовин, що може мати ще більш значущі наслідки для успішності ціанофагів [48]. Наприклад, лише 9,3 % клітин, інфікованих ціанофагами, зазнали лізису в умовах дефіциту фосфору порівняно зі 100 % у умовах його надлишку [48]. Ці результати свідчать про те, що в умовах дефіциту фосфору ціанофаги переходили у лізогенну фазу. Подальші дослідження показали, що в умовах дефіциту поживних речовин ціанофаги переходять у стан псевдолізогенії через несприятливі умови для росту та розмноження бактерій.

Третім фактором є інтенсивність сонячного випромінювання [49]. Сонячна радіація також може безпосередньо впливати на стабільність вільних ціанофагів у водних системах. Вважається, що висока сонячна інтенсивність значно сприяє втраті ціанофагів у природному середовищі внаслідок пошкодження генетичного матеріалу фагів. Зокрема, було показано, що утворення піримідинових димерів під впливом підвищеної інтенсивності випромінювання впливає на реплікацію та інфекційність фагів [49]. На відміну від інших бактеріофагів, світло відіграє вирішальну роль у процесі інфікування ціанобактерій ціанофагами, оскільки адсорбція та реплікація деяких ціанофагів у клітинах-господарях залежать від світла. Адсорбція та реплікація ціанофагів отримують більшу частину енергії та певних ресурсів від фотосинтетичного метаболізму клітин-господарів і часто синхронізуються з циклом світло-темрява. Також було виявлено, що першою ознакою інфекції є інвагінація фотосинтетичних ламел, після чого вірусні частинки з'являються у просторі між складеними ламелами та плазматичною мембраною [50].

Численні дослідження також показали значну залежність деяких ціанофагів від фотосинтетичної активності клітин-господарів-ціанобактерій, причому в темряві спостерігається повна втрата інфекційності, а принаймні один ціанофаг має генетичний гомолог, здатний запобігати фотоінгібуванню [49]. Ця активна роль ціанофагів у забезпеченні побічних продуктів фотосинтезу від своїх хазяїв ще більше підкреслює невід'ємну роль сонячного випромінювання для їхнього колективного успіху.

1.3. Методи ідентифікації та культивування ціанофагів

Ідентифікація та культивування ціанофагів є важливими етапами їх дослідження, що дозволяють виявити вірусні частинки у природних зразках, визначити їх властивості та отримати матеріал для подальшого аналізу. Для цього застосовують комплекс методів, спрямованих на очищення та концентрування вірусної фракції.

Видалення бактерій і планктону зі зразків води здійснюють шляхом фільтрації; для цього використовують шприцевий фільтр із розміром пор 0,45 мкм або 0,22 мкм та пластиковий шприц об'ємом 60 мл. Після фільтрації зразок зберігають у темряві при температурі 4 °C до подальшого використання. [30]

Наступним етапом за потреби є концентрування вірусної фракції, оскільки природні зразки зазвичай містять низьку концентрацію вірусів у певному об'ємі. Для цього застосовують кілька підходів. Одним із них є метод диференційного центрифугування, який базується на послідовному осадженні частинок різного розміру та різної щільності при змінах швидкості центрифугування. Іншим поширеним методом є осадження за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ) у присутності хлориду натрію (NaCl). У цьому випадку ПЕГ спричиняє агрегацію вірусних частинок за рахунок зменшення їх гідратаційної оболонки, що в свою чергу сприяє їх осадженню при подальшому центрифугуванні. Додавання NaCl підвищує іонну силу розчину, що додатково сприяє ефективності осадження. Цей метод є відносно простим та широко використовується для концентрування вірусів, зокрема із великих об'ємів води [31].

Черговим етапом є культивування ціанофагів, здійснюється воно шляхом ко-культивування з ціанобактеріями, які є господарями для досліджуваного ціанофагу. Одним із найпоширеніших методів є метод подвійних агарових шарів. Для цього препарат ціанофага піддають серії послідовних десятикратних розведень. Зокрема, у стерильні пробірки вносять по 4,5 мл середовища BG-11, після чого готують ряд розведень у діапазоні від 10^{-1} до 10^{-7} шляхом перенесення 0,5 мл суспензії ціанофага з однієї пробірки в іншу. У першу пробірку додають 0,5 мл вихідного зразка ціанофага, після чого проводять послідовні розведення. Отримані розведення використовують для інфікування культури ціанобактерій-господарів із подальшим внесенням у напівтверде агарове середовище. У результаті інфекції формуються зони лізису, що дозволяє оцінити титр фага. Середовище BG-11 є стандартним мінеральним середовищем для культивування ціанобактерій. Воно містить джерело азоту (NaNO_3), макроелементи (K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3), а також мікроелементи, що додаються у вигляді розчину мікроелементів (зокрема сполуки бору, марганцю, цинку, молібдену, міді та кобальту). Крім того, до складу входять залізо у вигляді ферум-амоній цитрату та хелатуючий агент EDTA, що робить його доступним для клітин [32]. Існує також метод визначення концентрації ціанофагів, що базується на підході найбільш ймовірного числа (MPN), який проводиться з використанням 96-лункових планшетів і рідкого поживного середовища. У цьому методі готують серію послідовних розведень фагового лізату та вносять їх у лунки, що містять культуру клітин-господарів, після чого оцінюють наявність або відсутність лізису. На основі кількості позитивних лунок, тобто у яких відбувся лізис, для кожного розведення за допомогою статистичних розрахунків визначають концентрацію інфекційно активних вірусних частинок [30].

Для морфологічної ідентифікації ціанофагів широко застосовують трансмісійну електронну мікроскопію (ТЕМ), яка дозволяє визначити будову капсиду та хвостових структур і віднести вірус до певного морфотипу. Наприклад, аналіз за допомогою ТЕМ дає змогу оцінити розміри капсиду та довжину хвостового відростка, що є важливими діагностичними ознаками [33].

Сучасні підходи до ідентифікації ціанофагів включають молекулярно-генетичні методи, зокрема полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) та секвенування геному. Використання специфічних генетичних маркерів, таких як гени структурних білків (gp20) або фотосинтетичних генів (наприклад, psbA), дозволяє здійснювати детекцію та кількісну оцінку ціанофагів у природних зразках. Секвенування геному дає можливість дослідити генетичну організацію вірусів, їх еволюційні зв'язки та функціональні особливості [27].

Додатковим етапом дослідження є визначення спектра господарів, що передбачає тестування здатності ціанофага інфікувати різні штами ціанобактерій. Це має важливе значення для розуміння екологічної ролі вірусів та їх потенційного використання для контролю шкідливих цвітінь [25].

Чутливість до хлороформу є одним із підходів для характеристики ціанофагів. Показано, що інфекційна активність фага PA-SR01 знижується після обробки хлороформом, що свідчить про його чутливість до цього реагенту [25]. При цьому обробка хлороформом не впливає на ріст клітин-господарів. Відомо, що хлороформ здатний розчиняти ліпіди, тому чутливість фага до нього може вказувати на наявність ліпідних компонентів у структурі вірусної частинки або механізмах інфікування. Однак сама по собі чутливість до хлороформу не є достатнім доказом наявності ліпідів у складі вірусу і потребує додаткового підтвердження [25].

Попри значний прогрес у розвитку методів дослідження ціанофагів, існують і певні обмеження. Зокрема, не всі ціанофаги можливо культивувати в лабораторних умовах, а результати можуть залежати від вибору господаря та умов культивування, що не є універсальними.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Фізико-хімічна характеристика води

Фізико-хімічні параметри води визначали з метою оцінки умов середовища існування ціанобактерій та пов'язаних із ними вірусів. Температуру води вимірювали безпосередньо в місцях відбору зразків за допомогою рідинного термометра. Значення рН, вміст загальних розчинених речовин (TDS) та електропровідність визначали в лабораторних умовах із використанням відповідних цифрових приладів, відкаліброваних згідно з інструкціями виробника. Вимірювання проводили невдовзі після відбору зразків для мінімізації впливу зовнішніх факторів на отримані результати.

2.2. Методи виділення, очищення та концентрації ціанофагів

Водні зразки спочатку попередньо фільтрували за допомогою лабораторного фільтрувального паперу з метою усунення великих домішок. Після цього клітини ціанобактерій осаджували шляхом центрифугування протягом 15 хвилин при 4000 об./хв. Отриманий супернатант додатково очищували через мембранні фільтри з порами 1,2 нм та 0,45 нм. Для концентрування вірусних частинок застосовували ультрацентрифугування при $100\,000 \times g$ протягом 4 годин при 4 °C з подальшим ресуспендуванням осаду у стерильному поживному середовищі BG-11. Як додатковий підхід використовували метод адсорбції вірусів на поверхні фільтра з подальшою елюцією, що також дозволяло отримати концентровані вірусні препарати. Отримані препарати ціанофагів зберігали при температурі 4 °C до подальшого використання.

