

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № _____ засідання кафедри

від ‘ ’ _____ 2024 р.

**ОСОБЛИВОСТІ БАКТЕРІОФАГІВ ВИДІЛЕНИХ ІЗ ЗРАЗКІВ ҐРУНТУ
АНТАРКТИДИ**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання
за спеціальністю біологія
Лапіної Олександри Євгеніївни
Науковий керівник від кафедри
к.б.н., доцент
Андрійчук Олена Миколаївна

Робота виконана в ННЦ «Інститут біології та медицини»
під керівництвом к.б.н. доцента Андрійчук Олени Миколаївни

Оцінка захисту роботи

Київ-2024р.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	5
1.1. Вплив абіотичних факторів на вірусну спільноту.....	5
1.2. Характеристика антарктичних бактеріофагів.....	7
1.3. Характеристика бактеріальних угруповань Антарктиди.....	9
1.4. Взаємодія бактеріофагів з хазяїном.....	12
1.5. Біологічний контроль українських ізолятів бактерій антарктичними бактеріофагами.....	15
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	18
2.1. Джерела виділення бактерій та бактеріофагів.....	18
2.2. Накопичення фагів в рідкому поживному середовищі з примусовою аерацією.....	20
2.3. Виявлення бактеріофагів на твердому середовищі.....	20
2.4. Очистка та концентрація бактеріофагів.....	22
2.5. Трансмійна електронна мікроскопія.....	22
2.6. Визначення спектру літичної активності.....	24
2.7. Статистична обробка даних.....	25
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....	26
3.1. Виділення фагів і морфологічна характеристика.....	26
3.2. Морфологія негативних колоній.....	30
3.3. Біологічна характеристика ізолятів фагів.....	33
3.4. Електронномікроскопічні дослідження.....	36
3.5. Спектр літичної активності.....	39
ВИСНОВКИ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	44

ВСТУП

Антарктиді без сумніву належить звання найхолоднішого континенту планети Земля, з середньорічною температурою близько -20°C та невеликими ділянками, що вільні від вічної мерзлоти, які складають не більше 15% від загальної площі. Дане середовище класифікується як гіпераридне з мерзлими ґрунтами на мінеральній основі, що позбавлені органічних речовин. Через вищезазначені фактори антарктичні ґрунти є чудовим модельним середовищем для дослідження мікробних взаємодій та екосистемних процесів.

На вільних від льоду ділянках Антарктиди спостерігаються значні коливання рН, що призводить до неоднорідності серед популяцій мікроорганізмів. Так на лужних ґрунтах домінують ацидофільні бактерії, тоді як на більш нейтральних розвиваються гамма-протеобактерії. Полярні регіони мають вищий ступінь контролю вірусів на мікробні спільноти, з цим пов'язаний підвищений інтерес вірусологічної спільноти до даного біотопу [1].

Мікроорганізми, що населяють антарктичні ґрунти складають найбільший відсоток живої біомаси і є рушійною силою в колооберті поживних речовин та енергії, тим часом як віруси займають всього близько 5% від загальної біомаси, але мають значні переваги в чисельності та генетичній різноманітності. Шляхом зараження хазяїна фаги контролюють чисельність бактеріальних популяцій та впливають на біогеохімічні цикли.

Від моменту відкриття величезної кількості вірусних угруповань стало очевидно, що традиційні уявлення про малозначність вірусів, як найдрібніших біологічних об'єктів було спростовано. Дослідження проведені в останні десятиліття продемонстрували визначну роль вірусів в еволюційних процесах, тому їм сміливо можна віддати головну роль агентів життя [2, 3].

Бактеріофаги Антарктичних екосистем відрізняються не тільки різноманітністю та чисельністю, але також виявляють можливості до зміни способу життя, подібного до своїх мікробних хазяїв, від псевдолізогенного до літичного, коли кліматичні умови стають сприятливими для росту мікроорганізмів [4].

Проведені метагеномні дослідження демонструють схожість між ДНК-вірусами помірних екосистем та Антарктичного регіону. Втім відомі нам результати досліджень віросфери Антарктичних екосистем не дають чіткого уявлення про вірусне різноманіття та його кореляцію. Суворі умови, що панують на території Антарктиди ускладнюють можливості досконало дослідити біорізноманіття [5]. На сьогоднішній день проведені дослідження не дають чіткого уявлення, щодо вірусологічної еволюції та взаємодії вірусів з хазяями [6].

Метою роботи було: виділити та встановити особливості бактеріофагів із зразків ґрунту Антарктиди.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вплив абіотичних факторів на вірусну спільноту

До найвпливовіших абіотичних факторів на вірусну спільноту відноситься: локалізація, рН ґрунту, температура.

Початковим кроком в утворенні антарктичних ґрунтів є механічне подрібнення корінної породи (заморожування відтавання) та вивітрювання мікроорганізмами. Утворені літозолі формують регозоль, що призводить до утворення мінеральних ґрунтів полярної пустелі. В подальшому завдяки біологічним процесам формується гумусовий шар характерний для проторанкерних ґрунтів, в яких органічний матеріал залишається на поверхні, оскільки не відбувається біотурбація [7]. Для бактеріофагів Антарктиди характерний чіткий територіальний розподіл, тобто на певній території домінує певна родина вірусів. Оптимальний рН ґрунту коливається в межах 6,0 - 6,7 (Рис. 1.1, F).

Також значний вплив має температура яка залежить від висоти. На поверхневих ґрунтах на низькій висоті (> 400 м над рівнем моря) літня температура становить близько 2°C. На цих висотах спостерігається відносно велика бактеріальна різноманітність, і як наслідок висока вірусна активність. На вічномерзлих ґрунтах антарктичного високогір'я (> 1700 м над рівнем моря) середня літня температура становить -23 °C і ніякого активного мікробного метаболізму не спостерігається (Рис. 1.1, E). Висота безпосередньо впливає на температурний режим ґрунтів Антарктики, і як наслідок на активність мікробного метаболізму, що є дуже важливим для реплікації бактеріофагів. Тому можна припустити, що висота є ключовим фактором для таксономічного складу вірусів через вплив температури на швидкість метаболізму бактерій [8].

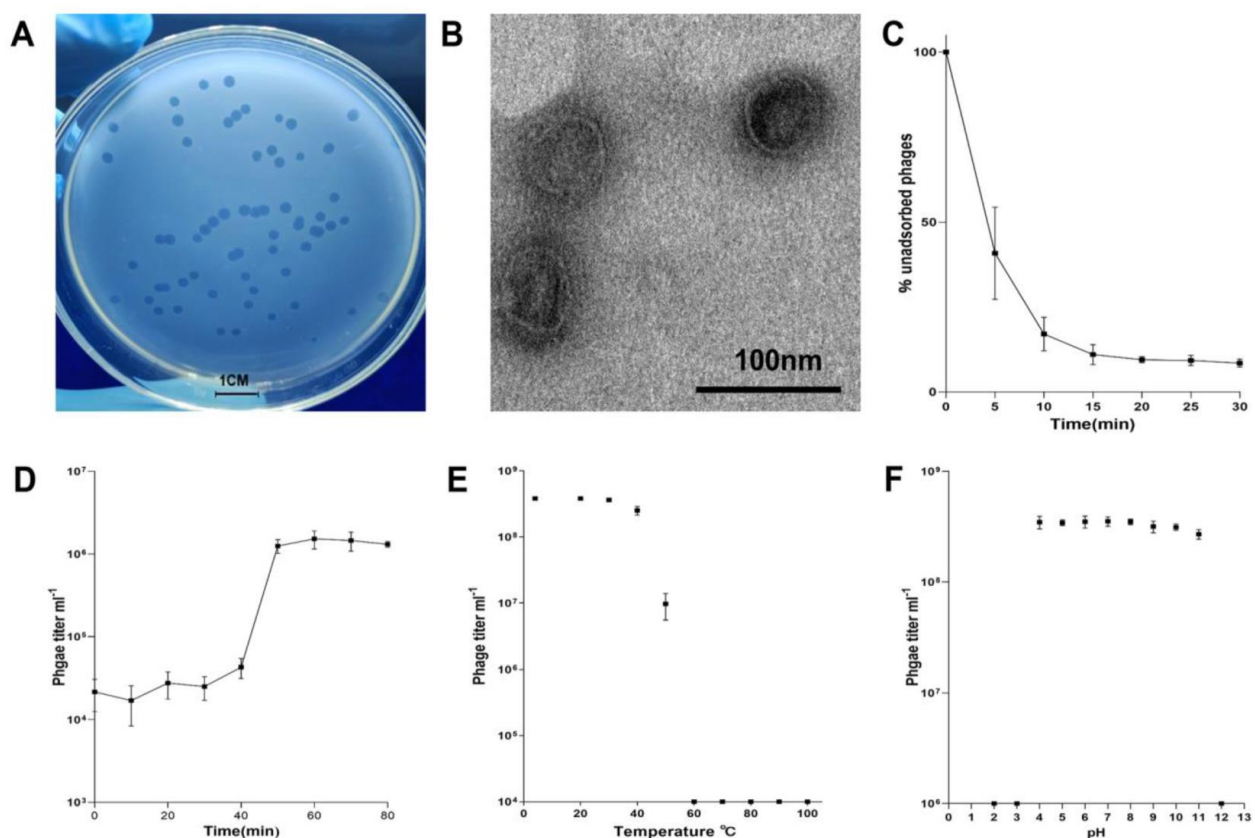


Рис. 1.1. А) Негативні колонії фага vB_PaeM-G11; В) трансмісійна електронна мікрофотографія фага vB_PaeM-G11; С) криві адсорбції фага vB_PaeM-G11 на *Pseudomonas* sp.; D) одноступенева крива зростання vB_PaeM-G11; E) експеримент температурної стабільності фага; F) експеримент зі стабільністю фага при різних значеннях рН [9].

Для Антарктичного регіону характерні специфічні стресові чинники, серед яких виділяють: осмотичні, радіаційні, тепловий шок, холодний шок. Найбільш яскраво виражені реакції пов'язані з обмеженою кількістю кисню та поживних речовин. Стійкість на обмеження концентрації білків та вуглеводів спостерігається лише в бактерії. На осмотичний фактор стресостійкість виявлена в представників *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Pseudomonadota*. Стійкість до радіації характерна для більшості бактеріальних угруповань. Тепловий шок має розповсюджений характер, на відміну від холодного шоку, який характерний для

представників таких типів як: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Euryarchaeota* [10].

1.2. Характеристика антарктичних бактеріофагів

Віруси, що здатні інфікувати бактерії відомі як бактеріофаги. Фаги є біохімічно інертними поза клітиною хазяїном та можуть знаходитися в будь-якому середовищі існування включно з ґрунтом, водою, органічними рештками [11].

Бактеріофаги відіграють ключову роль в еволюції бактеріальних угруповань ґрунтів Антарктиди, беручи участь у формуванні колективного імунітету. Через відносну ізолюваність підвищується частота контактів між фагами та бактеріями-хазяями. Обмежений характер взаємодій фаг-хазяїн, де бактерії-хазяї не часто стикаються з новими загрозами з боку бактеріофагів, призводить до формування бактеріями вродженого імунітету як основного захисту проти фагової інфекції [12].

Морфологія бактеріофагів складається з таких структурних компонентів, як: головка в якій знаходиться генетичний матеріал, що сформована капсидними білками, хвіст, який являється оболонкою навколо серцевинної трубки та містить хвостові фібрили, а також поверхневі рецепторні білки, що сприяють проникненню вірусу до хазяїна [13].

Для вірусів антарктичного регіону характерна висока гетерогенність. Найпоширеніші ДНК-вмісні бактеріофаги належать до родини *Caudovirales*, що мають головку ікосаедричної форми та спіральний хвіст, які за морфологічними ознаками можна розділити на сифоподібні - бактеріофаги з довгим не скоротливим хвостом (Рис. 1.2, а), міоподібні - бактеріофаги з довгим скоротливим хвостом (Рис. 1.2, б) та подоподібні - бактеріофаги з коротким хвостом (Рис. 1.2, в) [14, 15].

Між доміантними представниками міоподібних бактеріофагів та сифоподібних фагів спостерігається негативна кореляція [16].

