

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГОЛОВАНЬ ВІКТОРІЯ ВАЛЕРІЇВНА

УДК 578.81

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОРІЗНОМАНІТТЯ ВІРУСІВ БАКТЕРІЙ, ПОШИРЕНИХ НА
АРГЕНТИНСЬКИХ ОСТРОВАХ, АНТАРКТИДА**

Спеціальність – 091 - біологія

Галузь знань – 09 -біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біології

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ Головань В.В.

Науковий керівник: Будзанівська І.Г., доктор біологічних наук, професор.



Київ – 2022

АНОТАЦІЯ

Головань В.В. Біорізноманіття вірусів бактерій, поширених на аргентинських островах, Антарктида. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, доктор філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія) – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України, Київ, 2022.

Дисертаційну роботу присвячено дослідженню біорізноманіття, біологічних та генетичних властивостей бактеріофагів, поширених у ґрунтових біотопах Аргентинських островів в Антарктиді.

Бактеріофаги є внутрішньоклітинними паразитами, їх життєвий цикл повністю залежить від бактерії-хазяїна, а саме від її метаболічної активності, умов довкілля та систем захисту від вірусних інфекцій. Для оцінки та розуміння функціонування системи фаг-бактерія важливим є застосування системного (комплексного) підходу та цілісного розуміння біології вірусів бактерій. Досліджень, пов'язаних з вивченням бактеріофагів на території Антарктиди досить мало, що пов'язано з відсутністю методів, модельних систем та віддаленістю і кліматичними умовами Антарктичного регіону.

Вплив вірусів на бактеріальне різноманіття та еволюцію екосистем в цілому є надзвичайно великим. Антарктичні біотопи залишаються все ще недостатньо вивченими з точки зору вірусного біорізноманіття. Останні дослідження присвячені водним екосистемам, в той час, як наші знання про біотопи ґрунту залишаються обмеженими. Все більше досліджень проводять із застосуванням методів ДНК-секвенування, адже характеристику фагів можна отримати, проаналізувавши геномні послідовності. Ще однією причиною широкого використання вченими методів секвенування, є те, що геномні сиквенси є обов'язковим критерієм для з'ясування таксономічної приналежності вірусів. Але

враховуючи специфіку екстремальних умов антарктичного регіону, біологічні властивості значної частини вірусів прокариот, швидше за все, будуть неохарактеризованими, оскільки більшість їх хазяїв залишаються некультивованими *in vitro*.

Мета роботи було вивчення біологічної та генетичної характеристики бактеріофагів Антарктичного регіону.

Прогнозоване глобальне потепління робить актуальним вивчення екологічних наслідків танення льодовиків вічної мерзлоти. В результаті танення льодовиків Антарктики навколишнє середовище «забруднюється» їхньою мікрофлорою. Тому існує можливість появи небезпечних інфекцій невідомої природи, внаслідок активації давньої мікрофлори, а також перенесення бактеріофагами факторів вірулентності, які зберігаються в їхньому геномі.

Для виконання роботи необхідно було оптимізувати традиційні методи виділення та очистки фагів, що призвело до вдалого отримання 32 фагових ізолятів, які надалі були досліджено методом електронної мікроскопії. За морфологічною характеристикою фаги належали до трьох таксономічних родин: фаги з довгим скоротливим хвостовим відростком родини *Myoviridae*, фаги з довгим нескоротливим хвостовим відростком - *Siphoviridae* та фаги з коротким хвостовим відростком - родини *Podoviridae*, порядку *Caudovirales*.