2.3. Трансмійна електронна мкроскопїя для визначення морфологїї цїанофагїв

Зразки дослїджували за допомогою трансмісійного електронного мкроскопа JEM-1230 (JEOL Ltd., Японїя) при збїльшеннї 40 000 – 80 000 $\times$. Підготовку зразків для TEM здїйснювали на мїдних сїтках із розмїром комїрок 400 mesh (Sigma, США), покритих формвар-вуглецевою плївкою. Для візуалїзацїї вірусних частинок використовували метод негативного контрастування із застосуванням 2% водного розчину фосфорно-вольфрамової кислоти, який наносили методом флотацїї сїтки [40]. Вимїрювання розмїрів віріонів проводили за отриманими мкрофотографїями.

Дослїдження проводили на базї Центру колективного користування науковим обладнанням Інституту ботанїки ім. М.Г. Холодного НАН України (м. Кїїв).

2.4. Метод видїлення нуклеїнових кислот

Екстракцїю ДНК здїйснювали із застосуванням стандартних методик, зокрема з використанням комерційного набору DNeasy (Qiagen, Нїмеччина) та методу СТАВ [41]. Екстракцїю за допомогою набору DNeasy проводили вїдповїдно до їнструкцїй виробника у кїлька послїдовних етапів, що включали лїзис клїтин, зв'язування ДНК із сорбентом, промивання та елюцїю очищеної ДНК. Метод СТАВ застосовували як альтернативний пїдхїд для видїлення нуклеїнових кислот із зразків. Цей метод базується на осадженнї ДНК у присутностї СТАВ та високих концентрацїй солей з подальшим очищенням органїчними розчинниками (наприклад, хлороформом) і преципїтацїєю ДНК етанолом або їзопропанолом. Якїсть і цїлїснїсть видїленої ДНК оцїнювали шляхом електрофорезу в агарозному гелї.

2.5. Полімеразна-ланцюгова реакція

Для ампліфікації фрагмента гена, що кодує основний капсидний білок порталу gp20, використовували дегенеративні праймери CPS1 (F, 5'-GTAG[T/A]ATTTTCTACATTGA[C/T]GTTGG-3') та CPS4 (R, 5'-CAT(A/T)TC(A/T)TCCCA(A/T/C)TCTTC-3') [42]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з використанням DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) відповідно до інструкції виробника. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: початкова денатурація при 94 °C протягом 3 хв; далі 35 циклів, що включали денатурацію при 94 °C (15 с), відпал праймерів при 36 °C (15 с) та елонгацію при 68 °C (1 хв); фінальна елонгація проводилася при 68 °C протягом 4 хв [43]. Отримані продукти ПЛР також аналізували методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі з подальшою візуалізацією під УФ-випромінюванням.

2.6. Горизонтальний електрофорез в агарозному гелі

Якість виділеної ДНК на декількох етапах оцінювали методом електрофорезу в 1,4 % агарозному гелі, приготовленому в буфері TBE (0,089 М Tris-борат, рН 8,0). Гелі забарвлювали бромідом етидію та візуалізували під ультрафіолетовим випромінюванням за допомогою трансільюмінатора. Отримані амплікони розділяли електрофорезом у 1,4 % агарозному гелі в буфері TBE при напрузі 120 В протягом 20 хв з подальшою візуалізацією під УФ-випромінюванням. Цільовий фрагмент ДНК вирізали з гелю та очищували за допомогою набору GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific) відповідно до інструкцій виробника.

2.7. Секвенування та філогенетичний аналіз отриманих ампліконів

Очищені ПЛР-продукти зі зразків надалі секвенували. Отримані нуклеотидні послідовності аналізували за допомогою інструменту BLAST для пошуку найбільш подібних послідовностей у базі даних NCBI. Десять відібраних гомологічних

послідовностей використовували для подальшого філогенетичного аналізу. Обробку нуклеотидних послідовностей та побудову філогенетичного дерева здійснювали з використанням програмного забезпечення MEGA 12. На першому етапі проводили множинне вирівнювання за допомогою алгоритму MUSCLE, інтегрованого в середовище MEGA. Після чого філогенетичне дерево будували методом Neighbor-Joining із використанням bootstrap-аналізу.

2.8. Статистична обробка результатів

Для статистичної обробки отриманих результатів використовували вбудовані функції програми Microsoft Excel, зокрема обчислення середнього арифметичного значення для визначення розмірів ціанофагів. Додатково для аналізу даних і обробки результатів філогенетичних досліджень застосовували вбудовані статистичні інструменти програмного забезпечення MEGA.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Виявлення та морфологічна характеристика ціанофітів у прісноводних екосистемах Києва

Основним джерелом ціанофітів є природні водні об'єкти, такі як озера, річки та водосховища, з яких відбираються зразки для досліджень. Необхідний об'єм зразка залежить від середовища і може варіюватися від кількох мілілітрів до десятків літрів. За необхідності віруси можуть бути сконцентровані з великих об'ємів води для підвищення чутливості їх виявлення [30]. Нами було відібрано 16 зразків води в період з липня по вересень 2024 року, що відповідає літньо-осінньому періоду, який характеризується підвищеною біологічною активністю ціанобактерій та частими випадками цвітіння води. Відбір зразків здійснювали в межах різних водних об'єктів міста Києва, що відрізняються за гідрологічними та екологічними характеристиками.

Зокрема, зразки відбирали з річки Дніпро (в районі острова Муромець і Труханового острова), Русанівського каналу, озера в парку «Перемога», а також зі ставків № 15 та № 14 у Святошинському районі. Обрані локації включали як проточні, так і стоячі водойми, що дозволило охопити різні типи водних екосистем і підвищити репрезентативність дослідження.

Вибір періоду відбору був зумовлений тим, що саме в теплі місяці спостерігається інтенсивний розвиток ціанобактерій, що, у свою чергу, створює сприятливі умови для поширення ціанофітів. Таким чином, досліджувані локації та часові рамки дозволили максимізувати ймовірність виявлення вірусних частинок. Мапу відбору зразків наведено нижче на рисунку 1.

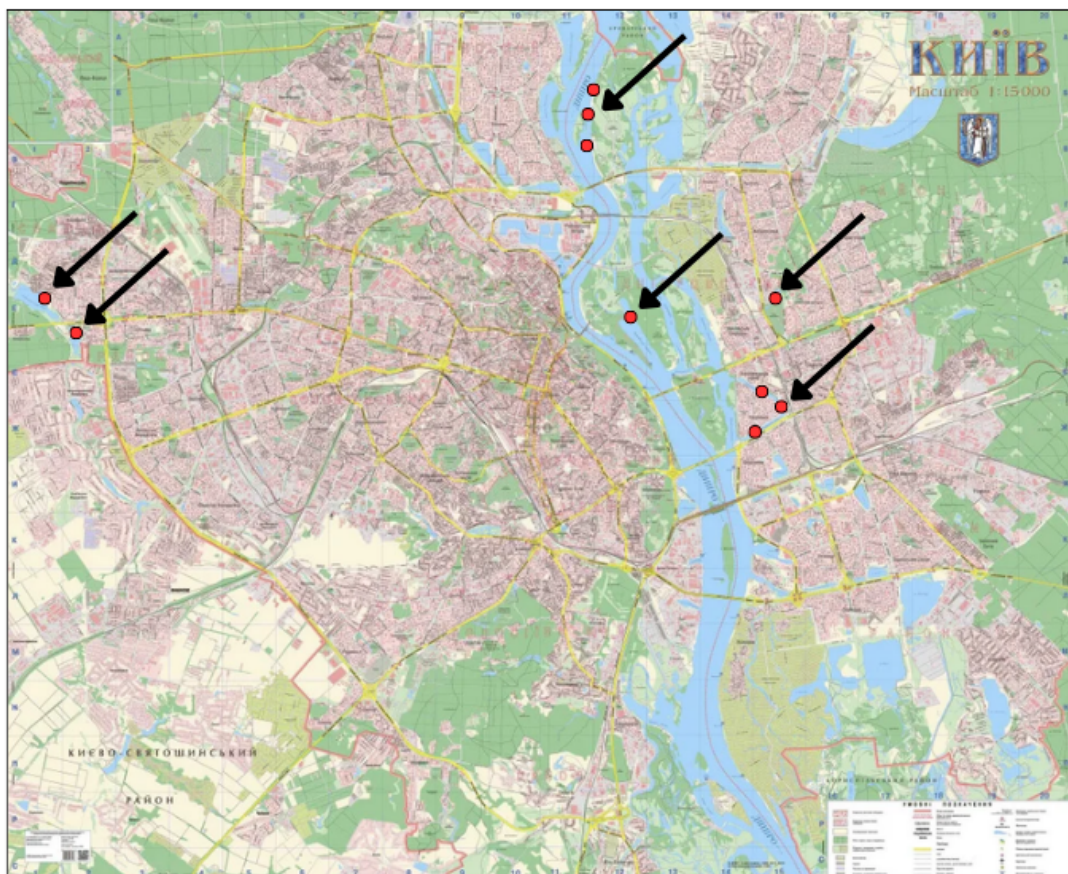


Рис. 3.1.1. Місця відбору зразків на мапі міста Києва.