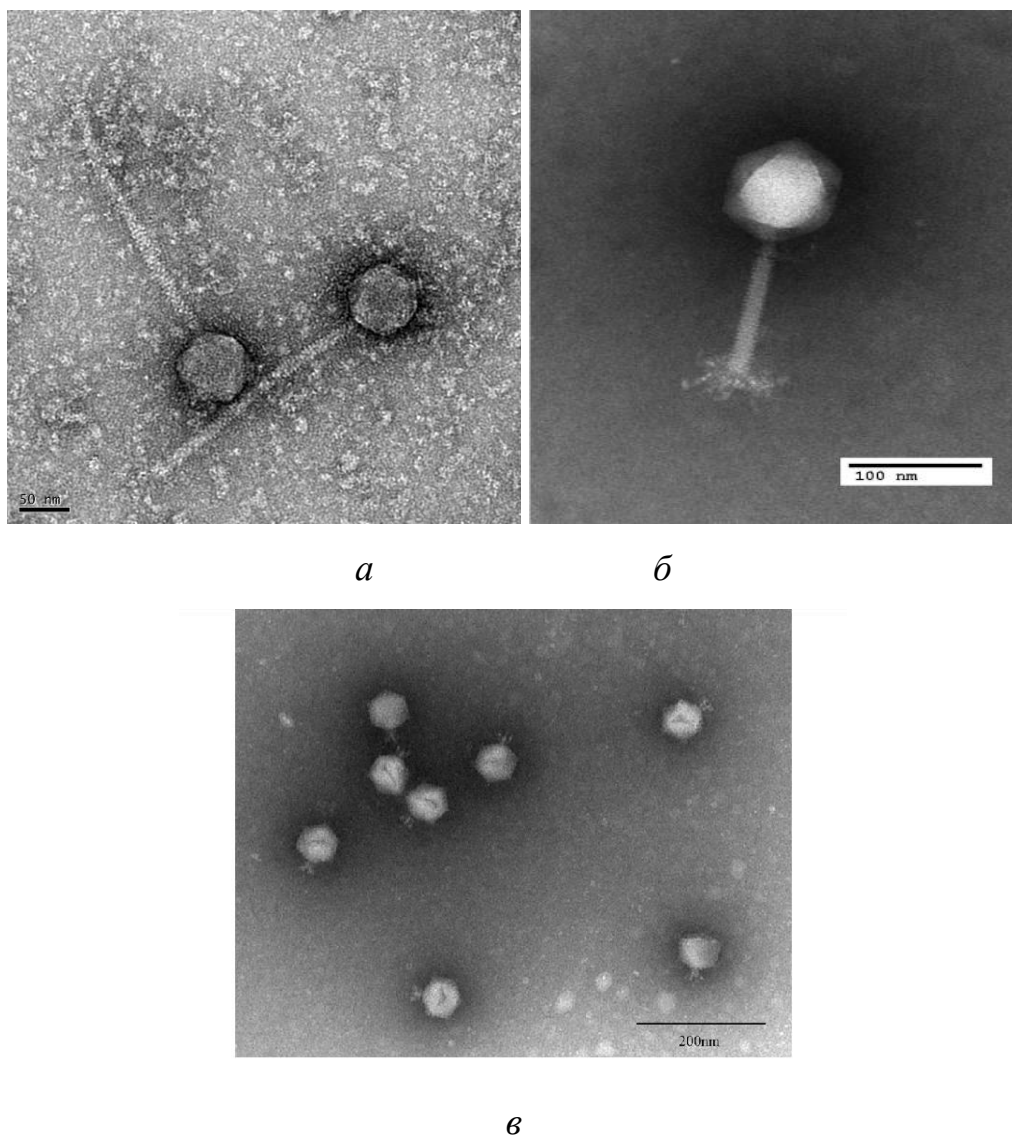


Рис. 1.2. Електро-мікроскопічне дослідження бактеріофагів: а) електронна мікрофотографія сифоподібних фагів [17]; б) електронна мікрофотографія бактеріофагів родини міоподібних фагів [18]; в) трансмісійна електронна мікроскопія подоподібних фагів [19].

Таксономічний склад простих олдНК вірусів з ікосаедричним типом симетрії представлений родинami *Microviridae* (Рис. 1.3, а) та ниткоподібними *Inoviridae* (Рис. 1.3, б), що зустрічаються досить рідко [3].

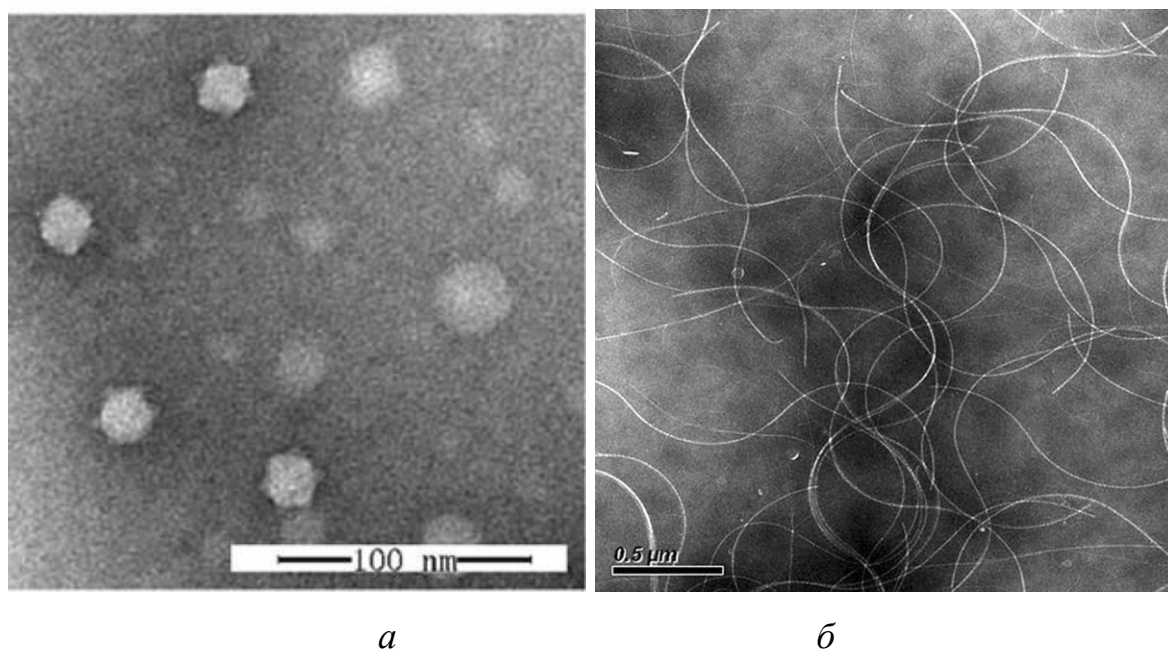


Рис. 1.3. Електро-мікроскопічне дослідження бактеріофагів: а) електронна мікрофотографія родини *Microviridae* [20]; б) трансмісійна електронна мікроскопія фага родини *Inoviridae* [21].

Оскільки таксономія вірусів недосконала, ідентифікувати спільноти на рівні роду доволі складно. Найпоширенішими серед сифоподібних бактеріофагів (Рис. 1.2, а) є *Lambdavirus*, *Barnyard Virus*, *Spbetavirus*. Серед міоподібних бактеріофагів (Рис. 1.2, б) домінують фаг Т4, Р2 вірус, вірус *Vxz1*. В популяції подоподібних бактеріофагів (Рис. 1.2, в) переважають роди Р22 вірус, N4 вірус, *Phikmvvirus* [14].

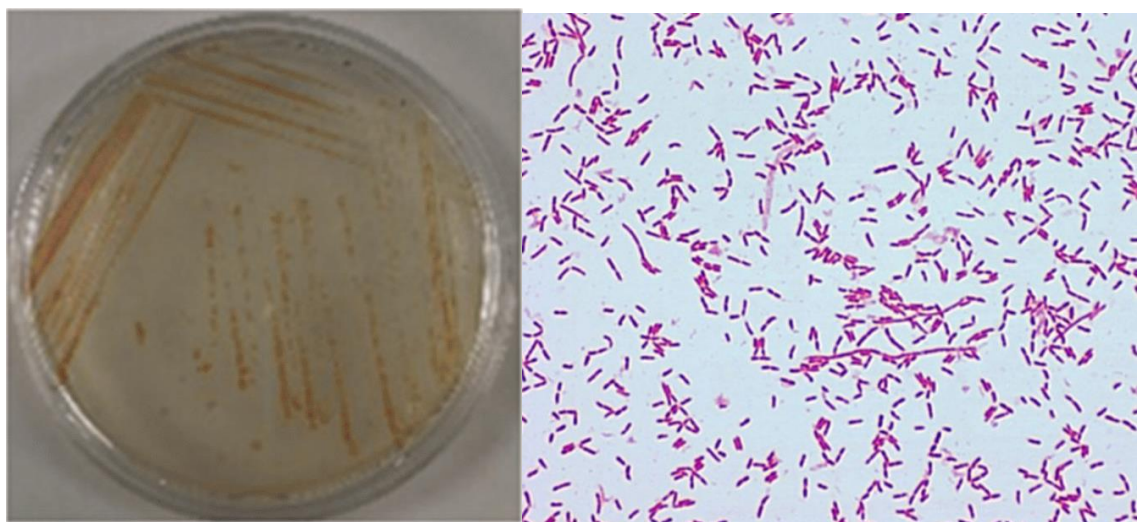
1.3. Характеристика бактеріальних угруповань Антарктиди

Адаптація кріофільних бактерій до екстремальних умов навколишнього середовища Антарктиди досягається завдяки тривалим еволюційним змінам структурних та фізіологічних характеристик [22]. За допомоги сучасних методів, які включають: геноміку, метагеноміку, транскриптоміку, дані

методи покращили розуміння яким чином відбувається холодова адаптація в антарктичних мікроорганізмів [23].

Особливість бактеріальних штамів виділених з антарктичних ґрунтових середовищ полягає в потовщенні пептидогліканового шару, що передбачає додатковий захист від несприятливих температур, заморожування та розморожування, підвищеного осмотичного тиску та інфікування патогенами [24]. Також для додаткової стійкості до суворих умов Антарктиди бактерії здатні синтезувати власні позаклітинні полімерні речовини, що виконують роль додаткового захисного покриття навколо бактеріальної клітини, яка слугує бар'єром для дифузії та утворення льоду [22]. Крім того, власно синтезовані полімерні речовини сприяють утворенню біоплівки, яка підвищує живучість бактерій та надає доступ до поживних речовин [23].

Основна доля в бактеріальних угрупованнях антарктичних ґрунтів припадає на бактерії *Proteobacteria* (Рис. 1.4), *Actinobacteriota* (Рис. 1.5) та *Chlorofexota* (Рис. 1.6) [25].



a

б

Рис. 1.4. Зображення: а) зображення морфології висіяних колоній *Proteobacteria* на агарі [26]; б) мікрофотографія *Proteobacteria* забарвлених за грамом [27].

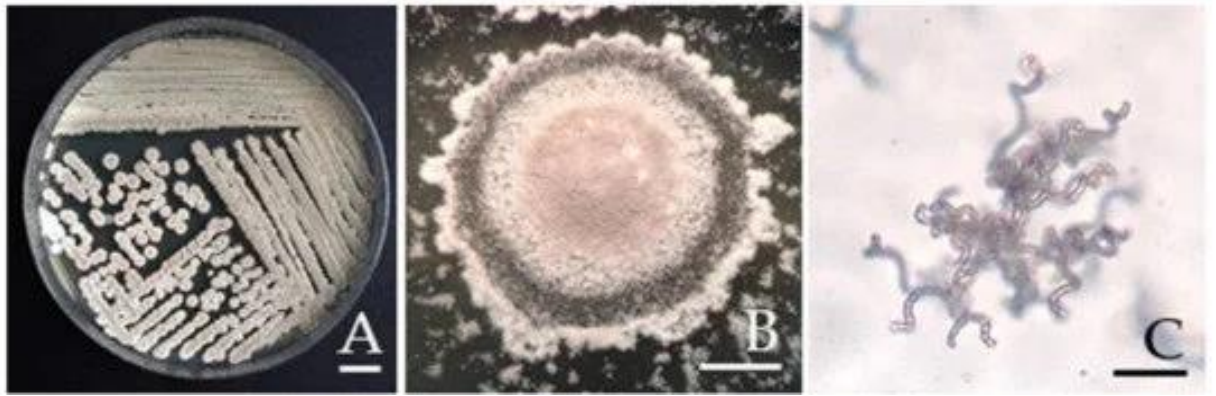


Рис. 1.5. Зображення Актинобактерії: А) зображення морфології висіяних колоній *Actinobacteriota* на агарі; В) зображення поодинокі колонії *Actinobacteriota* на агарі; С) мікрофотографія *Actinobacteriota* [28].