Дослідження вірусного різноманіття у місці розташування Української антарктичної наукової станції «Академік Вернадський», о.Галіндез, Антарктида започатковані кафедрою вірусології КНУ імені Тараса Шевченка. Але досліджень, присвячених бактеріофагам у ґрунтах, не проводилось. Основною причиною відсутності інформації, присвяченої ґрунтовим вірусам в Антарктиді, є складність культивування, як вірусів, так і їх бактеріальних хазяїв. Для ідентифікації та визначення біологічних властивостей фагів обов'язковою умовою є наявність бактерій-хазяїв в яких відбудеться розмноження фага. Оскільки, біорізноманіття вірусів у будь-якій екосистемі залежить від бактеріального складу, нами було виділено та ідентифіковано 8 бактеріальних культур. Надалі бактеріальні культури

використовувались для накопичення вірусів, а також для встановлення фагово-бактеріальної взаємодії. Ця робота формує перше комплексне уявлення про поширення бактеріофагів у ґрунтових біотопах Антарктиди.

Для восьми із 32 виділених бактеріофагів були вивчено біологічні властивості. Фаги були культивовані, очищені та описані в умовах лабораторії: *Pseudomonas fluorescens* Antarctic virus 1, *Pseudomonas fluorescens* Antarctic virus 2, *Pseudomonas fluorescens* Antarctic virus 3, *Pseudomonas putida* Antarctic virus 4, *Pseudomonas* sp. Antarctic virus 5, *Bacillus subtilis* Antarctic virus 6 (BSAV6), *Pseudomonas* phage UAntarctica та *Pseudomonas* phage UAVern. Усі 8 фагів, вірогідно, є літичними (принаймні проти їх бактерій-хазяїв). В наземних біотопах інших кліматичних зон є біологічна закономірність розповсюдження моновалентних та полівалентних вірусів. Більшість вірусів бактерій є високоспецифічними до одного виду мікроорганізмів (або навіть штаму бактерій), що пов'язано з особливостями взаємодії у системі фаг-бактерія. Не рідко для переживання несприятливих умов фаги використовують псевдолізогенію, а не літичний шлях розвитку. Саме тому, у відомих на сьогодні дослідженнях, присвячених темі ґрунтових бактеріофагів Антарктиди, існують дані лише про помірні фаги. Але незважаючи на екстремальні умови існування наше дослідження вперше доводить існування літичних бактеріофагів у біотопах ґрунтів Антарктичного регіону.

На сьогодні у відкритій базі даних GenBank існує чимала кількість геномних послідовностей фагів. Усі ці послідовності, зазвичай, зібрані за допомогою скринінгу біому. Досліджень, які зосереджувалися не лише б на отриманні генетичної послідовності, але й на її аналізі та анотації майже немає. На сьогоднішній день не опубліковано жодного комплексного аналізу вірусного генетичного різноманіття (тобто метавірому) в антарктичних ґрунтах. Існує лише обмежена кількість метагеномних досліджень, які проводились на території Антарктиди, зосереджених на водних екосистемах та антарктичній мегафауні (тюленях та пінгвінах). Деякі метагеномні дослідження вірусів у ґрунтових

біотопах Антарктиди вивчали фаги помірних широт, і жодного, дослідження у якому б характеризували геноми літичних фагів. У роботі ми комплексно дослідили генетично-молекулярні властивості двох фагів та отримали їх повногеномні сиквенси. Геномні послідовності *Pseudomonas* phage UAntarctica та *Pseudomonas* phage UAVern депоновано через BankIt у базу даних GenBank під номерами доступу MZ605292 та MZ605293, відповідно.

Два літичних бактеріофага *Pseudomonas* UAntarctica та *Pseudomonas* UAVern були виділені із зразків антарктичного ґрунту, відібраних поблизу розташування Української антарктичної станції «Академік Вернадський», Агрендинські острови, Антарктида. На основі морфології віріонів UAntarctica та UAVern були класифіковані як *Siphoviridae* та *Myoviridae*, відповідно. Обидва фаги є толерантними та здатними утворювати негативні колонії навіть при дуже низьких температурах - +4°C, хоча оптимальна температура розвитку фагової інфекції на бактеріях-хазяях складає близько +18°C.