Усі досліджувані водні об'єкти характеризувалися наявністю активного цвітіння води, зокрема мутно-зеленим забарвленням та формуванням щільної поверхневої зеленої плівки на поверхні, як представлено на фото нижче. Подібні візуальні ознаки є типовими для масового розвитку ціанобактерій, зокрема представників родів *Microcystis* та *Dolichospermum* (*Anabaena*), які здатні утворювати поверхневі агрегати завдяки наявності газових вакуоль, що забезпечують регуляцію плавучості, а також раніше були описані у Україні [9] [53].

Формування таких скупчень свідчить про високу біомасу фотосинтезуючих мікроорганізмів і часто супроводжується зниженням прозорості води, зміною її фізико-хімічних параметрів та підвищенням ризику накопичення ціанотоксинів, зокрема мікроцистинів, які становлять загрозу для водних екосистем і здоров'я людини [6]. Наявність щільної поверхневої плівки також може обмежувати газообмін між водою та атмосферою, спричиняючи локальні коливання концентрації кисню та негативно впливаючи на інші гідробіоти [12].

Крім того, активне цвітіння води створює сприятливі умови для розвитку ціанофагів, оскільки висока щільність популяцій господаря забезпечує ефективну взаємодію між вірусами та клітинами ціанобактерій. Це узгоджується з концепцією «kill-the-winner», відповідно до якої віруси відіграють ключову роль у регуляції домінуючих популяцій мікроорганізмів та підтриманні мікробного різноманіття [27].

Таким чином, наявність інтенсивного цвітіння у досліджуваних водоймах не лише характеризує їхній екологічний стан, але й вказує на потенційно високу активність вірусних агентів.

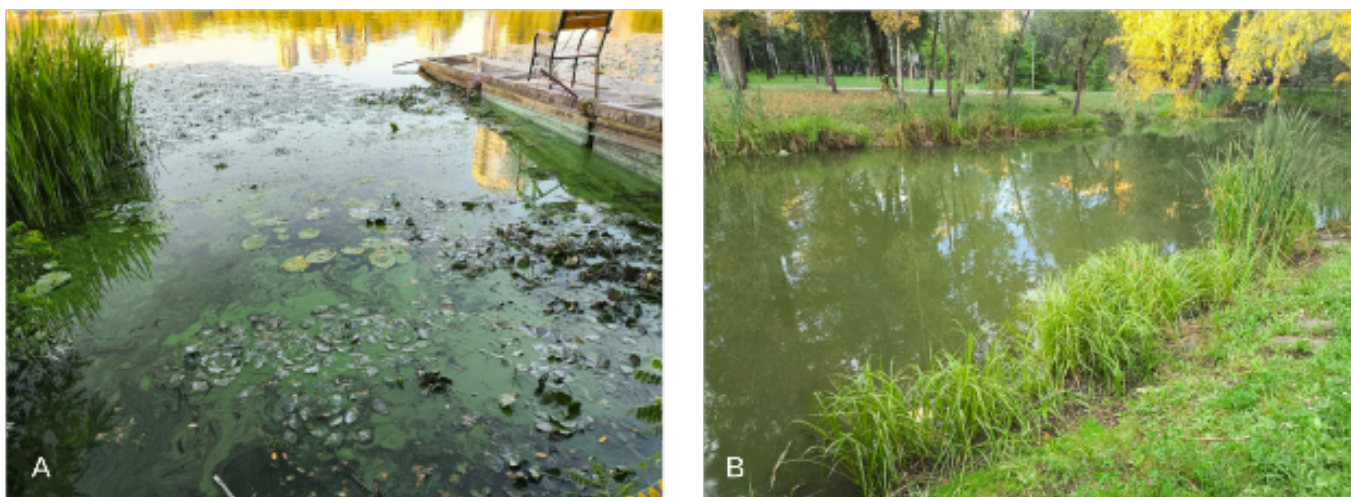


Рис. 3.1.2. Місця відбору зразків з характерними ознаками цвітіння води. А - річка Дніпро; В – озеро у парку Перемога (Дніпровський район).

Додатково було проведено характеристику умов середовища відбору зразків було проведено фізико-хімічний аналіз води. Як представлено у таблиці 1.1., досліджувані водойми відрізнялися за температурою, рівнем рН, вмістом розчинених речовин (TDS) та електропровідністю. Зокрема, значення рН варіювали в межах від 7.14 до 8.02, що відповідає нейтральному та слабколужному середовищу. Найнижче значення рН (7.14) було зафіксовано в озері у парку Перемога, тоді як найвище (8.02) — у Русанівському каналі. В інших точках показники рН також залишалися близькими до слабколужних значень (8.00 та 7.65).

Електропровідність води (ЕС) у досліджуваних зразках коливалася в діапазоні від 345 до 409 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Найнижче значення було зафіксовано в озері у парку Перемога (345 $\mu\text{S}/\text{cm}$), тоді як найвище — у Русанівському каналі (409 $\mu\text{S}/\text{cm}$). В інших водоймах електропровідність становила 399 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Труханів острів) та 406 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (р. Дніпро, острів Муромець).

Вміст загальних розчинених речовин (TDS) знаходився в межах від 172 до 202 ppm. Найнижче значення TDS (172 ppm) було визначено в озері у парку Перемога, тоді як в інших досліджуваних водоймах цей показник був вищим і коливався в межах 200–202 ppm.

Отримані результати свідчать про відносно однорідний рівень мінералізації води у більшості досліджуваних об'єктів, за винятком озера у парку Перемога, де всі показники (рН, ЕС, TDS) були дещо нижчими. Загалом значення електропровідності та TDS узгоджуються між собою, що підтверджує стабільність вимірювань та відображає подібний рівень розчинених іонів у воді.

Більшість із досліджуваних водойм характеризувалися як евтрофні або гіпертрофні, що свідчить про високий рівень біологічної продуктивності та створює сприятливі умови для розвитку ціанобактерій і відповідно ціанофагів.

Трофічний статус водойм визначає їхню біологічну продуктивність і безпосередньо пов'язаний із концентрацією біогенних елементів, передусім сполук азоту та фосфору, які є ключовими чинниками розвитку водних організмів [6]. Залежно від рівня забезпеченості поживними речовинами водойми поділяють на кілька основних типів. Мезотрофні водойми відзначаються помірним рівнем біологічної продуктивності та середнім вмістом поживних речовин. У таких екосистемах спостерігається збалансований розвиток фітопланктону та інших компонентів біоти. Евтрофні водойми, навпаки, містять високі концентрації біогенних сполук і характеризуються інтенсивною первинною продукцією. Зазвичай це неглибокі водойми, які добре прогріваються, мають зеленувате або буре забарвлення води та значну кількість органічної речовини в донних відкладах. У таких умовах часто відбувається масовий розвиток фітопланктону, зокрема ціанобактерій, що проявляється у вигляді “цвітіння” води [4, 14].

Отже, показники рН, електропровідності та загального вмісту розчинених речовин свідчать про помірний рівень мінералізації досліджуваних водойм та їх слабколужний характер. Такі умови є сприятливими для розвитку ціанобактерій, оскільки забезпечують наявність необхідних іонів та оптимальне середовище для фотосинтетичної активності. У поєднанні з евтрофним або гіпертрофним статусом водойм це вказує на сприятливі умови для розвитку мікробних спільнот: ціанобактерій та ціанофагів.

Таблиця 3.1.1.