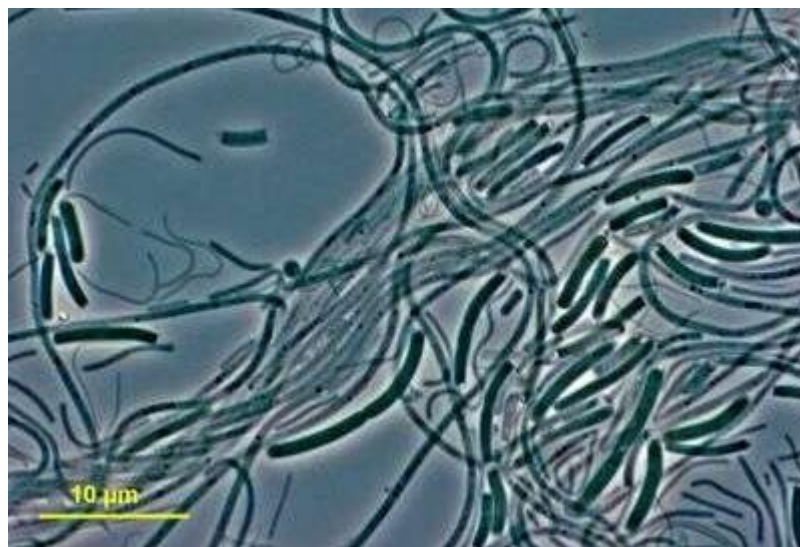


Рис. 1.6. Мікрофотографія *Chloroflexota* [29].

При дослідженні ґрунтової мікробіоти Антарктиди можна спостерігати кореляцію між характеристиками середовища пов'язаними з висотою та бактеріальною різноманітністю. Холодні, сухі ґрунти з підвищеною солоністю, що розташовані на значній висоті не такі збагачені мікробним життям, як ґрунти, що знаходяться на прибережжі материка [30].

Найбільш сприятливим для росту та розвитку бактерій є середовище яке представлено пісковиком, який є оптимальним субстратом з точки зору складу та властивостей породи [31].

1.4. Взаємодія бактеріофагів з хазяїном

Попри тривіальну думку, що за низьких температур мікроорганізми впадають в анабіоз, мікробіота Антарктичного регіону зберігає метаболічну активність навіть за наднизьких температур завдяки бактеріофагам [32].

Фаги можуть впливати на бактеріальні спільноти двома шляхами - прямим і непрямим. Прямий вплив здійснюється в ході лізогенного циклу, що характеризується вставкою генетичної інформації вірусу до хромосоми хазяїна таким чином, щоб існував потенціал передачі отриманого генетичного матеріалу дочірнім клітинам під час поділу. Непрямий ефект виникає внаслідок загибелі інфікованих конкурентів бактеріальної популяції (Рис. 1.7).

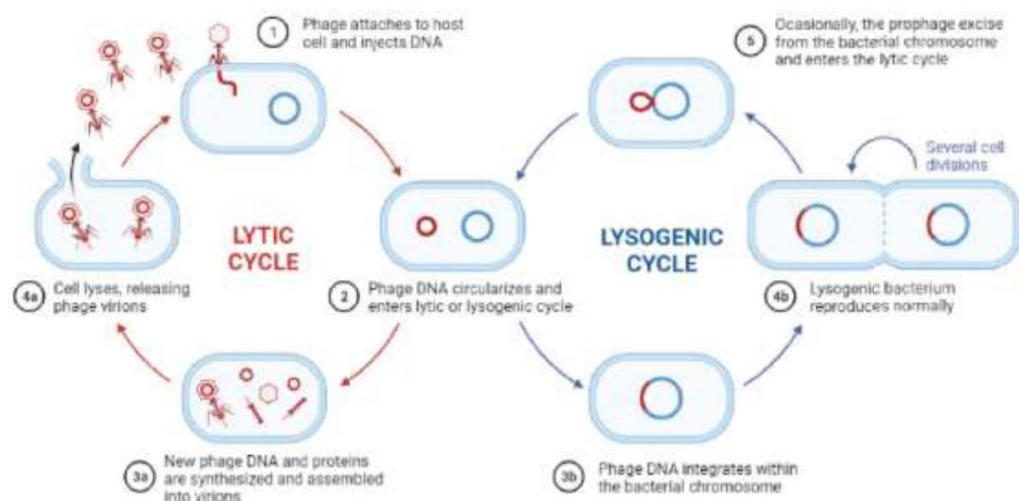


Рис. 1.7. Схематичне зображення літичного та лізогенного циклів бактеріофагів [33].

Також можна припустити, що бактеріофаги мають вплив не тільки на бактеріальні спільноти, а і на процеси, що безпосередньо здійснює ґрунтова мікробіота, що призводить до зміни складу ґрунту внаслідок тиску бактеріофагів, що в свою чергу призводить до змін в функціонуванні ґрунтових бактерій. Це пояснює зв'язок між бактеріальною різноманітністю та функціонуванням ґрунтових екосистем [34].

Про міжсезонну взаємодію вірусів з бактеріями в моделюванні мікробної біогеохімії відомо не багато. Віруси ґрунтових екосистем Антарктиди в основному переносять генетичну інформацію, щодо розщеплення полісахаридів до засвоюваних цукрів та споруляцію, що може допомогти захистити хазяїна від несприятливих умов. Також виявлені вірусні метаболічні гени розпаду галактози та ксилану, що надає інфікованим хазяям перевагу в отриманні необхідного карбону, що призводить до значних втрат вуглецю в торф'яних ґрунтах Антарктиди [32].

Для прояснення лізису спричиненого бактеріофагами можна виділити три основні механізми. Класичний включає в себе систему, що складається з двох основних білків фагового лізису лізину та холіну (Рис. 1.8).

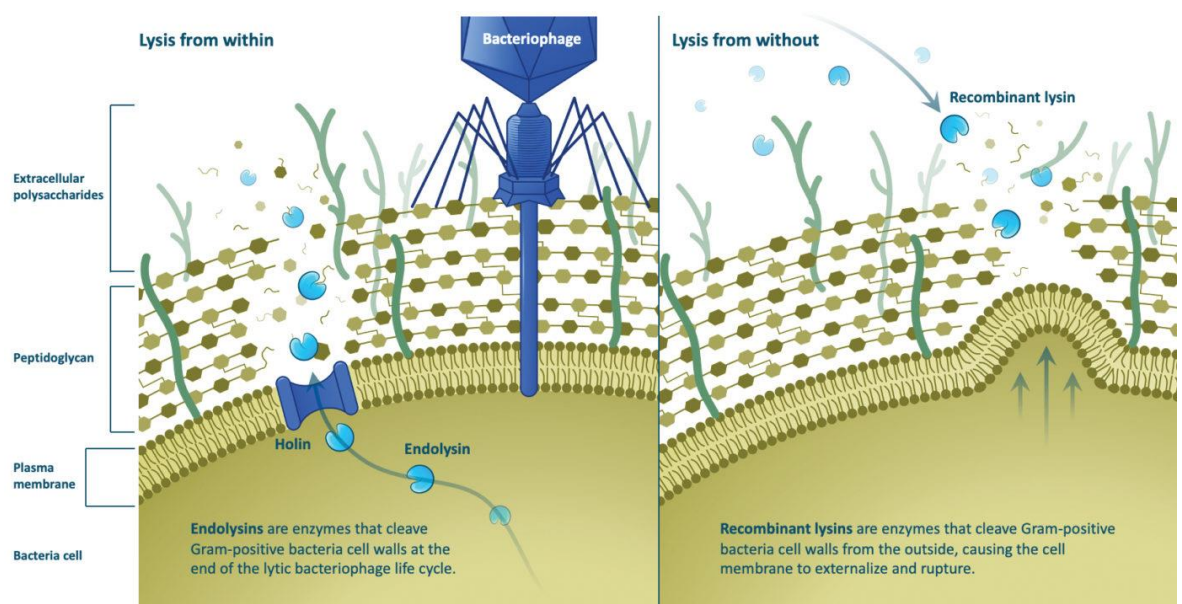


Рис. 1.8. Схематичне зображення дії фаргового лізину на хазяя [35].

Наприкінці циклу реплікації бактеріофаги синтезують холін, що шляхом вбудови в цитоплазматичну мембрану утворює в ній пори, та лізин, що вивільняється через новоутворені пори на руйнує зв'язки між пептидогліканами тим самим порушуючи цілісність мембрани, що в свою чергу спричиняє осмотичний лізис хазяя та вивільнення віріонів в навколишнє середовище [36].

Більшість лізинів, що входять до фагових систем лізису в своєму складі мають дві доменні модульні структури. Перша каталітична, що знаходиться на N - кінці та друга, що відповідає за зв'язування з холіном та знаходиться на C - кінці [33]. Лізини можна розділити на п'ять груп відповідно до сайтів розщеплення пептидогліканів: мурамідази, глюкозамінази, трансглікозилази, амідази та ендопептидази [37].

Вірусні ізоляти відібрані в Антарктиді мають високу специфічність до вибору хазяїна. Для бактеріофагів відібраних з зразків ґрунту характерні відносно швидкі темпи адсорбції цьому сприяють хвостові білки фагів, що беруть участь в прикріпленні вірусу до клітини хазяя.

Лізоцими - білки, що руйнують стінку бактерій, знайдені в Антарктичних фагів подібні до лізоцимів T4-подібних фагів, що дає можливість припускати подібність механізму лізису.

Серед Антарктичних вірусів мікроорганізмів можна виділити бактеріофаги родини *Siphoviridae* для яких характерні доволі швидкі темпи адсорбції, та не до кінця з'ясовані механізми лізису, оскільки не було встановлено попадань з хвостовими білками, що відповідають за лізис, тому можна припустити, що механізми лізису сифовірусів можуть залежати від іншого резидентного фага [38].

Для вірусів полярних екосистем притаманні різноманітні стратегії реплікації, знання яких може стати вирішальним в пізнанні та розумінні екологічної ролі вірусів в середовищі де переважають наднизькі температури. Бактеріальні вірусні інфекції мають виключно літичний характер, для яких характерний лізис хазяїна з появою нового вірусного

потомства, або може включати лізогенну стадію, яка є доміантною при взаємодії бактеріофаг - хазяїн в Антарктичних ґрунтах через низьку кількість поживних речовин і невелику кількість хазяїв [39].

1.5. Біологічний контроль українських ізолятів бактерій антарктичними бактеріофагами

Хвороби рослин спричинені бактеріями можуть завдати серйозної шкоди фермерству та можуть бути стійкими до антибактеріальних засобів. Тому для боротьби з шкідливими бактеріями застосовуються всі доступні методи задля уникнення використання пестицидів. Тому розробка стратегії біологічного контролю на сьогодні домінують над застосуванням хімічного захисту, тому що це безпечно для навколишнього середовища. Основні стратегії здійснення біологічного контролю продемонстровані на рис. 1.9 [40].

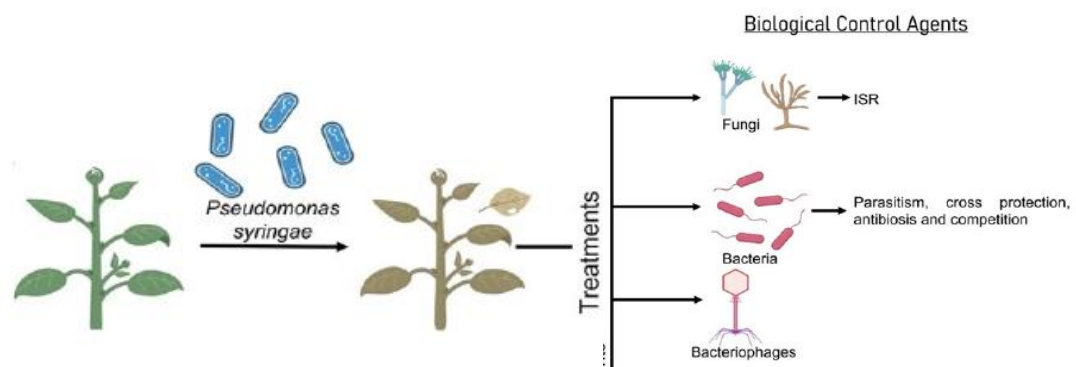


Рис. 1.9 Основні стратегії біологічного контролю проти бактерій, що спричиняють хвороби рослин [40].