Для доведення літичних властивостей бактеріофагів важливо дослідити особливості геному та переконатися у наявності модулів генів, що відповідають за лізис та відсутності модулів, що відповідають за лізогенію. Геном UAntarctica представлений дволанцюговою ДНК (2лДНК), має довжину 81,1 т.п.н., вміст G+C 58,4%, та містить 119 відкритих рамок зчитування (ВРЗ). Геном UAVern 2лДНК, що складається з 101,6 т.п.н., має G+C вміст 51,26% і кодує 176 ВРЗ. Більшість прогнозованих ВРЗ (близько 81% в обох випадках) кодують білки з невідомими функціями. Гени, функції яких вдалось визначити, відповідають загальному принципу організації фагових геномів та групуються у функціональні модулі: модуль морфогенезу віріонів, реплікації та рекомбінації ДНК.

Порівняння геномів показує, що обидва фаги мають низьку подібність з іншими відомими на сьогодні фагами. Так до фагу UAntarctica подібними є фаги *Pseudomonas* PMBT3 (NC_047902) і Lana (NC_048166), розмір геному яких складає 87,196 і 88,403 т.п.н, відповідно. Загальна подібність нуклеотидної послідовності коливається від 37,4% (UAntarctica проти PMBT3) до 35,8%

(UAntarctica проти Lana) і вказує на низьку ідентичність. У випадку фага UAVern та *Pseudomonas phage ventosus* (MG018930), загальна подібність нуклеотидної послідовності становить 65,5 %. Значна подібність обмежена структурними модулями і модулями реплікації/метаболізму ДНК.

Щоб визначити філогенетичний зв'язок між досліджуваними фагами та іншими вірусами бактерій, було проведено порівняння окремих генів, які найчастіше використовуються для аналізу еволюційних зв'язків фагів. Для фага UAntarctica філогенетичне дерево було побудовано на основі вирівнювання білка великої субодиниці термінази (terL) UAntarctica з гомологічними білками, отриманими за допомогою пошуку в BLASTp. Виходячи з філогенетичного аналізу UAntarctica, встановлено, що UAntarctica займає проміжне положення між сифовірусами, що належать до родів *Maxrubnervirus* і *Lanavirus*. Відповідно утворює окрему еволюційну гілку.

Для встановлення філогенетичних зв'язків фага UAVern, було проведено філогенетичний аналіз на основі об'єднаних генетичних послідовностей (конкатинованих) двох генів, що кодують основний білок капсиду та білок базальної пластини. Отримана дендрограма показує, що UAVern не має близькоспоріднених фагів, крім *Pseudomonas phage ventosus*. Разом вони становлять окрему філогенетичну гілку.

Дотримуючись правил класифікації та віднесення фагів до певних родів, (запропонованих Тернером та співавторами [1], результати порівняльного аналізу геномів, вказують на те, що UAntarctica і UAVern не можуть бути віднесені до жодного роду, визнаного в даний час Міжнародним комітетом з таксономії вірусів і, ймовірно, представляють нові роди в родинях *Siphoviridae* та *Myoviridae*, відповідно.

Дана дисертація містить унікальні дослідження біорізноманіття вірусів в Антарктиді, з особливим акцентом на ґрунтові фаги. Характеристика фагового різноманіття, дослідження біологічних властивостей функціонування системи

фаг-бактерія, а також генетично-молекулярна характеристика деяких фагів сприяють розширенню наших уявлень про віром Антарктичного регіону.

Ключові слова: бактеріофаги, бактерії, Антарктида, вірусні частки, ґрунт, електронна мікроскопія, секвенування, філогенетичний аналіз.

SUMMARY

Holovan V.V. Diversity of viruses of microorganisms in Argentina islands, Antarctica. - Qualification scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis for a scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 «Biology» – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, – Kyiv, 2022.

The thesis is devoted to the study of the biodiversity, biological and genetic properties of bacteriophages, common in soil biotopes of the Argentine islands in Antarctica.