Основні фізико-хімічні показники води у досліджуваних водоймах

Місце відбору зразків	Кількість відібраних зразків	Продуктивність водойми	Т (°C)	рН	TDS (ppm)	EC (µS/cm)
Труханів острів	1	Евтрофна	24.6	8.00	200	399
Озеро у парку Перемога	2	Гіпертрофна	18.8	7.14	172	345
Русанівський канал	4	Евтрофна	22.9	8.02	202	409
р. Дніпро (острів Муромець)	7	Мезотрофна	19.3	7.65	202	406

З різних джерел відбирали зразки води різного об'єму, який визначався характеристиками середовища і який міг варіюватися від кількох мілілітрів до десятків літрів. На початковому етапі дослідження використовували зразки об'ємом 120–600 мл, як показано у таблиці 1.2., що є оптимальним компромісом між репрезентативністю та зручністю обробки. Такий об'єм дозволяє отримати достатню кількість вірусних частинок із попереднім концентруванням, особливо в умовах інтенсивного цвітіння води, де щільність ціанобактерій і ціанофагів є

підвищеною. Крім того, використання середніх об'ємів є доцільним на етапі скринінгу, оскільки дозволяє швидко обробити більшу кількість зразків, мінімізуючи витрати часу та ресурсів, а також знижує ризик втрат матеріалу під час фільтрації чи інших процедур підготовки.

Водночас відомо, що вірусні частинки у природних водних екосистемах розподілені нерівномірно, що може впливати на результати аналізу при використанні обмежених об'ємів. Тому у подальших дослідженнях передбачається відбір більших об'ємів води (близько 1 літра) з тих джерел, у яких було підтверджено наявність вірусів, з метою підвищення концентрації вірусних частинок та забезпечення можливості проведення більш детального аналізу, зокрема молекулярного.

Далі зібрані зразки змішували зі стерильним поживним середовищем BG-11 у співвідношенні 1:1 з метою збагачення ціанофагів. Використання середовища BG-11 забезпечувало оптимальні умови для росту ціанобактерій, які слугують господарями для ціанофагів, що сприяло підвищенню концентрації вірусних частинок у зразках.

Наступним етапом застосування послідовної фільтрації та центрифугування дозволило ефективно видалити більшість клітинних і механічних домішок із водних зразків. Використання мембранних фільтрів із порами 1,2 та 0,45 мкм забезпечило відокремлення зоопланктону та бактеріальних клітин, при цьому вірусні частинки залишалися у фільтраті.

Концентрування вірусних частинок методом ультрацентрифугування дозволило отримати осад, який після ресуспендування у середовищі BG-11 використовували для подальших досліджень. Паралельно застосовували альтернативний підхід: метод адсорбції–елюції із застосуванням стерильних шприцевих фільтрів, який також забезпечував отримання вірусних препаратів.

Таблиця 3.1.2.

Перелік відібраних зразків води із зазначенням місця, дати, координат та об'єму

№ зразка	Місце відбору	Дата відбору	Координати	Об'єм зразка (мл)
1	Острів Муромець	06.08.2024	50°29'48.7"N 30°32'07.8"E	120
2	Острів Муромець	06.08.2024	50°30'13.5"N 30°32'03.7"E	120
3	Острів Муромець	06.08.2024	50°30'46.7"N 30°32'06.6"E	120
4	Острів Муромець	06.08.2024	50°29'56.0"N 30°32'42.3"E	500
5	Острів Муромець	08.08.2024	50°29'42.6"N 30°32'50.3"E	500
6	Острів Муромець	08.08.2024	50°30'22.9"N 30°32'53.7"E	500
7	Острів Муромець	12.08.2024	50°30'11.0"N 30°32'56.9"E	500
8	Русанівський канал	10.09.2024	50°26'37.7"N 30°35'54.3"E	250
9	Русанівський канал	11.09.2024	50°25'55.5"N 30°35'41.7"E	250
10	Русанівський канал	10.09.2024	50°26'07.3"N 30°36'11.5"E	600
11	Русанівський канал	12.09.2024	50°26'33.2"N 30°36'19.1"E	250
12	Парк Перемога	10.09.2024	50°28'01.8"N, 30°36'22.4"E	600
13	Парк Перемога	30.08.2024	50°28'01.7"N, 30°36'23.0"E	600
14	Труханів острів	12.08.2024	50°27'45.6"N, 30°31'55.9"E	600
15	Став №15	12.09.2024	50°27'40.3"N 30°20'06.4"E	200
16	Став №14	13.09.2024	50°27'02.7"N 30°20'38.8"E	500

На наступному етапі для перевірки наявності та візуалізації вірусних частинок використовували трансмісійну електронну мікроскопію.

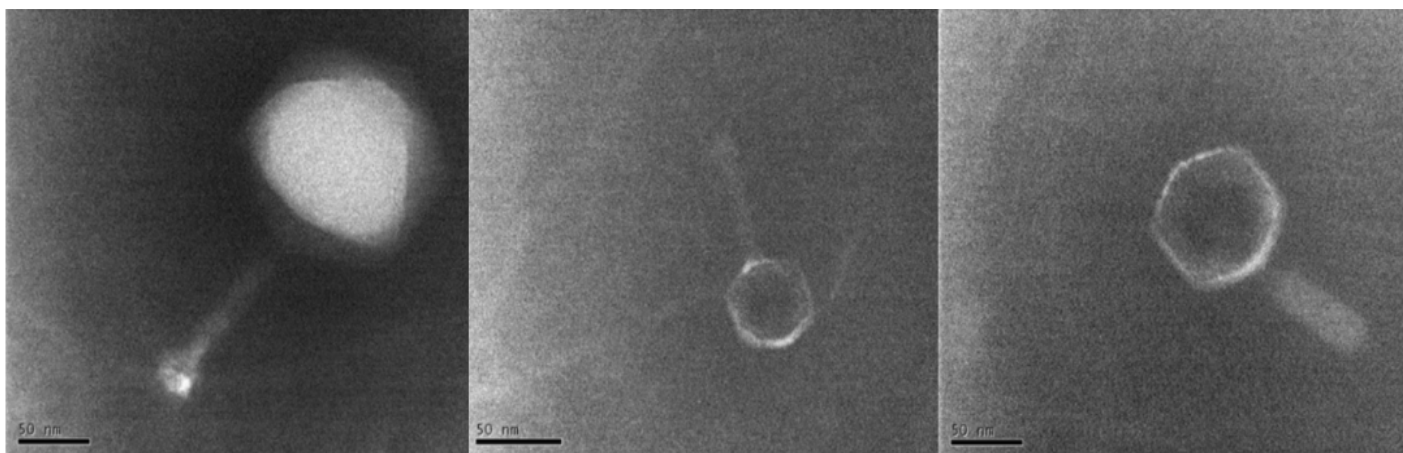


Рис. 3.1.3. Електронно-мікроскопічні зображення вірусів ціанобактерій.

Масштаб: 50 нм.

За допомогою трансмісійної електронної мікроскопії було підтверджено наявність вірусних частинок у частині досліджених зразків, зокрема у двох зразках із озера в парку «Перемога» та одному з Русанівського каналу (рис. 3.3). Для візуалізації віріонів використовували негативне контрастування, що дозволило чітко визначити морфологічні особливості вірусних частинок.

Виявлені віріони належали до змішаного типу симетрії морфотипу A1, характерного для міо-подібних вірусів. Вони мали ікосаедричний капсид діаметром 70–90 (+1) нм і хвостовий відросток довжиною 90–100 (+1) нм, що також узгоджується з описаними характеристиками представників родини *Myoviridae*. Наявність добре вираженого хвостового апарату, морфологічно подібного до фагів родини *Myoviridae*, може свідчити про його скоротливий тип, що є характерним для багатьох літичних фагів.

Водночас у досліджених зразках спостерігалася певна варіабельність розмірів віріонів, що може бути зумовлено як природною гетерогенністю популяції вірусів у природних водних екосистемах, так і впливом фізико-хімічних факторів середовища.

З огляду на морфологічні характеристики, отримані результати дозволяють попередньо віднести виявлені вірусні частинки до родини *Myoviridae*. Однак морфологічний аналіз сам по собі не є достатнім для точної таксономічної

ідентифікації, оскільки подібні морфотипи можуть зустрічатися у різних філогенетичних групах фагів.

Отже, в подальшому, з метою визначення таксономічного положення виявлених віріонів було проведено молекулярний аналіз із використанням маркерного гена *gp20*, характерного для літичних ціанофагів подібних до міовірусів.