Антагонізм у природі характерний для великої кількості організмів, які можуть взаємодіяти завдяки певному положенню в екологічній ніші. Тому цю властивість можна використати для боротьби з мікроорганізмами, що завдають шкоди сільському господарству.

Для більшості організмів властиво комбінувати різні способи дії направлені проти конкурента.

Для здійснення біологічного контролю можна виділити наступні типи міжвидового антагонізму:

- прямий, що представлений паразитизмом;
- антагонізм змішаного шляху, що здійснюється шляхом виділення нерегульованих продуктів життєдіяльності;
- непрямий, що сприяє конкуренції та індукує резистентність [41].

На сьогодні найперспективнішою стратегією боротьби з хворобами рослин викликаними бактеріями є специфічні бактеріофаги. Фаги можна справедливо вважати найбільш поширеними біологічними об'єктами з різноманітними морфологічними та генетичними характеристиками.

Посилений інтерес сільськогосподарського сектору до використання фагів як агентів біоконтролю фітопатогенних бактерій, спричинений наявністю досліджень які підтверджують високу ефективність бактеріофагів проти бактерій, що проявляють резистентність до антибіотиків та не завдають шкоди якості харчових продуктів [42].

Основні ознаки, що вирізняють бактеріофаги з-поміж інших агентів біологічного контролю це те, що вони здатні до реплікації лише за наявності в середовищі відповідного хазяя, адже фаги є високо специфічними та їх популяція значно скорочується за відсутності бактерії-хазяя. В дуже рідкісних випадках фаги можуть інфікувати бактерії, що належать до споріднених родів, тому їх можна вважати безпечними для нативної мікробіоти.

Крім того, фаги досить легкі в виділенні та культивуванні. Бактеріофаги можна знайти в будь-якому середовищі, що містить бактерії, такі як: ґрунт, вода, рослини та тварини.

Також фаги не токсичні для еукаріотичних клітин, тому їх можливо використовувати як безпечну заміну хімічним речовинам [43].

Застосування бактеріофагів можна інтегрувати в програми «розумного землеробства», що дозволить виявляти інфекційний процес спричинений фітопатогенними бактеріями на ранніх стадіях та запобігти поширенню інфекції [44].

Але незважаючи на значну кількість переваг, щодо використання фагів у боротьбі з патогенними бактеріями, що викликають хвороби рослин, бактеріофаги помірних кліматичних умов характерний лізогенний цикл реплікації. В такому випадку генетичний матеріал так званого профаг реплікується як частина бактеріального геному, доки сторонній фактор не спровокує зміну в циклі [40]. Але, оскільки для бактеріофагів Антарктиди притаманний літичний цикл реплікації вони можуть стати чудовою зброєю у боротьбі з патогенними бактеріями рослин [39].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Джерела виділення бактерій та бактеріофагів

За даними отриманими з наукової літератури та проведеними раніше науковими дослідженнями встановлено, що до фагів які були виділені з географічно віддалених регіонів складно підібрати чутливого хазяя. Тому, для подальшого пошуку чутливих бактеріофагів з відібраних суспензій, було виділено чутливі бактерії з антарктичних зразків ґрунту. Для отримання бактеріальних колоній було використано готові комерційні поживні середовища (ГРМ-агар, ГРМ-бульйон).

Для проведення подальших робіт було відібрано 10 ізолятів бактерій.

Фітопатогенні ізоляти бактерій, були надані відділом фітопатогенних бактерій (музей Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України), НДЛ Фармакології і експериментальної патології ННЦ «Інститут біології та медицини» та Національного антарктичного наукового центру. Ізоляти бактеріофагів виділяли до індикаторних культур українських фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Pseudomonas syringae* 7914, *Clavibacter michiganensis*.

Бактерії Національного антарктичного наукового центру: *Pseudomonas veronii*, *Sphingobacterium thalophilum* sp.

З колекції НДЛ Фармакології і експериментальної патології ННЦ «Інститут біології та медицини» були використані фітопатогенні штами бактерій: *Pseudomonas* sp. 863/1, *Bacillus* sp., 6 та 5 (нетиповані штами), АБ2, АБ3, АБ9, Сq13, які були попередньо виділені з антарктичного регіону.

Для подальшого пошуку чутливої пари «фаг-бактерія» на отриманих бактеріальних лініях проводилося тестування вірусних фільтратів отриманих з Антарктиди. Для цього було проведено прямий висів на бактеріальний газон фаголізатів за методикою двошарового агару.

Було проаналізовано зразки ґрунту та рослин, відібрані під час сезонних робіт в 2022 році в місці розміщення Української Антарктичної станції «Академік Вернадський» на архіпелазі Аргентинських островів. Українська антарктична станція «Академік Вернадський» розташована на о. Галіндез (65.245678° пд. ш., 64.257825° зх. д.). В даному регіоні панує відносно м'який субантарктичний клімат. Влітку температура переважно сягає позначки в 0 °С, а взимку – швидко опускається до позначок в -20 - -25°С. В даних широтах часто розміщуються центри циклонів, тому для регіону характерна висока хмарність з частими опадами та туманами. Взимку характерними є вітри швидкістю понад 30-35 м/с. Проби були відібрані з різних районів острова Галіндез. Для кожної ділянки з якої було проведено забір проб, було відібрано по чотири аліквоти 50-г відкритого ґрунту (глибина 0-5 см) з площі приблизно 1 м², з подальшим зберіганням в стерильних умовах в 50-мл поліпропіленових Фальконах при температурі нижче 0°С, і були перенесені до лабораторії на постійне зберігання при +4°С.

Зразки для подальших досліджень були відібрані зі стерильних поліетиленових Фальконів в ламінарному боксі, для уникнення контамінації штамами фагів та бактерій, що знаходяться в лабораторії.

Для виділення бактеріофагів 5 г ґрунту було гомогенізовано в 50 мл фізіологічного розчину та ресуспендовано на орбітальному шейкері протягом 20 хвилин. Отриману суспензію було відцентрифуговано при низькій швидкості протягом 20 хв при 4000 g, після отриману суспензію було відфільтровано через мембранний фільтр з порами діаметром 0,45 мкм, на виході було отримано 30 мл кінцевого фільтрату.

Фаги виявляли шляхом прямого висіву. Розведення фагів виконували на 0,9 % розчині NaCl (фізіологічний розчин).

2.2. Накопичення фагів в рідкому поживному середовищі з примусовою аерацією

Для накопичення бактеріофагів було застосовано метод культивування чутливих бактеріальних культур та їх лізис під впливом фагів у комерційному готовому поживному бульйоні з використанням інтенсивної аерації при температурі 25°C. Культивування чутливих бактерій проводили у спеціально призначених колбах. До колби вносили 100 мл готового комерційного поживного бульйону та 2 мл фаговмісного матеріалу, отриманого шляхом виколювання окремих негативних колоній та 5 мл змиву отриманого з бактеріальної культури.

Аерація в колбі відбувається за участі компресора, через скляну трубку зі стерильним ватним фільтром. Даний метод забезпечує пришвидшення переходу бактерій у log- фазу, завдяки чому отримується вищий титр бактеріофагів.

Момент лізису фіксується за зміною інтенсивності процесу піноутворення, який в момент лізису різко збільшується — клітинні рештки осідають на дно колби, а також після різкого прояснення вмісту колби — розчин ставав майже прозорим, після чого аерація була припинена. До отриманого лізату додавали хлороформ для пригнічення росту сторонньої мікрофлори.

2.3. Виявлення бактеріофагів на твердому середовищі

Завдяки використанню твердого поживного середовища стає можливо якісно виявити бактеріофаги у багатьох зразках одночасно, за їх морфологічними ознаками (розмірами, формами, прозорістю, наявністю ореолів тощо).

Титрування методом spot-test. Титрування методом spot-test дозволяє визначити титр фага на одній бактеріальній культурі, використовуючи лише одну чашку з культурою бактерії, що прискорює дослідження. Для цього послідовно роблять розведення вірусомісного матеріалу у плащі. На чашку з культурою бактерій наносять сітку, позначаючи клітинки цифрами, що відповідають ступеню розведення вірусомісного матеріалу. На кожну окрему клітинку сітки наносили 10 мкл фагової суспензії й інкубували у термостаті протягом 12 - 18 годин, після чого фіксували результати за наявністю зон лізису. Титром бактеріофага вважається останнє розведення, яке викликає утворення негативних колоній на бактеріальній культурі.

Доказом наявності бактеріофагів слугує повна відсутність росту бактеріальної культури в місці потрапляння краплі фільтрату або поява в ділянці нанесення дрібних стерильних плям негативних колоній бактеріофага.

Титрування двошаровим методом за Грація базується на висіванні серійних розведень фаголізатів на чашки Петрі. Спочатку готували десятикратне розведення фага у фізіологічному розчині, для цього в 12 пробірок вносять 4,5 мл фізіологічного розчину та додають 0,5 мл фага, потім у пробірку з 2,5 мл верхнього агару (0.7%) охолодженого до 45 °С додавали 1 мл бактеріофага у відповідному розведенні та 200 мкл газонної культури. Потім суміш виливали на чашку з нижнім агаром (1,4%) та інкубували 18 - 20 години за температури 24°C. Титр бактеріофагів визначали за формулою $T = \frac{y}{V} * x$; де T – кількість БУО/мл, y – число бляшок, що утворились; V – об'єм суспензії фага в мл, що нанесено на газон однієї чашки; x – розведення(10-n). Титр визначали в бляшкоутворюючих одиницях на мл (БУО/мл).

2.4. Очистка та концентрація бактеріофагів

Для очистки та концентрації фагів використовували метод диференційного центрифугування. Застосовували не менше двох циклів диференційного центрифугування для отримання чистих препаратів бактеріофагів. Метод диференційного центрифугування полягає у послідовному осадженні із фаголізату спочатку клітинних компонентів (низькошвидкісне центрифугування), а потім проводять високошвидкісне центрифугування для осадження вірусу. Низькошвидкісне центрифугування проводили за 5000 об/хв протягом 30 хв. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливали в один стакан, а осад (бактеріальні клітини та їх компоненти) видаляли у дезінфекційний розчин. Високошвидкісне центрифугування проводили шляхом центрифугування при 38 000 об/хв (168000 g) протягом 2 годин при температурі 4°C. Після центрифугування надосадову рідину видаляли, а фаг у вигляді осаду на дні пробірки ресуспендували в об'ємі від вихідного в 0,1 М трис-НСІ буфері, рН 7,2-7,4. В результаті отримали очищений вірусвмісний матеріал.

2.5. Трансмійна електронна мікроскопія

ТЕМ - це один з основних методів дослідження морфології вірусних часточок. В електронній мікроскопії використовують потік електронів, який схожий на світловий пучок. Електрони рухаються прямолінійно в вакуумі але під дією електромагнітного поля відхиляються від початкового напрямку. В теорії роздільна здатність трансмісійного електронного мікроскопа становить 0,002 нм але реальна роздільна здатність сучасних електронних мікроскопів наближається до 0,01 нм. Практична роздільна здатність електронного мікроскопа для біологічних об'єктів становить 2 нм. Просвічувальний електронний мікроскоп складається з колонки, через яку у вакуумі проходить

потік електронів, що випромінюються катодною ниткою. Пучок електронів, який сфокусований кільцевими магнітами, проходить через заздалегідь підготовлений зразок. Характер розсіювальної здатності електронів залежить від щільності зразка. Результати ТЕМ спостерігаються на моніторі та реєструються за допомогою фотопластинки.

Також можливе використання сканувальної електронної мікроскопії яка застосовується для отримання тривимірного зображення поверхні досліджуваного об'єкта.