Bacteriophages are intracellular parasites; their life cycle is completely dependent on the host bacterium, namely on metabolic activity, environmental conditions and defense systems against viral infections. To assess and understand the functioning of the phage-bacterial system, it is important to apply a systematic (integrated) approach and a holistic understanding of the biology of bacterial viruses. There have been almost no studies related to the study of bacteriophages in Antarctica, which is due to the lack of methods, model systems and the remoteness and climatic conditions of the Antarctic region.

The influence of viruses on bacterial diversity and the evolution of ecosystems in general is extremely high. Antarctic biotypes have been insufficiently studied in terms of viral biodiversity. Recent studies on bacteriophages in Antarctica have focused on aquatic ecosystems, while our knowledge of soil biotopes remains limited. More and more research is being carried out using DNA sequencing techniques, because characterization of phages can be obtained by analyzing genomic sequences. Another reason for the widespread use of sequencing techniques by scientists is that genomic sequences are an essential criterion for clarifying the taxonomic identity of viruses. But given the specific extreme conditions of the Antarctic region, the biological properties of a large number of prokaryotic viruses are likely to be uncharacterised, as most of their hosts remain uncultivated in vitro.

The aim of the work was the biological and genetic characterisation of bacteriophages in the Antarctic region.

Projected global warming makes it relevant to study the environmental consequences of melting permafrost glaciers. The melting of Antarctic glaciers contaminates the environment with their microflora. Therefore, there is a possibility of dangerous infections of unknown nature due to the activation of ancient microflora, as well as the transfer of virulence factors by bacteriophages that are conserved in their genome.

The work required the optimization of traditional methods for phage isolation and purification, which resulted in the successful production of 32 phage isolates, which were subsequently examined by electron microscopy. According to morphological characteristics, phages belonged to three taxonomic families: phages with long contractile tails of the family Myoviridae, phages with long incompressible tails of the family Siphoviridae and phages with short tails of the family Podoviridae, order Caudovirales.

Studies of viral diversity at the location of the Ukrainian Antarctic Research Station "Academician Vernadsky", Galindez Island, Galindez, Antarctica, founded by the Department of Virology of the Taras Shevchenko National University. But there have been no studies dedicated to bacteriophages in soils. The main reason for the lack of information devoted to soil viruses in Antarctica is the difficulty of culturing both viruses and their bacterial hosts. In order to identify and determine the biological properties of phages, the presence of host bacteria, through which the phage can reproduce, is a prerequisite. As viral biodiversity in any ecosystem depends on the composition of bacterial populations, we isolated and identified eight bacterial cultures. Bacterial cultures were subsequently used to accumulate viruses as well as to establish phage-bacterial interactions. This work creates the first comprehensive insight into the distribution of bacteriophages in Antarctic soil biotopes.

When studying the biological properties of phages that have been accumulated and concentrated, the effect of temperature on the infection of bacteria, the effect of

prophage inducers (ultraviolet light and nalidixic acid) on bacterial populations were studied experimentally, and the spectrum of lytic activity of phages was determined in the phage-bacterial system.

A total of eight phages were isolated, cultured, purified and described in laboratory conditions: *Pseudomonas fluorescens* Antarctic virus 1, *Pseudomonas fluorescens* Antarctic virus 2, *Pseudomonas fluorescens* Antarctic virus 3, *Pseudomonas putida* Antarctic virus 4, *Pseudomonas* sp. Antarctic virus 5, *Bacillus subtilis* Antarctic virus 6 (BSAV6), *Pseudomonas* phage UAntarctica and *Pseudomonas* phage UAVern. All 8 phages are typically lytic (at least against their host bacteria). In terrestrial biotopes of other climatic zones there is a biologic pattern in the distribution of monovalent and polivalent viruses. Most bacterial viruses are highly specific to a single microorganism (or even a bacterial strain) due to the peculiarities of the phage-bacterial system interaction. It is not uncommon for phages to use pseudolysogeny rather than a pathway of development to survive uncomfortable conditions. That is why, in the currently known studies on the subject of Antarctic soil bacteriophages, there are data only on moderate phages. However, despite the extreme living conditions our study is the first to bring to light the occurrence of lithic bacteriophages in the biotopes of the Antarctic region.