3.2. Молекулярний аналіз ціанофагів на основі аналізу гена *gp20*

Сучасні підходи до ідентифікації ціанофагів включають молекулярно-генетичні методи, зокрема полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) та секвенування геному. Використання специфічних генетичних маркерів, таких як гени структурних білків (*gp20*) або фотосинтетичних генів (наприклад, *psbA*), дозволяє здійснювати детекцію та кількісну оцінку ціанофагів у природних зразках. Секвенування геному дає можливість дослідити генетичну організацію вірусів, їх еволюційні зв'язки та функціональні особливості [27].

З усіх зразків виділяли ДНК з використанням комерційного набору DNeasy та методу СТАВ. Використання двох різних методів екстракції ДНК обумовлене складністю природних зразків, які можуть містити інгібітори ПЛР, зокрема гумінові речовини та полісахариди. Комбінування підходів дозволяє підвищити ймовірність отримання якісної ДНК, придатної для подальшого аналізу.

В подальшому проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для ампліфікації фрагмента гена *gp20* із використанням дегенеративних праймерів. Ці праймери були розроблені Fuller та співавторами для специфічного виявлення ДНК ціанофагів, що інфікують морські штами *Synechococcus* [42]. Ген *gp20* кодує високо консервативний капсидний білок Т4-подібних міовірусів і широко використовується як молекулярний маркер для їх ідентифікації. Було показано, що гомологічні послідовності цього гена поширені серед ціанофагів, що свідчить про значну консервативність структурних генів Т4-типу у вірусів, які інфікують ціанобактерії [42]. У вихідному дослідженні встановлено, що праймери CPS1/CPS2 специфічно ампліфікують ДНК ціанофагів родини *Myoviridae* (*Cyanomyoviridae*) [42].

Використання дегенеративних праймерів дозволяє ампліфікувати гомологічні послідовності навіть у випадках їх часткової варіабельності, що є особливо важливим при дослідженні природних вірусних популяцій.

Наступним етапом була візуалізація отриманих продуктів ПЛР. Наявність чітких ампліконів відповідної довжини підтвердила успішність проведеної реакції та специфічність використаних праймерів.

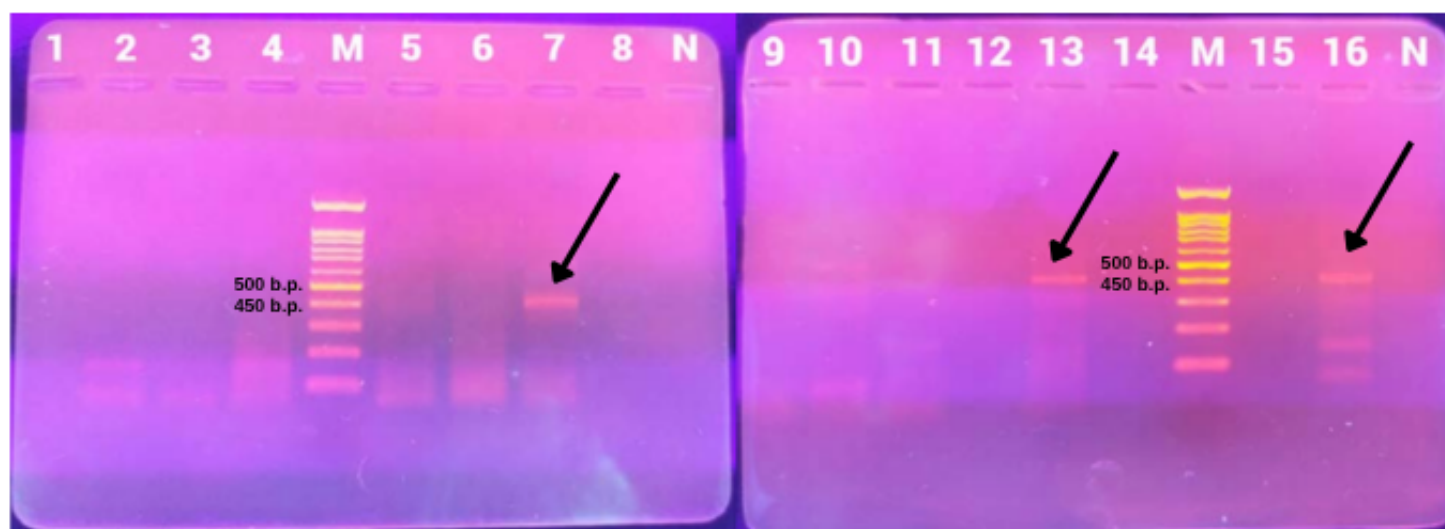


Рис. 3.2.1. Візуалізація продуктів ПЛР в агарозному гелі під УФ-випромінюванням, густина гелю – 1,4 %. Доріжки 1–16 відповідають вірусним концентратам. М — маркер ДНК (CSL-MDNA-100BP, Cleaver Scientific); N — негативний контроль.

Довжина продуктів у трьох зразках близько 450 п.н.

ПЛР-продукти очікуваного розміру були виявлені у трьох зразках із шістнадцяти досліджених. Наявність чітких ампліконів відповідної довжини підтверджувала успішність ампліфікації цільового фрагмента гена *gp20* та специфічність використаних праймерів.

Отримані амплікони були вирізані з агарозного гелю та очищені з використанням відповідного набору для очищення ДНК, що дозволило усунути залишки агарози, праймерів і ферментів, які могли б вплинути на подальший аналіз. Після очищення зразки ДНК були секвеновані.

Подальше секвенування отриманих ПЛР-продуктів дозволило визначити нуклеотидну послідовність досліджуваних фрагментів та провести їх порівняльний

аналіз із відомими послідовностями у базах даних. Це, у свою чергу, дало змогу здійснити попередню ідентифікацію досліджуваних вірусів і оцінити їхню належність до відповідних груп ціанофагів.

3.3. Біоінформатичний аналіз отриманих ампліконів

За результатами секвенування трьох зразків лише дві послідовності мали достатню якість і довжину для подальшого аналізу, а саме 593 та 449 п.н., що відповідає вимогам для проведення надійного порівняльного та філогенетичного аналізу. Обидві послідовності походили зі зразків, відібраних в озері парку «Перемога». Третя послідовність була виключена з подальшого дослідження через низьку якість та недостатню довжину, що могло б призвести до спотворення результатів.

На наступному етапі було проведено BLAST-аналіз (Basic Local Alignment Search Tool) з метою визначення подібності отриманих послідовностей до відомих вірусних геномів у базі даних. Для цього аналізу було обрано одну з послідовностей, оскільки обидві були отримані з одного водного об'єкта — озера в парку «Перемога», що дозволяє вважати їх репрезентативними. Такий підхід є доцільним на етапі первинного аналізу та дозволяє уникнути дублювання результатів.

У результаті BLAST-аналізу було отримано 67 послідовностей із найвищим рівнем подібності (параметр “Highly similar sequences”, алгоритм megablast). Найвищий рівень ідентичності спостерігався з некультивованими ціанофагами (до 83,84%) та T4-подібними вірусами, виділеними з природних середовищ (до 84,40%), як показано у таблиці нижче.

Водночас відсоток ідентичності, який не перевищує 85%, може свідчити про певну генетичну віддаленість досліджуваного ізоляту від відомих послідовностей. Це може вказувати на належність до раніше неописаних або недостатньо охарактеризованих ліній ціанофагів, що узгоджується з даними сучасних досліджень, які підкреслюють високу різноманітність вірусів у прісноводних екосистемах.

Показники E-value для всіх відібраних послідовностей знаходилися в межах від $8e-51$ до $5e-43$, що свідчить про високу статистичну значущість отриманих збігів і практично виключає їх випадковий характер. Значення query cover варіювали від 35% до 43%, що вказує на часткове перекриття досліджуваної послідовності з референтними генами, ймовірно через аналіз окремого фрагмента гена *gp20*.

Серед отриманих результатів переважали послідовності, анотовані як “uncultured cyanophage” та “T4-virus environmental sample”, що підкреслює екологічне походження найбільш подібних вірусів і свідчить про їх недостатню таксономічну характеристику. Це також узгоджується з тим, що значна частина різноманіття ціанофагів представлена саме некультивованими формами.

Таблиця 3.3.1.