Підготовка зразків для електронно-мікроскопічного дослідження передбачає собою ряд етапів:

На початку потрібно підготувати плівки-підкладки. Досліджуваний матеріал повинен бути нанесений на так звані плівки-підкладки, які мають товщину приблизно 0,02 – 0,05 мкм. Плівки виготовленні з формвару наносили на спеціальні опорні сітки з металу. Це забезпечує міцність підкладки під час бомбардування електронами.

На готову сітку-підкладку наносили вірусвмісний препарат. Через 1 хвилину фагову суспензію видаляли фільтрувальним папером. При цьому важливо не допускати повного висихання поверхні підкладки. Адсорбовані на плівці фагові часточки відразу ж обробляли контрастером.

Методом негативного контрастування можливо досягти точного вивчення будови бактеріофага. Суть даного методу заключається в тому, що нанесені на підкладку фаги обробляли спеціальними солями металів, які розсіюють електрони. Хімічні елементи, з яких побудована фагова часточка, практично не розсіюють електрони. У таким чином бактеріофаги світлі на тлі більш темного контрастера (натрієва сіль фосфорно-вольфрамової кислоти, уранілацетат, молібдат амонію, метиламіновольфрамат).

Електронномікроскопічні дослідження проводились з використанням трансмісивного електронного мікроскопу JEM-1230 з роздільною здатністю 0,2 нм Центру колективного користування електронним мікроскопом при Інституті ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ. Мікроскоп дає можливість

проводити дослідження в широкому діапазоні збільшень 20-600000, обладнаний енергодисперсійним спектрометром Oxford X MAX-80T, який дозволяє проводити локальне визначення досліджуваних зразків, та оснащений цифровою фотокамерою, що дає можливість збереження інформації у цифровому вигляді

Виміри розмірів вірусних часток було здійснено за використанням програм ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) та Adobe Photoshop CS5, статистичну обробку даних було проведено в Excel.

2.6. Визначення спектру літичної активності

Спектр літичної активності ізолятів фагів визначали на чутливих штаммах бактерій. У роботі були використані культури фітопатогенних бактерій, люб'язно надані відділом фітопатогенних бактерій (колекція музею Інституту мікробіології та вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного) та НДЛ Фармакології і експериментальної патології ННЦ «Інститут біології та медицини». Для визначення кола чутливих хазяїв було проведено дослідження спектру літичної активності фагів на десяти антарктичних та українських бактеріальних культурах. Було застосовано метод виявлення бактеріофагів на твердому середовищі. Для визначення спектру літичної активності бактеріофагів, бактеріальні культури були висіяні на 1,5% агарі та розподілені по поверхні агару.

Інкубацію проводили 18 - 24 годин при температурі 24°C. В результаті враховано наявність суцільних зон лізису відносно досліджуваних культур.

2.7. Статистична обробка даних

За допомогою програм ImageJ та AdobePhotoshop CS5 були визначені розміри негативних колоній та віріонів на мікрофотографіях. Для обрахунків розмірів вірусних часточок було використано програму Microsoft Excel, результати обрахунків представляли середнім \pm стандартним відхиленням.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Виділення фагів і морфологічна характеристика

Зразки рослин та ґрунту, були відібрані під час сезонних робіт на архіпелазі Аргентинських островів в місці розташування Української Антарктичної станції “Академік Вернадський” в 2022 році.

Загалом в Україну було доставлено 33 зразки з антарктичного регіону, з яких 28 зразків сухої суміші були об’єднані в один зразок (табл. 3.1), та ще 5 зразків вологого ґрунту: WT23 17.03.22, T24 V. 23.03.22 (1), T24 V. 23.03.22 (2), WT24 17.03.22, T24 V. 28.03.22 (Рис. 3.1).

Таблиця 3.1

Зразки, відібрані на архіпелазі Аргентинських островів

Номер зразка	Дата відбору	Місце відбору зразків
1	06.02.2022	W3US
2	07.02.2022	WD03 Py P2
3	07.02.2022	WB4 Ґрунт
4	08.02.2022	W Meteo
5	06.02.2022	W 4Ps
6	06.02.2022	W 2Ps

«Продовження таблиці 3.1»

7	06.02.2022	W 4Sn
8	06.02.2022	W1 Мис Магніт
9	07.02.2022	W By P2
10	07.02.2022	W D Грунт
11	06.02.2022	W 4 US
12	06.02.2022	W1 Мис Магніт P2
13	17.02.2022	V Мис Туксен D9
14	06.02.2022	W5 PS
15	17.02.2022	V Мис Туксен Prosida
16	07.02.2022	W Cq San
17	06.02.2022	W 2 Sn
18	07.02.2022	W Cq P2
19	06.02.2022	W 2 PS
20	08.02.2022	W Meteo P2
21	06.02.2022	W 3 PS
22	06.02.2022	W 5 US
23	17.02.2022	V Мис Туксен PP
24	06.02.2022	W 5 Sn
25	06.02.2022	W 5 Wf

«Продовження таблиці 3.1»

26	06.02.2022	W 3 A01 XLE
27	17.02.2022	V Мис Туксен Sahio Да
28	06.02.2022	W 3 Sn



Рис. 3.1. Зразки вологого ґрунту відібрані під час експедиції в Антарктиду.

Із 33 зразків було виділено 8 ізолятів фагів (табл. 3.2). Було виділено ізолят фагу із зразку сухої суміші до бактеріальної культури Cq13. Із зразку WT23 виділили ізолят фагу до *Pseudomonas fluorescens* 8573 та до двох антарктичних ізолятів бактерій 5 та АБ2. Ізолят фагу із зразку T24 V. проявляв інфекційну активність до бактерії АБ2, а ізоляти фагів 2 зразку T24 V. – до *Pseudomonas fluorescens* 8573 та *P. syringae* 7914. Фаги зразку T24 V. 28.03.22 були чутливі до *Serratia marcescens*. Бактеріофаг зразку 2. T24 V. чутливий до антарктичної бактеріальної культури 863.

Таким чином, було проведено пошук чутливої пари «фаг-бактерія» на бактеріальних штаммах. Проведено прямий висів на бактеріальний газон фаголізатів за методикою двошарового агару. В результаті чого було отримано негативні колонії на газоні чутливої бактерії. Для проведення подальшого виділення та пасування бактеріофагів, методом виколування негативних колоній, було отримано 4 ізоляти. Дві з чотирьох підібраних пар

втрачали свою активність при спробі подальшого пасування. Для проведення подальших робіт використовували два ізоляти бактерій (863, 6), до яких було виділено бактеріофаги.

Таблиця 3.2

Результати пошуку чутливих бактерій для ізолятів фагів отриманих з антарктичної експедиції 2022 року

Зразки антарктичних фагів / Індикаторні культури	Суха суміш	WT23 17.03. 2022	1. T24 V. 23.03. 2022	2. T24 V. 23.03. 2022	WT24 17.03. 2022	T24 V. 28.03.2 022
АБ9	-	-	-	-	-	-
АБ2	-	+	+	-	-	-
АБ3	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis 5</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis 6</i>	-	-	-	+	-	-
Cq13	+	-	-	-	-	-
863	-	-	+	-	-	-
<i>P. savastanoi pv. phaseolicola</i> 4013	-	-	-	+	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	+

«Продовження таблиці 3.2»

<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8573	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> 7914	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas veronii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Clavibacter michiganensis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingobacterium thalophilum</i> sp.	-	-	-	-	-	-

При дослідженні було виявлено, що 6 з 8 підібраних пар втрачали свою літичну активність при спробі подальшого пасування. Для проведення подальших робіт використовували два ізоляти фага, чутливих до бактерій 863 та *Bacillus subtilis* б). Тобто підібрано чутливу систему фаг-бактерія.

3.2. Морфологія негативних колоній

Методом прямого висіву було виділено ізолят фагу до чутливої бактерії 863. Негативні колонії спостерігалися після 18 - 24 годин культивування. Бляшки, що утворював фаг, однотипні, з чіткими краями та прозорі, діаметром $1,5 \pm 0,5$ мм. За морфологічними характеристиками негативних колоній фаг є літичним (Рис. 3.2).

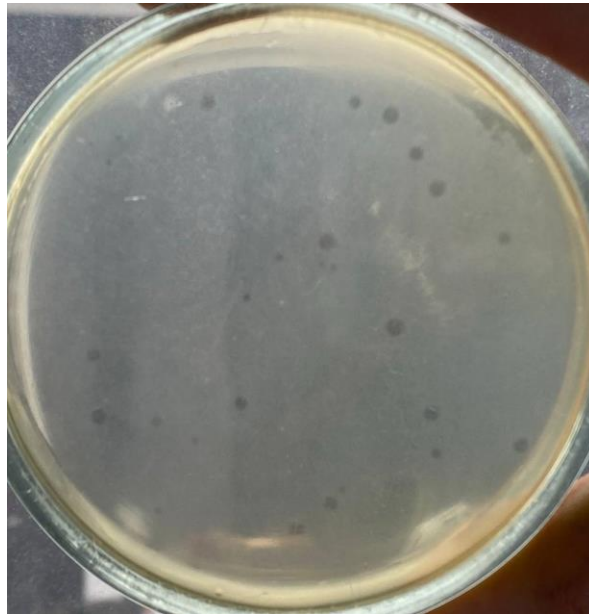


Рис. 3.2. Морфологія негативних колоній фагів на індикаторній бактерії 863.

За результатами титрування за Грація, ізолят фагу 863 має прозорі негативні колонії маленького розміру з чіткими краями. Титр фагу становить 23×10^5 БУО\мл.



Рис. 3.3. Морфологія негативних колоній фагів на індикаторній бактерії *Serratia marcescens*.

До українського ізоляту бактерії *Serratia marcescens* було виділено бактеріофаг, який утворював негативні колонії, які спостерігалися після 18 - 24 годин культивування. Утворені негативні колонії можна морфологічно розділити на середні ($1 \pm 0,3$ мм), маленькі ($0,5 \pm 0,2$ мм) та великі з ореолом ($2 \pm 0,5$ мм). За морфологічною характеристикою негативних колоній, що утворює фаг, бактеріофаг є літичним (рис. 3.3).

За результатами титрування за Грація, ізолят фагу чутливого до бактерії *Serratia marcescens* становить 14×10^8 БУО\мл.

До українського ізоляту бактерії *Pseudomonas fluorescens* 8573 було виділено ізолят фага 8573. Негативні колонії спостерігалися після 18 - 24 годин культивування. Бляшки розміром $1,5 \pm 0,3$ мм. За морфологічною характеристикою негативних колоній, що утворює фаг, бактеріофаг є вірулентним (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Морфологія негативних колоній фагів на індикаторній бактерії 8573.

За результатами титрування за Грація, ізолят фагу 8573 становив 32×10^7 БУО\мл.

Також було виділено ізолят фага 6, чутливий до бактерії *Bacillus subtilis* 6. Негативні колонії спостерігалися після 18 - 24 годин культивування. Бляшки однакові за розміром діаметром $1,5 \pm 0,5$ мм та мутні (рис. 3.5).

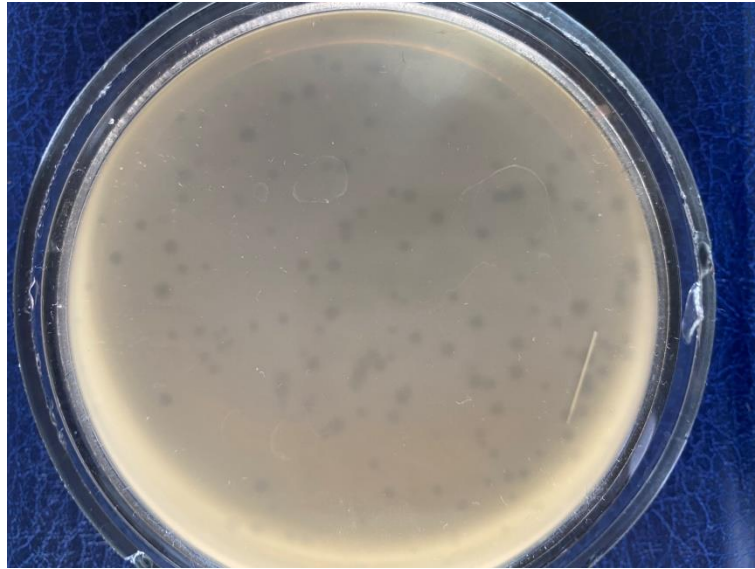


Рис. 3.5. Морфологія негативних колоній фагів на індикаторній бактерії 6.