As of today, a large number of phage genomic sequences exist in the open GenBank database. All of these sequences are usually collected by biome screening. There are almost no studies that have focused not only on obtaining the genetic sequence but also on its analysis and annotation. As of today, no comprehensive analysis of viral genetic diversity (i.e. metavirus) in Antarctic soils has been published. There are only a limited number of metagenomic studies carried out in Antarctica focusing on aquatic ecosystems and Antarctic megafauna (seals and penguins). Some metagenomic studies of viruses in Antarctic soil biotopes have focused on the study of temperate phages and no study in which the genomes of lytic phages were characterized. In our work, we comprehensively investigated the biological properties of two phages and obtained full-genome sequences. The genomic sequences of

Pseudomonas phage UAntarctica and *Pseudomonas* phage UAVern were deposited via BankIT in the GenBank database under access numbers MZ605292 and MZ605293.

Two lytic bacteriophages *Pseudomonas* UAntarctica and *Pseudomonas* UAVern were isolated from Antarctic soil samples collected near the Ukrainian Antarctic station Akademik Vernadsky, Argentine Islands, Antarctica. Based on virion morphology, UAntarctica and UAVern were classified as *Siphoviridae* and *Myoviridae*. Both phages are tolerant and capable of forming negative colonies even at very low temperatures of +4°C, although the optimum temperature for the development of phage infection on host bacteria is around +18°C.

To prove the lytic properties of bacteriophages, biological characterisation is not sufficient, so it is important to investigate the genome features and make sure that there are gene modules responsible for lysis and no modules responsible for lysogeny. The UAntarctica genome is represented by double stranded DNA (2sDNA), is 81.1 kbp long, has a G+C content of 58.4%, and contains 119 open reading frames (ORFs). The UAVern 2sDNA genome, consisting of 101.6 kbp, has a G+C content of 51.26% and encodes 176 ORFs. Most of the predicted ORFs (about 81% in both cases) encode proteins with unknown functions. The genes whose functions have been identified correspond to the general principle of phage genome organization and are grouped into functional modules: module of virion morphogenesis, DNA replication and recombination.

A comparison of the genomes shows that both phages have low similarity with other phages known to date. For example, the phages *Pseudomonas* PMBT3 (NC_047902) and Lana (NC_048166) are similar for UAntarctica, with sizes of 87,196 and 88,403 bp. The overall nucleotide sequence similarity ranges from 37.4% (UAntarctica versus PMBT3) to 35.8% (UAntarctica versus Lana) and indicates low identity. In the case of UAVern phage and *Pseudomonas* phage ventosus (MG018930), the overall nucleotide sequence similarity is 65.5%. Significant similarity is limited to structural and DNA replication/metabolism modules.

To determine the phylogenetic relationship between the phages studied and other bacterial viruses, individual genes most commonly used for phage evolutionary relationship analysis were compared. For the UAntarctica phage, a phylogenetic tree was constructed by aligning the UAntarctica large terminase subunit protein (terL) with homologous proteins derived from BLASTp searches. Based on the phylogenetic analysis of UAntarctica, it was determined that UAntarctica occupies an intermediate position between the siphoviruses belonging to the genera *Maxrubnervirus* and *Lanavirus*. Accordingly, it forms a separate evolutionary branch.

To determine the phylogenetic relationships of the UAVern phage, a phylogenetic analysis was performed based on the merged genetic sequences (concatenated) of the two genes encoding the capsid basic protein and the basal plate protein. The resulting dendrogram shows that UAVern has no closely related phages other than *Pseudomonas phage ventosus*. Together they constitute a separate phylogenetic branch.