Порівняння нуклеотидної послідовності гена *gp20* з базою даних NCBI (аналіз BLAST)

Query sequence	Organism	Max score	Query cover	E-value	Per. Ident	Accession
KCM763	Uncultured cyanophage	215	38%	$8e-51$	83.84%	AY152732.1
KCM763	T4virus environmental sample	213	36%	$3e-50$	84.40%	ON089204.1
KCM763	Uncultured phage	209	39%	$4e-49$	83.12%	KX290372.1
KCM763	T4virus environmental sample	195	42%	$1e-44$	80.95%	ON089190.1
KCM763	T4virus environmental sample	195	36%	$1e-44$	82.95%	ON089197.1
KCM763	Uncultured cyanophage	193	37%	$4e-44$	82.65%	AY152738.1
KCM763	Uncultured cyanophage	193	35%	$4e-44$	83.57%	KM406955.1
KCM763	T4virus environmental sample	193	41%	$4e-44$	80.88%	ON089141.1
KCM763	Uncultured cyanophage	189	42%	$5e-43$	80.63%	KC626334.1
KCM763	Uncultured cyanomiovirus	189	43%	$5e-43$	80.31%	KY082112.1

На наступному етапі було відібрано 10 нуклеотидних послідовностей із найвищим рівнем подібності за результатами пошуку в базі даних, які було завантажено у форматі .txt. До аналізу також було додано референтну послідовність гена *gp20* бактеріофага T4, яку використовували як корінь (root) для побудови філогенетичного дерева.

Подальший аналіз здійснювали у програмному середовищі MEGA 12. На першому етапі виконували конвертацію послідовностей із формату .txt у формат FASTA. Після цього проводили множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей із використанням алгоритму MUSCLE, який забезпечує високу точність і надійність вирівнювання.

Філогенетичне дерево будували методом Neighbor-Joining (NJ), який базується на матриці генетичних дистанцій і дозволяє ефективно реконструювати еволюційні зв'язки між послідовностями. Для оцінки надійності отриманих кластерів проводили bootstrap-аналіз із 1000 повторів. Значення bootstrap використовували як міру статистичної підтримки гілок дерева.

Метод Neighbor-Joining широко застосовується для аналізу *gp20*-послідовностей ціанофагів, оскільки дозволяє порівнювати консервативні ділянки геному та виявляти еволюційні зв'язки між різними групами вірусів. Зокрема, цей підхід використовувався у класичних дослідженнях прісноводних ціанофагів, наприклад у роботі Dorigo та співавт. (2004) для аналізу вірусного різноманіття в озері Бурже (Франція) [47].

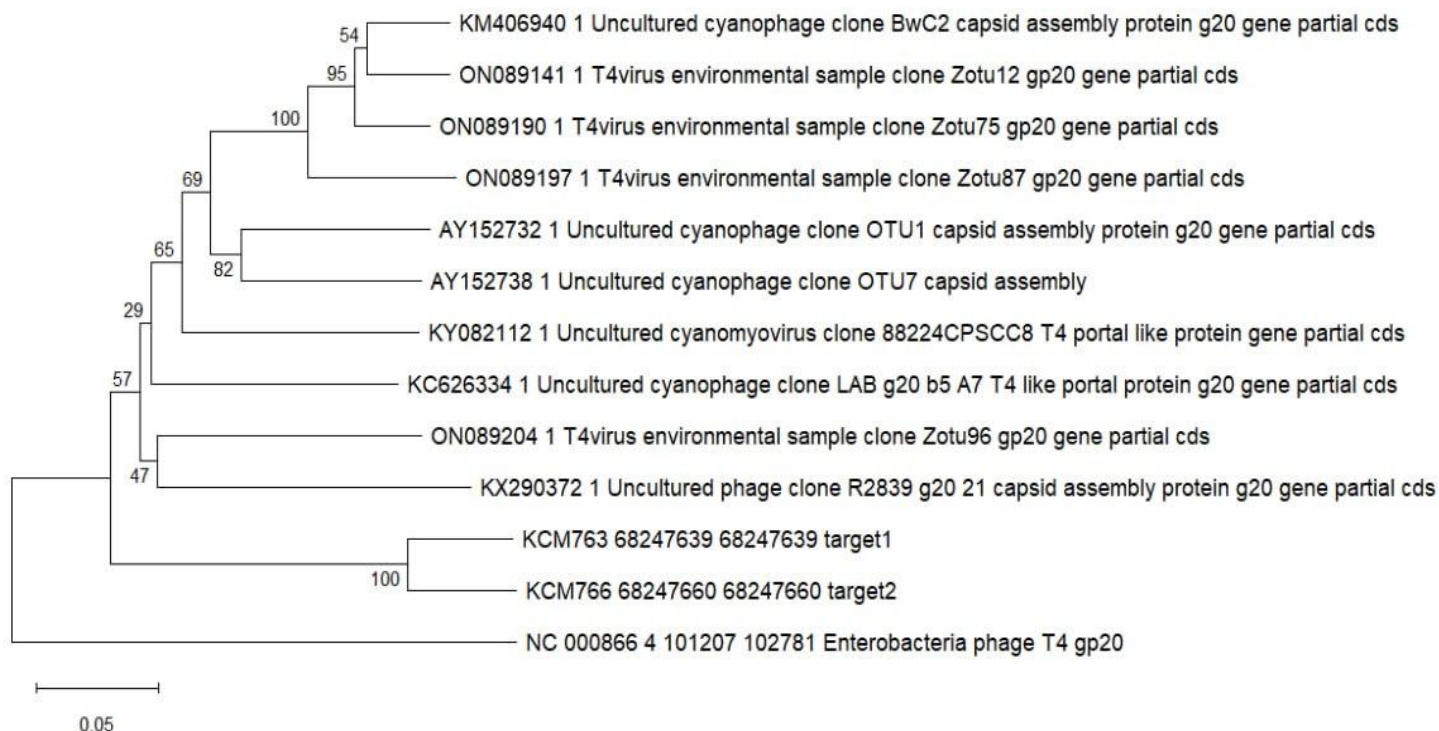


Рис. 3.3.1. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей гена gp20 ціанофагів, побудоване методом Neighbor-Joining із використанням bootstrap-аналізу. Дві досліджувані послідовності мають назву: KCM763 target 1 і KCM766 target 2.

У результаті філогенетичного аналізу встановлено, що досліджувані ціанофаги утворюють окрему гілку в межах групи T4-подібних фагів. Високе значення bootstrap (100) свідчить про високу статистичну підтримку сформованого кластеру, що підтверджує їхню близьку спорідненість між собою. Водночас їх відокремленість від інших референтних послідовностей може вказувати на наявність нового кластеру в межах T4-подібних ціанофагів.

Отримані результати узгоджуються з даними сучасних досліджень, які демонструють значну генетичну різноманітність ціанофагів, особливо у прісноводних екосистемах, що залишаються менш вивченими порівняно з морськими. Виявлення нових кластерів підкреслює важливість подальших досліджень вірусного різноманіття та свідчить про можливу наявність унікальних

генетичних варіантів, адаптованих до специфічних екологічних умов досліджуваних водойм.

Водночас слід враховувати, що філогенетичний аналіз, виконаний на основі одного маркерного гена (*gp20*), не дозволяє повною мірою охарактеризувати геномну організацію досліджуваних вірусів. У зв'язку з цим доцільним є повторити експеримент та провести повногеномне секвенування (NGS) виділених ціанофагів, що дозволить детально дослідити їх геном, виявити наявність функціональних генів, зокрема допоміжних метаболічних генів (AMGs).

Отримані дані сприятимуть більш точному встановленню таксономічного положення досліджуваних фагів відповідно до сучасних підходів вірусної класифікації, а також дозволять провести порівняльний повногеномний філогенетичний аналіз. Це, у свою чергу, забезпечить глибше розуміння еволюційних зв'язків, адаптаційних механізмів і потенційної екологічної ролі виявлених ціанофагів у водних екосистемах.

Подальші дослідження також мають бути спрямовані на визначення спектра господарів та оцінку потенціалу використання цих вірусів для контролю цвітіння води. Низка експериментальних досліджень підтверджує потенціал ціанофагів як засобу біологічного контролю ціанобактеріальних цвітінь. У лабораторних умовах показано, що внесення ціанофагів призводить до пригнічення росту ціанобактерій без суттєвого впливу на процеси азотфіксації та експресію генів нітрогенази [37]. Зокрема, при ко-культивуванні *M. aeruginosa* з природним ціанофагом Ma-LBP чисельність клітин зменшувалася на 95% протягом 6 діб, однак через три тижні спостерігалось відновлення популяції, що може бути пов'язано з розвитком резистентності або зміною співвідношення фаг–господар [54]. Водночас, незважаючи на ці перспективні результати, практичне застосування ціанофагів у природних водоймах залишається обмеженим, оскільки динаміка у екосистемах є складною і може призводити до встановлення іншого екологічного балансу після початкового зниження чисельності господаря. Станом на сьогодні відсутні масштабні польові дослідження, що ускладнює оцінку ефективності та безпечності такого підходу в реальних умовах [44].