За результатами титрування за Грація, ізолят фага 6 становить 2×10^1 БУО\мл.

3.3. Біологічна характеристика ізолятів фагів

До накопичення перевіряли біологічну активність ізоляту фага 863. За результатами титрування методом “спот-тест” отримали на газоні зони лізису, при цьому титр становив 10^{-8} часточок (рис. 3.6 а).

За результатами титрування даним методом після накопичення ізоляту фага 863 титр становив 10^{-8} часточок, що не відрізнявся до накопичення. Але

завдяки накопиченню отримали фаголізат у більшому об'ємі, який в подальшому використовувався для концентрування (рис. 3.6 б).

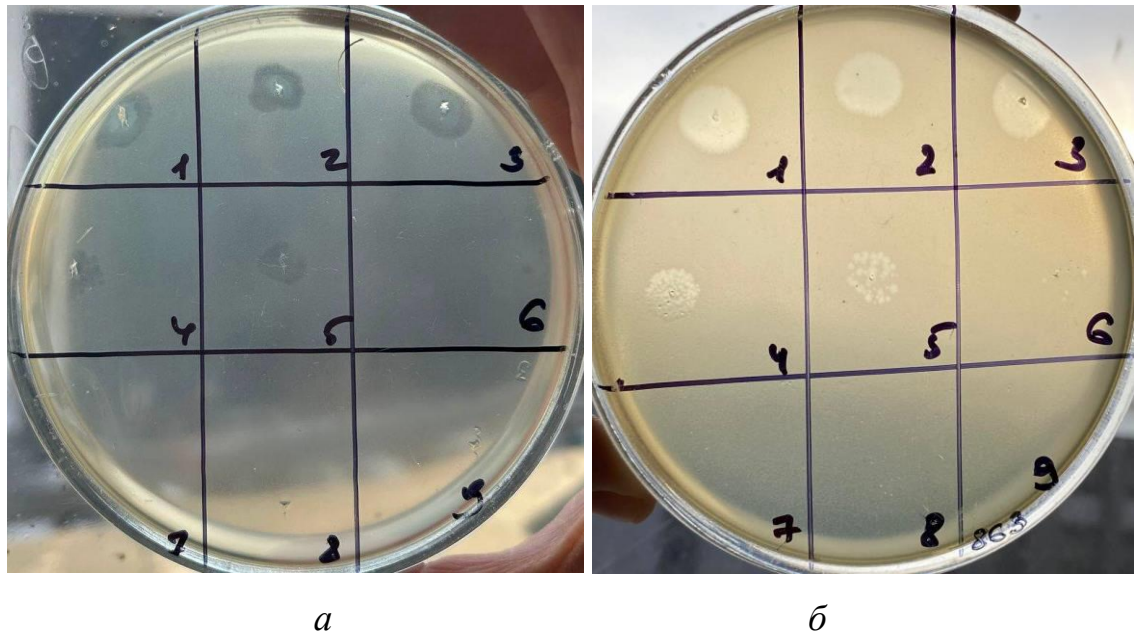


Рис 3.6. Результати титрування а) до накопичення ізоляту фага 863; б) після накопичення ізоляту фага 863.

За результатами титрування до накопичення ізоляту фага *Serratia marcescens* титр становив 10^8 часточок (рис. 3.7 а). Після накопичення ізоляту фага *Serratia marcescens* титр становив 10^9 (рис. 3.7 б). Що сприяло отримання вищого титру та об'єму для подальших досліджень.

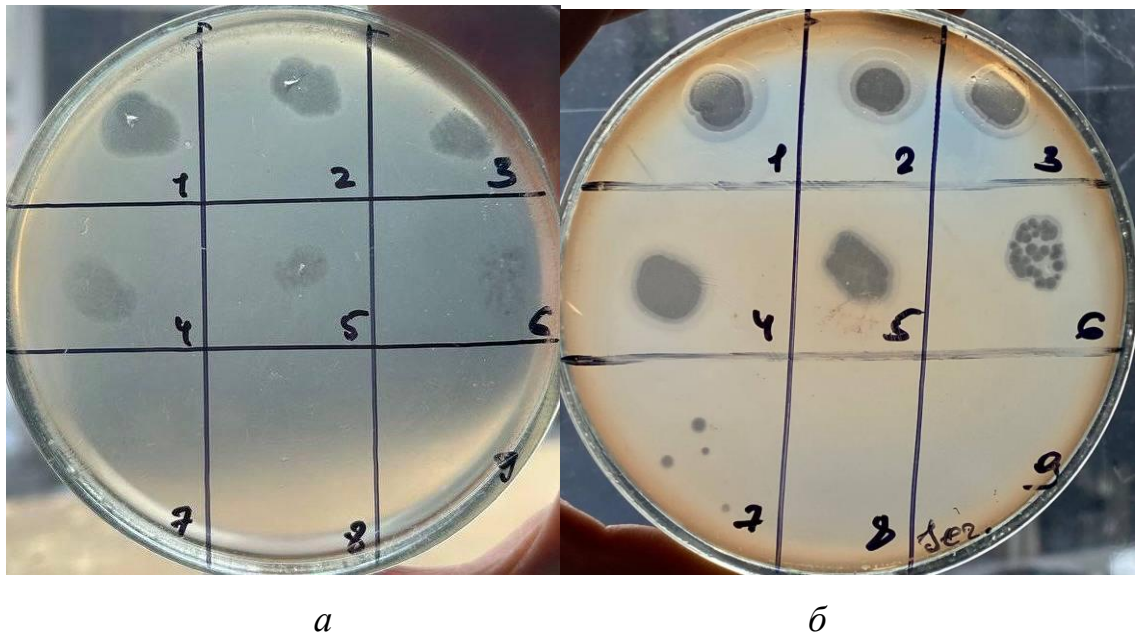


Рис 3.7. Результати титрування: а) до накопичення ізоляту фага *Serratia marcescens*; б) після накопичення ізоляту фага *Serratia marcescens*.



Рис 3.8. Результати титрування методом після накопичення ізоляту фагу
6. Після накопичення ізоляту фага 6 титр становив 10^{-7} (рис. 3.8).

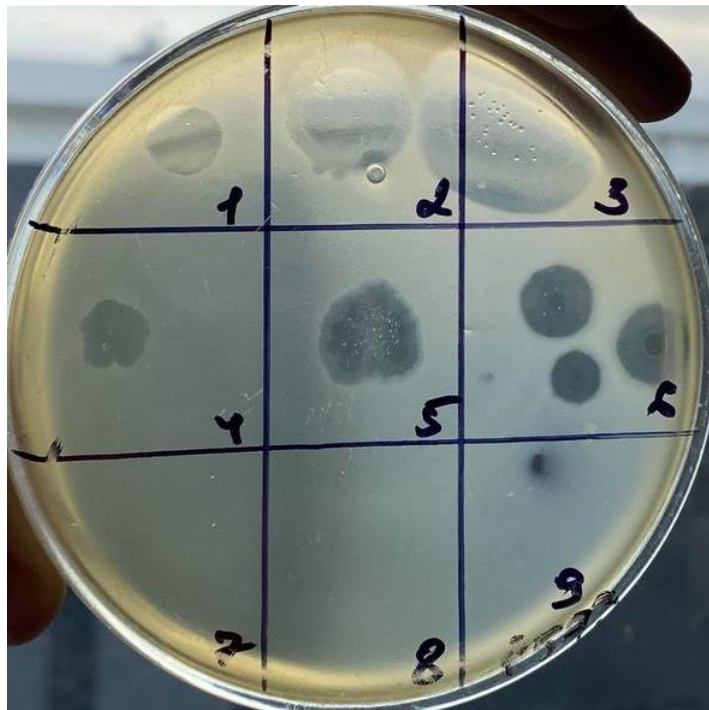


Рис 3.9. Результати титрування після накопичення ізоляту фага 8573.

Після накопичення ізоляту фага 8573 титр фагу становив 10^{-8} (рис. 3.9).

Отже, літичну активність ізольованих бактеріофагів визначали методом спот-тесту по утворенню зон лізису у місці нанесення зразків. Крім того, було досліджено можливість фагів реплікуватись всередині клітини-хазяїна і проведено оцінку негативних колоній, оскільки наявність зон лізису у спот-тесті не завжди свідчить про літичний цикл і продуктивний інфекційний процес.

3.4. Електронномікроскопічні дослідження

За результатами трансмісійної електронної мікроскопії ізоляту фага 863 було встановлено морфологічні особливості віріонів: головка фага 863 має ікосаедричний тип симетрії діаметром 68 ± 2 нм, і довгий скоротливий хвостовий відросток довжиною 83 ± 5 нм (Рис. 3.10). За морфологічною характеристикою віріону фаг належить до міоподібних бактеріофагів.

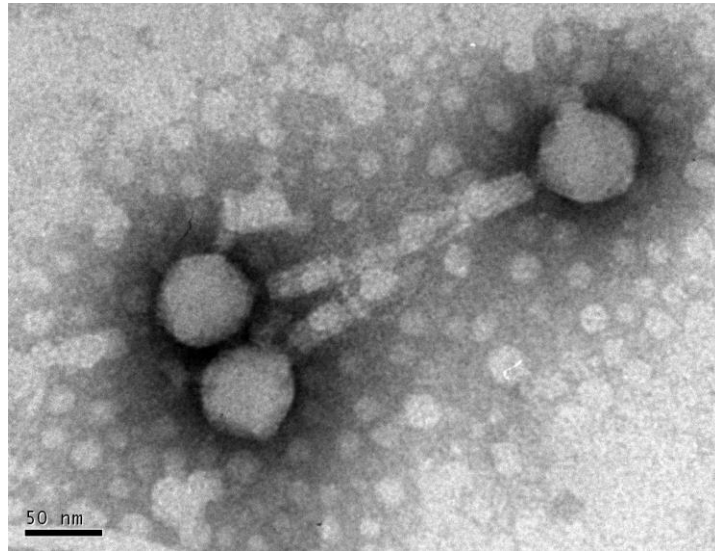


Рис. 3.10. Електроннограма фагу 863.

За результатами трансмісійної електронної мікроскопії ізоляту фага *Serratia marcescens* головка фага має ікосаедричний тип симетрії діаметром 92 ± 1 нм, і довгий скоротливий хвостовий відросток довжиною 94 ± 2 нм (рис. 3.11). За морфологічною характеристикою віріону фаг належить до міоподібних бактеріофагів.

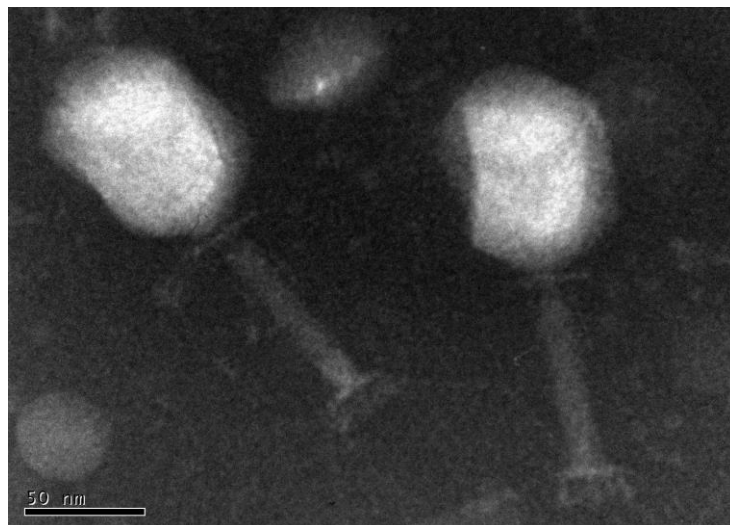


Рис. 3.11. Електроннограма фагу *Serratia marcescens*.

За результатами трансмісійної електронної мікроскопії ізоляту фага 6 головка фага має ікосаедричний тип симетрії діаметром приблизно 100 ± 7 нм, з коротким хвостовим відростком довжиною 18 ± 3 нм (рис. 3.12). Даний фаг за морфологічною характеристикою є подоподібним.