У цьому контексті перспективним напрямом є застосування підходів синтетичної біології для модифікації ціанофагів. Зокрема, в сучасних дослідженнях вже було демонстровано можливість біотехнологічного конструювання геномів ціанофагів. Було отримано модифіковані варіанти, такі як Syn-P4-8 та Syn-A-4-8, а також здійснено *de novo* синтез ціанофага A-4L, що підтверджує можливість створення вірусів із заданими властивостями [44]. Крім того, застосування системи CRISPR-Cas12a дозволило отримати мутантні варіанти фагів (A-1(L), A-4(L)) із мінімальним набором генів, що необхідні для літичного життєвого циклу [44].

Таким чином, результати дослідження не лише розширюють уявлення про різноманіття ціанофагів у прісноводних екосистемах у м. Києві, але й підкреслюють їх потенціал як ключового фактору регуляції мікробних спільнот та перспективного об'єкта для подальших біотехнологічних досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Проведене обстеження прісноводних водойм урбанізованих територій міста Києва дозволило виділити та охарактеризувати специфічні віруси ціанобактерій (ціанофаги).
2. За результатами трансмісійної електронної мікроскопії було візуалізовано віріони змішаного типу симетрії, морфотипу A1 із такими розмірами: діаметр капсиду 90-100 нм та довжина хвоста 70-90 нм.
3. У трьох досліджуваних зразках було підтверджено присутність ціаноміовірусів за допомогою ПЛР-ампліфікації фрагмента розміром 450 п.н. з подальшою візуалізацією результатів методом горизонтального електрофорезу.
4. В результаті BLASTn-аналізу секвованого амплікону з використанням бази даних NCBI GenBank було виявлено найвищу подібність (83.84% ідентичності) до фрагментів гена *gp20* некультивованих ціанофагів (номер доступу: AY152732.1).
5. Результати порівняльного філогенетичного аналізу дозволяють класифікувати досліджувані ціанофаги як представників потенційно нового таксономічного кластеру в групі T4-подібних фагів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Whitton, B.A. and Potts, M. (2000). *The ecology of Cyanobacteria : their diversity in time and space*. Dordrecht: Kluwer Academic.
2. Ricciardelli, A., Pollio, A., Costantini, M. and Zupo, V. (2023). Harmful and beneficial properties of cyanotoxins: Two sides of the same coin. *Biotechnology Advances*, [online] 68, p.108235. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108235>.
3. Czyżewska, W., Piontek, M. and Łuszczynska, K. (2020). The Occurrence of Potential Harmful Cyanobacteria and Cyanotoxins in the Obrzyca River (Poland), a Source of Drinking Water. *Toxins*, 12(5), p.284. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins12050284>.
4. Svirčev, Z., Lalić, D., Bojadžija Savić, G., Tokodi, N., Drobac Backović, D., Chen, L., Meriluoto, J., & Codd, G. A. (2019). Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Archives of toxicology*, 93(9), 2429–2481. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02524-4>
5. Mehdizadeh Allaf, M. and Peerhossaini, H. (2022). Cyanobacteria: Model Microorganisms and Beyond. *Microorganisms*, [online] 10(4), p.696. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms10040696>.
6. www.who.int. (n.d.). *Toxic cyanobacteria in water - Second edition*. [online] Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/toxic-cyanobacteria-in-water---second-edition>.
7. Agarwal, P., Soni, R., Kaur, P., Madan, A., Mishra, R., Pandey, J., Singh, S. and Singh, G. (2022). Cyanobacteria as a Promising Alternative for Sustainable Environment: Synthesis of Biofuel and Biodegradable Plastics. *Frontiers in Microbiology*, 13. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.939347>.
8. Żymańczyk-Duda, E., Samson, S.O., Brzezińska-Rodak, M. and Klimek-Ochab, M. (2022). Versatile Applications of Cyanobacteria in Biotechnology. *Microorganisms*, 10(12), p.2318. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms10122318>.

9. Vinogradova, O. M. (2022). *Cyanobacteria of Ukraine: Actual diversity, trends of taxonomic changes, features of zonal and ectopic distribution*. *Algologia*, 32(4), 309–339. <https://doi.org/10.15407/alg32.04.309>
10. Dei.gov.ua. (2019). *Державна екологічна інспекція у Чернігівській області*. [online] Available at: <https://chernigiv.dei.gov.ua/post/1171> [Accessed 2 May 2026].
11. Hill, R. W. (n.d.). 13.7: *Eutrophication*. In *Oceanography*. LibreTexts.
12. Paerl, H.W. and Otten, T.G. (2013). Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, [online] 65(4), pp.995–1010. doi:<https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>.
13. Shevchenko, T.F., Sereda, T.M., Nezbyrtska, I.M., Bilous, O.P. and Afanasyev, S.O. (2024). Changes in Phytoplankton of the Irpin River (Ukraine) as a Result of Military Activities in Its Basin. *Hydrobiological Journal*, 60(4), pp.24–37. doi:<https://doi.org/10.1615/hydrobj.v60.i4.20>.
14. Piontek, M., Czyżewska, W. and Mazur-Marzec, H. (2023). Effects of Harmful Cyanobacteria on Drinking Water Source Quality and Ecosystems. *Toxins*, [online] 15(12), p.703. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins15120703>.
15. Fais, G., Manca, A., Bolognesi, F., Borselli, M., Concas, A., Busutti, M., Broggi, G., Sanna, P., Castillo-Aleman, Y.M., Rivero-Jiménez, R.A., Bencomo-Hernandez, A.A., Ventura-Carmenate, Y., Altea, M., Pantaleo, A., Gabrielli, G., Biglioli, F., Cao, G. and Giannaccare, G. (2022). Wide Range Applications of Spirulina: From Earth to Space Missions. *Marine Drugs*, [online] 20(5), p.299. doi:<https://doi.org/10.3390/md20050299>.
16. Sato, S., Murata, A., Orihara, T., Shirakawa, T., Suenaga, K., Kigoshi, H. and Uesugi, M. (2011). Marine Natural Product Aurilide Activates the OPA1-Mediated Apoptosis by Binding to Prohibitin. *Chemistry & Biology*, 18(1), pp.131–139. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.10.017>.
17. Qamar, H., Hussain, K., Soni, A., Khan, A., Hussain, T. and Chénais, B. (2021). Cyanobacteria as Natural Therapeutics and Pharmaceutical Potential: Role in Antitumor Activity and as Nanovectors. *Molecules*, [online] 26(1), p.247. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules26010247>.

18. Mahapatra, K., Maharana, S.R., Mir, S.A., Bordhan, M. and Nayak, B. (2026). Discovery of biselyngbyaside B a novel lead inhibitor of drug-resistant bacteria targeting DNA gyrase B. *Computational Biology and Chemistry*, 120, p.108628. doi:<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2025.108628>.
19. Favas, R., Morone, J., Martins, R., Vasconcelos, V., & Lopes, G. (2022). Cyanobacteria Secondary Metabolites as Biotechnological Ingredients in Natural Anti-Aging Cosmetics: Potential to Overcome Hyperpigmentation, Loss of Skin Density and UV Radiation-Deleterious Effects. *Marine drugs*, 20(3), 183. doi:<https://doi.org/10.3390/md20030183>
20. Lau, N.-S., Matsui, M. and Abdullah, A.A.-A. (2015). Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. *BioMed Research International*, [online] 2015. doi:<https://doi.org/10.1155/2015/754934>.
21. Saleem, A., Anwar, S., Saud, S., Kamal, T., Shah Fahad and Nawaz, T. (2025). Cyanobacteria diversity and ecological roles: insights into cyanobacterial adaptations and environmental implications. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*. doi:<https://doi.org/10.1007/s43994-025-00261-2>.
22. Gupta, R.C. (2009). *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Academic Press.
23. Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. *Interdisciplinary toxicology*, 2(2), 36–41. doi:<https://doi.org/10.2478/v10102-009-0006-2>
24. Zhang, D., He, Y. and Gin, K.Y.-H. (2021). Novel Freshwater Cyanophages Provide New Insights into Evolutionary Relationships between Freshwater and Marine Cyanophages. *Microbiology Spectrum*, 9(2). doi:<https://doi.org/10.1128/spectrum.00593-21>.
25. Xia, H., Li, T., Deng, F. and Hu, Z. (2013). Freshwater cyanophages. *Virologica Sinica*, 28(5), pp.253–259. doi:<https://doi.org/10.1007/s12250-013-3370-1>.