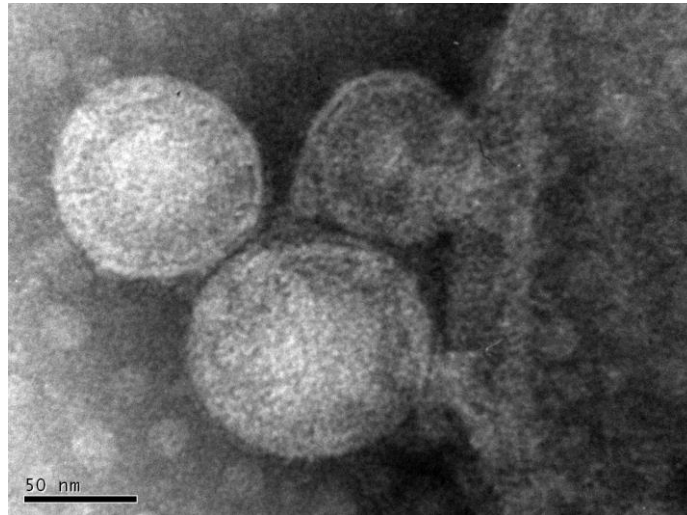


Рис. 3.12. Електроннограма фагу зі зразку ґрунту на чутливій бактеріальній культурі 6.

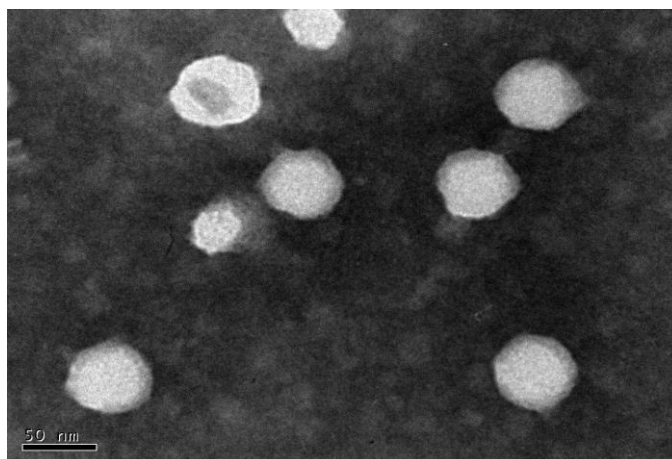


Рис. 3.13. Електроннограма фагу зі зразку ґрунту на чутливій бактеріальній культурі 8573.

За результатами трансмісійної електронної мікроскопії ізоляту фага 8573 головка фага має ікосаедричний тип симетрії діаметром 56 ± 1 нм, з коротким

хвостовим відростком довжиною 14 ± 3 нм (рис. 3.13). Даний фаг за морфологічною характеристикою є подоподібним.

3.5. Спектр літичної активності

Для визначення спектру літичної активності для ізолятів фагів 863 та 6 було використано 10 бактеріальних культур: *Pseudomonas sp.* 863/1, *Bacillus subtilis* 6, *Serratia marcescens sp.*, Cq13, *Pseudomonas fluorescens*, *P. savastanoi pv. phaseolicola*, *Clavibacter michiganensis*, АБЗ, *Bacillus subtilis* 5, *Pseudomonas syringae* (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Спектр літичної активності ізолятів фагів

Індикаторні бактерії	Ізолят фагу 863	Ізолят фагу 6
<i>Pseudomonas sp.</i> 863/1	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> 6	-	+
<i>Serratia marcescens sp.</i>	+	+
Cq13	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-
<i>P. savastanoi pv. phaseolicola</i>	-	-
АБЗ	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	+	+

«Продовження таблиці 3.3»

<i>Clavibacter michiganensis</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 5	-	-

Для встановлення спектру літичної активності негативні колонії отримані з ізоляту фага 863, були розділені за розміром методом виколування фагової бляшки на двошаровому агарі на ізоляти 863/С та 863/М, з подальшим трикратним пасажуванням для отримання чистих ліній ізолятів фагів.

На бактеріальному газоні утвореному антарктичною бактеріальною культурою *Pseudomonas sp.* 863/1, ізолят фага 863/С утворив прозору зону лізису, в той час як ізолят фага 863/М не утворював зони лізису (рис. 3.14 а). На газоні утвореному бактеріальною культурою *Pseudomonas syringae* ізоляти фагів 863/С та 863/М утворили мутний ореол (рис. 3.14 в). На бактеріальному газоні утвореному бактеріальною культурою *Serratia marcescens sp.* фаг із зразку 863/С утворює прозору зону лізису з поодинокими негативними колоніями (рис. 3.14 г).

Отримані результати можуть свідчити про те, що суміш фагів є нероздільною.

На бактеріальному газоні антарктичної бактеріальної культури *Bacillus subtilis* 6 ізолят фага 6 утворив прозору зону лізису з ореолом (рис. 3.14 б). На газоні бактеріальної культури *Pseudomonas syringae* ізолят фага 6 утворював мутні зону лізису з ореолом (Рис. 3.14 в). На бактеріальному газоні утвореному бактеріальною культурою помірного регіону *Serratia marcescens sp.* фаг 6 утворював прозору зону лізису (рис. 3.14 г).

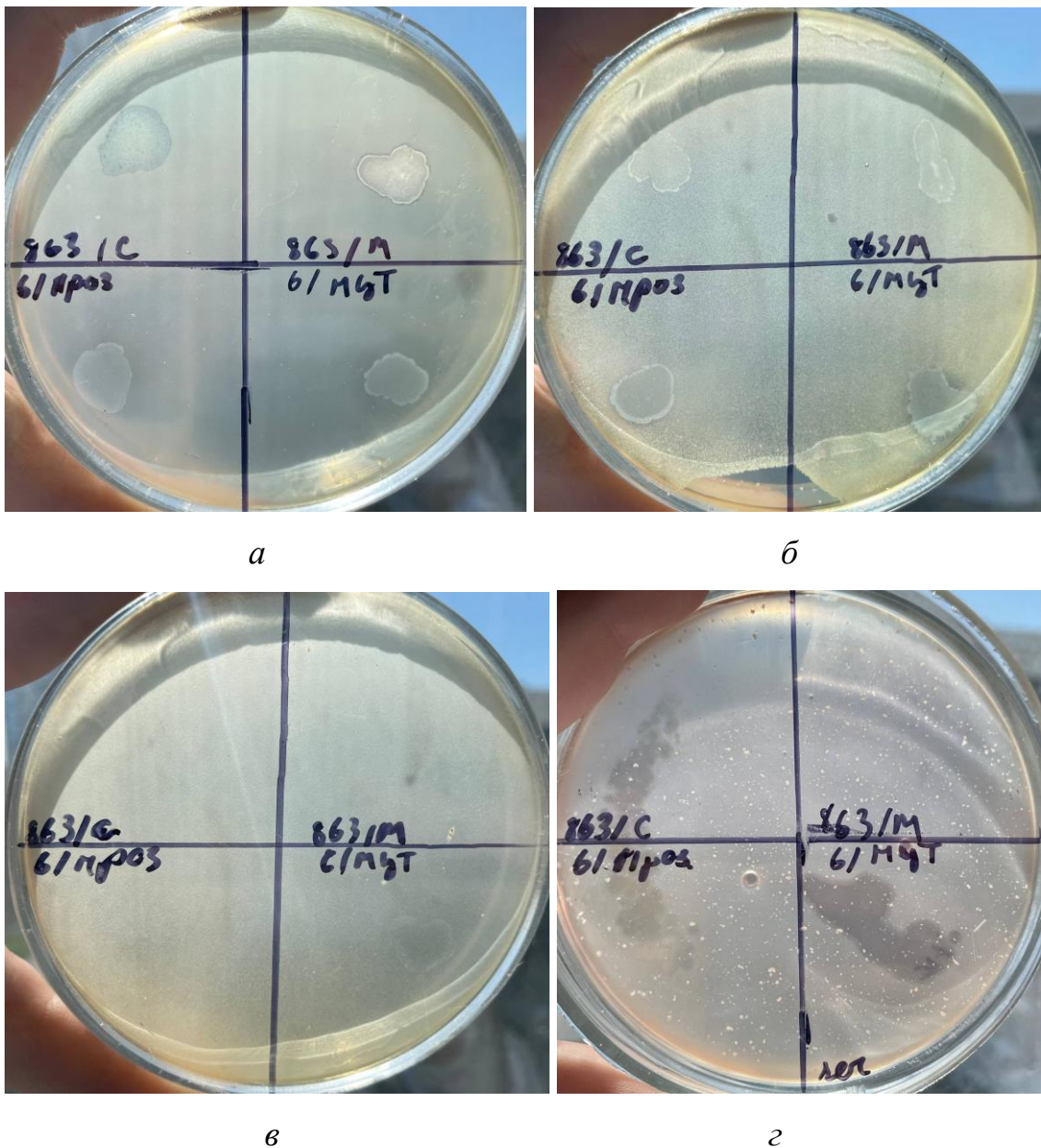


Рис. 3.14. Спектр літичної активності ізолятів фагів 863 та 6: а) чутлива культура *Pseudomonas sp.* 863/1; б) чутлива культура *Bacillus subtilis* 6; в) чутлива культура *Pseudomonas syringae*; г) чутлива культура *Serratia marcescens sp.*

Згідно з отриманих результатів зразки ізолятів фагів 863 та 6 є полівалентними. Ізолят 6 проявляв біологічну активність на індикаторних бактеріях *Bacillus subtilis* 6, *Serratia marcescens sp.*, *Pseudomonas syringae*, тоді як ізолят фага 863/С лізував бактерії *Pseudomonas sp.* 863/1, *Serratia marcescens sp.*, *Pseudomonas syringae*. Ізолят фага 863/М проявляв біологічну

активність до індикаторної бактерії *Pseudomonas syringae*, який утворював мутний ореол.

Таким чином, результат вдалого виділення фагів з ґрунту та отримання інтактних збережених часток залежить від характеристик самих вірусів, їх стійкості до змін різних фізичних чинників зовнішнього середовища та від підбору оптимальних лабораторних методик. Це особливо актуально при дослідженні регіонів з характеристиками, відмінними від помірних кліматичних зон.

ВИСНОВКИ

1. Із зразків ґрунту о.Галіндез було виділено 4 ізоляти фагів (зразки 863, 6, 8573 та *Serratia marcescens*) та вивчені їх біологічні властивості (особливості їх взаємодії у системі фаг-бактерія, морфологія негативних колоній).
2. Визначено біологічну активність ізольованих фагів до 10 штамів бактерій. Показано, що ізоляти фагів 863 та 6 характеризуються вузьким колом хазяїв, проявляли літичну активність до двох бактерій *Serratia marcescens* sp. та *Pseudomonas syringae*.
3. За результатами трансмісійної електронної мікроскопії визначено морфолого-структурну організацією 4 ізолятів фагів. Ізоляти 863 та *Serratia marcescens* відносяться до міоподібних фагів, а ізоляти 6 та 8573 відносяться до подоподібних фагів.
4. Результати проведених досліджень свідчать про наявність вірусів мікроорганізмів ґрунтових біотопів Антарктичних островів, які відрізняються низьким біорізноманіттям у порівнянні з відомими бактеріофагами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adriaenssens, E.M., Kramer, R., Van Goethem, M.W., Makhalanyane, T.P., Hogg, I. & Cowan, D.A. (2017). Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics. *Microbiome*, [online] Volume 5, p. 83. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0301-7> [Accessed 2017].
2. Qi-Ya, Z., Fei, K., Lang, G., Zhe, Z. (2022). Recent insights into aquatic viruses: Emerging and reemerging pathogens, molecular features, biological effects, and novel investigative approaches. *Water Biology and Security*, [online] Volume 1(4), p. 100062. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.watbs.2022.100062> [Accessed 2022].
3. Gong, Z., Liang, Y., Wang, M., Jiang, Y., Yang, Q., Xia, J., Zhou, X., You, S., Gao, C., Wang, J., He, J., Shao, H., McMinn, A. (2018). Viral Diversity and Its Relationship With Environmental Factors at the Surface and Deep Sea of Prydz Bay, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 9, p. 2981. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02981> [Accessed 3 Dec. 2018].
4. Yau, S., Seth-Pasricha, M. (2019). Viruses of Polar Aquatic Environments. *Viruses*, [online] Volume 11(2), p. 189. Available at: <https://doi.org/10.3390/v11020189> [Accessed 22 Feb. 2019].
5. Mojica, K.D., Brussaard, C.P. (2014). Factors affecting virus dynamics and microbial host-virus interactions in marine environments. *FEMS Microbiol Ecol.*, [online] Volume 89(3), pp. 495 - 515. Available at: <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12343> [Accessed 12 May 2014].
6. Aguirre de Cárcer, D., López-Bueno, A., Alonso-Lobo, J.M., Quesada, A., Alcamí, A. (2016). Metagenomic analysis of lacustrine viral diversity along a latitudinal transect of the Antarctic Peninsula. *FEMS Microbiol Ecol.*, [online] Volume 92(6), pp.50 - 74. Available at: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw074> [Accessed 7 Apr. 2016].

7. Ugolini, F.C., Bockheim, J.G. (2008). Antarctic soils and soil formation in a changing environment: a review. *Geoderma*, 144, pp. 1 – 8.
8. Goordial, J., Davila, A., Lacelle, D., Pollard, W., Marinova, M. M., Greer, C.W., et al. (2016). Nearing the cold-arid limits of microbial life in permafrost of an upper dry valley, Antarctica. *ISME J.*, 10, pp. 1613 – 1624.
9. Liu Z, Jiang W, Kim C, et al. A *Pseudomonas* Lysogenic Bacteriophage Crossing the Antarctic and Arctic, Representing a New Genus of *Autographiviridae*. *Int J Mol Sci.* 2023;24(8):7662. Published 2023 Apr 21. doi:10.3390/ijms24087662.
10. Wei, S.T.S., Lacap-Bugler, D.C., Lau, M.C.Y., Caruso, T., Rao, S., de los Rios, A., Archer, S.K., Chiu, J.M.Y., Higgins, C., Van Nostrand, J.D., Zhou, J., Hopkins, D.W. and Pointing, S.B. (2016). Taxonomic and Functional Diversity of Soil and Hypolithic Microbial Communities in Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Front. Microbiol.*, [online] Volume 7, p. 1642. Available at: <https://doi:10.3389/fmicb.2016.01642> [Accessed 2016].
11. Domingo-Calap, P., Georgel, P. and Bahram, S. (2016). Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools. *HLA*, 87(3), pp.133–140. doi:<https://doi.org/10.1111/tan.12742>.
12. Bezuidt, O., Lebre, P.H., Rian Pierneef, León-Sobrino, C., Adriaenssens, E.M., Cowan, D.A., Van and Makhalanyaane, T.P. (2020). Phages Actively Challenge Niche Communities in Antarctic Soils. 5(3). doi:<https://doi.org/10.1128/msystems.00234-20>.
13. Harada, L.K., Silva, E.C., Campos, W.F., Del Fiol, F.S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V.N. and Balcão, V.M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, [online]212213,pp.3858.doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>.
14. Convey, P., Chown, S.L., Clarke, A., Barnes, D.K.A., Bokhorst, S., Cummings, V., Ducklow, H.W., Frati, F., Green, T.G.A., Gordon, S., Griffiths, H.J., Howard-Williams, C., Huiskes, A.H.L., Laybourn-Parry, J., Lyons, W.B., McMinn, A., Morley, S.A., Peck, L.S., Quesada, A. and Robinson, S.A. (2014). The spatial

- structure of Antarctic biodiversity. *Ecological Monographs*, 84(2), pp.203-244. doi:<https://doi.org/10.1890/122216.1>.
15. Zablocki, O., van Zyl, L., Adriaenssens, E.M., Rubagotti, E., Tuffin, M., Cary, S.C., Cowan, D. (2014). High-level diversity of tailed phages, eukaryote-associated viruses, and virophage-like elements in the metaviromes of antarctic soils. *Appl Environ Microbiol*, [online] Volume 80(22), pp. 6888 - 6897. Available at: <https://doi:10.1128/AEM.01525-14> [Accessed 29 Aug. 2014].
16. Yau, S. and Seth-Pasricha, M. (2019). Viruses of Polar Aquatic Environments. *Viruses*, 11(2), p.189. doi:<https://doi.org/10.3390/v11020189>.
17. Wordpress.com. (2024). Available at: <https://phagehuntz.files.wordpress.com/2015/10/phage.png>
18. www.omicsonline.org. (n.d.). *Figure 2*. [online] Available at: <https://www.omicsonline.org/articles-images/2161-0703-1-109-g002.html> [Accessed 30 May 2024].
19. Hua, Y., An, X., Pei, G., Li, S., Wang, W., Xu, X., Fan, H., Huang, Y., Zhang, Z., Mi, Z., Chen, J., Li, J., Zhang, F., Tong, Y. (2014). Characterization of the morphology and genome of an Escherichia coli podovirus. *Arch Virol*, [online] Volume 159(12), pp. 3249 - 3256. Available at: <https://doi:10.1007/s00705-014-2189-x>. [Accessed 28 Aug. 2014].
20. Xu, W., Xuan, G., Lin, H. and Wang, J. (2022). Complete genome analysis of the newly isolated Vibrio phage vB_VpP_WS1 of the family Microviridae. *Archives of virology*, 167(5), pp.1311–1316. doi:<https://doi.org/10.1007/s00705-022-05413-x>.
21. Dokland, T., McKenna, R., Ilag, L.L., Bowman, B.R., Incardona, N.L., Fane, B.A., Rossmann, M.G. (1997). Structure of a viral procapsid with molecular scaffolding. *Nature*, [online] Volume 389(6648), pp. 308 - 313. Available at: <https://doi:10.1038/38537> [Accessed 18 Sep. 1997].
22. Collins, T. and Margesin, R. (2019). Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), pp.2857–2871. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09659-5>.

23. Kesava Priyan Ramasamy, Lovely Mahawar, Raju Rajasabapathy, Karanth Rama Rajeshwari, Miceli, C. and Pucciarelli, S. (2023). Comprehensive insights on environmental adaptation strategies in Antarctic bacteria and biotechnological applications of cold adapted molecules. *Frontiers in Microbiology*, 14. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1197797>.
24. Flaviana Di Lorenzo, Crisafi, F., Violetta La Cono, Yakimov, M.M., Molinaro, A. and Silipo, A. (2020). The Structure of the Lipid A of Gram-Negative Cold-Adapted Bacteria Isolated from Antarctic Environments. *Marine Drugs*, 18(12), pp.592–592. doi:<https://doi.org/10.3390/md18120592>.
25. Ettinger, C.L., Saunders, M., Selbmann, L., Delgado-Baquerizo, M., Donati, C., Albanese, D., Roux, S., Tringe, S., Pennacchio, C., Rio, del, Stajich, J.E. and Coleine, C. (2023). Highly diverse and unknown viruses may enhance Antarctic endoliths' adaptability. 11(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s40168-023-01554-6>.
26. Coppola, D., Lauritano, C., Zazo, G., Nuzzo, G., Fontana, A., Ianora, A., Costantini, M., Verde, C. and Giordano, D. (2023). Biodiversity of UV-Resistant Bacteria in Antarctic Aquatic Environments. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(5), pp.968–968. doi:<https://doi.org/10.3390/jmse11050968>.
27. microbe-canvas.com. (n.d.). *Brevundimonas vesicularis*. [online] Available at:<https://microbe-canvas.com/Bacteria/gram-negative-rods/obligate-aerobic-3/oxidase-positive-2/colistin-resistant-4/indole-negative-2/brevundimonas-vesicularis.html> [Accessed 9 Jan. 2024].
28. Chaiya, L., Kumla, J., Suwannarach, N., Kiatsiriroat, T. and Lumyong, S. (2021). Isolation, Characterization, and Efficacy of Actinobacteria Associated with Arbuscular Mycorrhizal Spores in Promoting Plant Growth of Chili (*Capsicum flutescens* L.). *Microorganisms*, 9(6), p.1274. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms9061274>.
29. eol.org. (n.d.). *Chloroflexia* - *Encyclopedia of Life*. [online] Available at: <https://eol.org/pages/9152935> [Accessed 9 Jan. 2024].
30. Dragone, N.B., Henley, J.B., Holland-Moritz, H., Diaz, M.A., Hogg, I.D., W. Berry Lyons, Wall, D.H., Adams, B.J. and Fierer, N. (2022). Elevational

- Constraints on the Composition and Genomic Attributes of Microbial Communities in Antarctic Soils. *MSystems*, 7(1). doi:<https://doi.org/10.1128/msystems.01330-21>.
31. Selbmann, L., Silvano Onofri, Coleine, C., Buzzini, P., Canini, F. and Zucconi, L. (2017). Effect of environmental parameters on biodiversity of the fungal component in lithic Antarctic communities. *Extremophiles*, 21(6), pp.1069–1080. doi:<https://doi.org/10.1007/s00792-017-0967-6>.
32. Trubl, G., Kimbrel, J.A., Liquet-Gonzalez, J., Nuccio, E.E., Weber, P.K., Pett-Ridge, J., Jansson, J.K., Waldrop, M.P. and Blazewicz, S.J. (2021). Active virus-host interactions at sub-freezing temperatures in Arctic peat soil. *Microbiome*, 9(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s40168-021-01154-2>.
33. Acharya, D., Bhardwaj, A. and Kundan Kumar Chaubey (2023). Bacteriophages and lysins: Novel potential antimicrobials. *Nucleation and Atmospheric Aerosols*. [online] doi:<https://doi.org/10.1063/5.0154209>.
34. Braga, L.P.P., Spor, A., Kot, W., Breuil, M.-C., Hansen, L.H., Setubal, J.C. and Philippot, L. (2020). Impact of phages on soil bacterial communities and nitrogen availability under different assembly scenarios. *Microbiome*, 8(1). doi:<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00822-z>.
35. LeMieux, J. and PhD (2020). *Lysins Unlimited: Phages' Secret Weapon*. [online] GEN - Genetic Engineering and Biotechnology News. Available at: <https://www.genengnews.com/insights/lysins-unlimited-phages-secret-weapon/>.
36. Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V.A. and Huang, D.B. (2013). Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *Journal of Medical Microbiology*, 62(10), pp.1506–1516. doi:<https://doi.org/10.1099/jmm.0.061028-0>.
37. Gerstmans, H., Criel, B. and Briers, Y. (2018). Synthetic biology of modular endolysins. *Biotechnology Advances*, 36(3), pp.624–640. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.009>.
38. Demina, T.A., Luhtanen, A.M., Roux, S., Oksanen, H.M. (2022). Virus-Host Interactions and Genetic Diversity of Antarctic Sea Ice Bacteriophages. *mBio*,

[online] Volume 13(3). Available at: [https:// doi: 10.1128/mbio.00651-22](https://doi.org/10.1128/mbio.00651-22)
[Accessed 28 Jun. 2022].

39. Brum, J.R., Hurwitz, B.L., Schofield, O., Ducklow, H.W. and Sullivan, M.B. (2016). Seasonal time bombs: dominant temperate viruses affect Southern Ocean microbial dynamics. *The ISME Journal*, [online] 10(2), pp.437–449. doi:<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.125>.

40. Córdova, P., Rivera-González, J.P., Rojas-Martínez, V., Fiore, N., Bastías, R., Zamorano, A., Vera, F., Barrueto, J., Díaz, B., Ilabaca-Díaz, C., Bertaccini, A. and Higuera, G. (2023). Phytopathogenic *Pseudomonas syringae* as a Threat to Agriculture: Perspectives of a Promising Biological Control Using Bacteriophages and Microorganisms. *Horticulturae*, [online] 9(6), p.712. doi:<https://doi.org/10.3390/horticulturae9060712>.

41. Köhl, J., Medeiros, F.H.V., Lombaers-van der Plas, C., Groenenboom-de Haas, L. and van den Bosch, T. (2020). Efficacies of bacterial and fungal isolates in biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato and growth promotion in tomato do not correlate. *Biological Control*, 150, p.104375. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104375>.

42. Kering, K.K., Kibii, B.J. and Wei, H. (2019). Biocontrol of phyto-bacteria with bacteriophage cocktails. *Pest Management Science*, 75(7), pp.1775–1781. doi:<https://doi.org/10.1002/ps.5324>.

43. van Charante, F., Holtappels, D., Blasdel, B. and Burrowes, B. (2019). Isolation of Bacteriophages. *Bacteriophages*, [online] pp.1–32. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_14-1.

44. Holtappels, D., Fortuna, K., Lavigne, R. and Wagemans, J. (2021). The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. *Current Opinion in Biotechnology*, [online] 68, pp.60–71. doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.016>.