26. Jassim, S. A., & Limoges, R. G. (2013). Impact of external forces on cyanophage-host interactions in aquatic ecosystems. *World journal of microbiology & biotechnology*, 29(10), 1751–1762. doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1358-5>
27. Finke, J. F., & Suttle, C. A. (2019). The Environment and Cyanophage Diversity: Insights From Environmental Sequencing of DNA Polymerase. *Frontiers in microbiology*, 10, 167. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00167>
28. Singh, P., Singh, S. S., Srivastava, A., Singh, A., & Mishra, A. K. (2012). *Structural, functional and molecular basis of cyanophage–cyanobacterial interactions and its significance*. African Journal of Biotechnology, 11(11), 2591–2608. doi:<https://doi.org/10.5897/AJB10.970>
29. Srivastava, A., Mishra, A. K., & Kumar, A. (2024). *Cyanophages: Interacting mechanism and evolutionary significance*. In *Cyanobacteria*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-13231-5.00014-3>
30. Chénard, C., & Chan, A. M. (2018). Isolation and Purification of Viruses Infecting Cyanobacteria Using a Liquid Bioassay Approach. *Bio-protocol*, 8(2), e2691. doi:<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2691>
31. Київський національний університет імені Тараса Шевченка Навчально-науковий центр ‘Інститут біології та медицини’ Кафедра вірусології МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО ДИСЦИПЛІНИ ‘ВІРУСИ АРХЕЙ, МІКОПЛАЗМ ТА ЦІАНОБАКТЕРІЙ’ ДЛЯ СТУДЕНТІВ ОП ‘МАГІСТР’, ЩО НАВЧАЮТЬСЯ ЗА ОП ‘БІОЛОГІЯ’ КИЇВ 2022. (n.d.). Available at: https://biomed.knu.ua/images/stories/Kafedry/Virusol/Library/Virusy_archey_mikoplasm_metodychka.pdf [Accessed 2 May 2026].
32. Pandey, S., Narayanan, I., Vinayagam, R., Selvaraj, R., Varadavenkatesan, T., & Pugazhendhi, A. (2023). *A review on the effect of blue green 11 medium and its constituents on microalgal growth and lipid production*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 11(6), 109984. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.109984>
33. Zhang, D., You, F., He, Y., Te, S. H., & Gin, K. Y. (2020). Isolation and Characterization of the First Freshwater Cyanophage Infecting *Pseudanabaena*. *Journal of virology*, 94(17), e00682-20. doi:<https://doi.org/10.1128/JVI.00682-20>

34. Jin, H., Jiang, Y. L., Yang, F., Zhang, J. T., Li, W. F., Zhou, K., Ju, J., Chen, Y., & Zhou, C. Z. (2019). Capsid Structure of a Freshwater Cyanophage Siphoviridae Mic1. *Structure (London, England : 1993)*, 27(10), 1508–1516.e3. doi:<https://doi.org/10.1016/j.str.2019.07.003>
35. Yu, R.-C., Yang, F., Zhang, H.-Y., Hou, P., Du, K., Zhu, J., Cui, N., Xu, X., Chen, Y., Li, Q. and Zhou, C.-Z. (2024). Structure of the intact tail machine of Anabaena myophage A-1(L). *Nature Communications*, 15(1), pp.2654–2654. doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-024-47006-z>.
36. Haffar, M.A., Ziad Fajloun, Azar, S., Sabatier, J.-M. and Khattar, Z.A. (2024). Lesser-Known Cyanotoxins: A Comprehensive Review of Their Health and Environmental Impacts. *Toxins*, 16(12), pp.551–551. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins16120551>.
37. Kuznecova, J., Šulčius, S., Vogts, A., Voss, M., Jürgens, K., & Šimoliūnas, E. (2020). Nitrogen Flow in Diazotrophic Cyanobacterium Aphanizomenon flos-aquae Is Altered by Cyanophage Infection. *Frontiers in microbiology*, 11, 2010. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02010>
38. Safferman, R.S. and Morris, M.-E. (1964). GROWTH CHARACTERISTICS OF THE BLUE-GREEN ALGAL VIRUS LPP-1. *Journal of Bacteriology*, 88(3), pp.771–775. doi:<https://doi.org/10.1128/jb.88.3.771-775.1964>.
39. Weinbauer, M.G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), pp.127–181. doi:<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>.
40. Brenner, S. and Horne, R.W. (1959). A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 34, pp.103–110. doi:[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90237-9](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90237-9).
41. Thurber, R.V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L. and Rohwer, F. (2009). Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nature Protocols*, 4(4), pp.470–483. doi:<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.10>.
42. Fuller, N.J., Wilson, W.H., Joint, I.R. and Mann, N.H. (1998). Occurrence of a Sequence in Marine Cyanophages Similar to That of T4 g20 and Its Application to PCR-Based Detection and Quantification Techniques. *Applied and environmental*

- microbiology*, 64(6), pp.2051–2060. doi:<https://doi.org/10.1128/aem.64.6.2051-2060.1998>.
43. Zhong, Y., Chen, F., Wilhelm, S.W., Poorvin, L. and Hodson, R.E. (2002). Phylogenetic Diversity of Marine Cyanophage Isolates and Natural Virus Communities as Revealed by Sequences of Viral Capsid Assembly Protein Gene g20. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp.1576–1584. doi:<https://doi.org/10.1128/aem.68.4.1576-1584.2002>.
 44. Guo, Y., Dong, X., Li, H., Tong, Y., Liu, Z. and Jin, J. (2024). Cyanophage Engineering for Algal Blooms Control. *Viruses*, [online] 16(11), pp.1745–1745. doi:<https://doi.org/10.3390/v16111745>.
 45. Zhang, D., He, Y. and Gin, K.Y.-H. (2022). Genomic Characterization of a Novel Freshwater Cyanophage Reveals a New Lineage of Cyanopodovirus. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.768868>
 46. Srivastava, A., Gupta, N. and Arun Kumar Mishra (2024). Cyanophages: interacting mechanism and evolutionary significance. *Elsevier eBooks*, pp.255–282. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-0-443-13231-5.00014-3>.
 47. Dorigo, U., Jacquet, S., & Humbert, J. F. (2004). Cyanophage diversity, inferred from g20 gene analyses, in the largest natural lake in France, Lake Bourget. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 1017–1022. doi:<https://doi.org/10.1128/aem.70.2.1017-1022.2004>.
 48. Wilson, W.H., Carr, N.G. and Mann, N.H. (1996). THE EFFECT OF PHOSPHATE STATUS ON THE KINETICS OF CYANOPHAGE INFECTION IN THE OCEANIC CYANOBACTERIUM SYNECHOCOCCUS SP. WH78031. *Journal of Phycology*, 32(4), pp.506–516. doi:<https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00506.x>.
 49. Grasso, C.R., Pokrzywinski, K.L., Waechter, C., Rycroft, T., Zhang, Y., Aligata, A., Kramer, M. and Lamsal, A. (2022). A Review of Cyanophage–Host Relationships: Highlighting Cyanophages as a Potential Cyanobacteria Control Strategy. *Toxins*, 14(6), p.385. doi:<https://doi.org/10.3390/toxins14060385>.

50. Padan, E. and Shilo, M. (1973). Cyanophages-viruses attacking blue-green algae. *Bacteriological Reviews*, 37(3), pp.343–370. doi:<https://doi.org/10.1128/br.37.3.343-370.1973>.
51. Benayache, N.-Y., Nguyen-Quang, T., Hushchyna, K., McLellan, K., Afri-Mehennaoui, F.-Z. and Bouaïcha, N. (2019). An Overview of Cyanobacteria Harmful Algal Bloom (CyanoHAB) Issues in Freshwater Ecosystems. *Limnology - Some New Aspects of Inland Water Ecology*. doi:<https://doi.org/10.5772/intechopen.84155>.
52. Fulton, R.S. and Paerl, H.W. (1988). Effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on zooplankton competitive relations. *Oecologia*, 76(3), pp.383–389. doi:<https://doi.org/10.1007/bf00377033>.
53. Oliver, R.L. and Walsby, A.E. (1984). Direct evidence for the role of light-mediated gas vesicle collapse in the buoyancy regulation of *Anabaena flos-aquae* (cyanobacteria). *Limnology and Oceanography*, 29(4), pp.879–886. doi:<https://doi.org/10.4319/lo.1984.29.4.0879>.
54. Tucker, S., & Pollard, P. (2005). Identification of cyanophage Ma-LBP and infection of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from an Australian subtropical lake by the virus. *Applied and environmental microbiology*, 71(2), 629–635. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.629-635.2005>