Following the rules of classification and assignment of phages to specific genera (proposed by Turner and co-writers [1]), the results of a comparative genome analysis indicate that UAntarctica and UAVern cannot be assigned to any genus currently recognised by the International Committee on Virus Taxonomy and probably represent new genera in the families *Siphoviridae* and *Myoviridae*.

This thesis contains unique studies of virus biodiversity in Antarctica, with a particular focus on soil phages. Characterisation of phage diversity, studies of biological properties of the functioning of the phage-bacterial system and genetic and molecular characterisation of some phages contribute to our understanding of the Antarctic region.

Keywords: bacteriophage, bacteria, Antarctic, virus particles, soil, electron microscopy, sequencing, phylogenetic analysis.

Список статей, опублікованих за темою дисертації

1. Holovan, V., et al. "Bacteriophages and their microbial hosts in terrestrial biotopes of Antarctica." *Antarctic Science* (2021): 1-17.
2. Головань В., Андрійчук О., Будзанівська І. "Вивчення різноманіття вірусів бактерій, виділених із біотопів моху та ґрунту Антарктичного регіону." *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv/Vestnik Kievskogo Nacionalnogo Universiteta Imeni Tarasa Sevcenko* 77.1 (2019).
3. Головань В., Андрійчук О., Будзанівська І. "Морфологія та деякі біологічні характеристики фагів, виділених з ґрунту та моху Антарктики." *Український антарктичний журнал* 1 (2019): 139-151.

Список тез наукових конференцій

4. Головань В., Андрійчук О., Еволюційні процеси бактеріофагів Антарктиди, XV Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки. 18-21 квітня. Київ-2017. с.46-47.
5. V. Holovan, O. Andriychuk, Viruses of microorganisms in Argentina islands region that undero extreme conditions, XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів. Молодь і поступ Біології. 25-27 квітня м. Львів. – 2017. - с. 209-210.
6. Головань В., Андрійчук О.М., Поліщук В.П., Фагове різноманіття Антарктиди, XV з'їзд Товариства мікробіологів України, Одеса 11-15 вересня 2017 року
7. Andriychuk O., Holovan V., Petrenko S., Polischuk V., Bacteriophages of Antarctica, 100 Anniversary centennial celebration of bacteriophage research. Eliava Institute, Georgia. June 26-29, 2017.– p.62.
8. Holovan V., Gupalo A., Andriychuk O., Budzanivska I. Morphology of bacteriophages in Antarctica, Czechoslovak Virology Conference 2019 and 1st SK-AT Structural Virology Meeting, February 13th - 15th 2019, Bratislava, Slovakia: book of abstract, - P. 83

9. V. Holovan, O. Andriychuk, I. Budzanivska, Characteristics of bacteriophages isolated from samples originated from Argentine's islands, IX Міжнародна антарктична конференція, 14-16 травня 2019 р., м. Київ, Україна: book of abstract, - P. 208-209
10. Головань В., Андрійчук О., І. Будзанівська, Extraction of phages isolates from antarctica moss and soil samples and spectrum of its lytic activity, IX Міжнародна конференція «Біоресурси і віруси», 9-11 вересня 2019 р., м. Київ, Україна: book of abstract, - P. 82
11. V. Holovan, O. Andriychuk, I. Budzanivska Range of the lytic activity of bacteriophages isolated from antarctic region , Young scientists conference “Youth and modern problems of microbiology and virology”, 12-14 November 2019, Kyiv, Ukraine.
12. V. Holovan, O. Andriychuk, I. Galindez islands, maritime antarctic as a research area for studying the diversity bacteriophages, XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 27 – 29 квітня 2020, Львів, Україна.
13. V. Holovan, V. Zoloiedova, O. Andriichuk Preservation of infectivity of bacteriophage lysates isolated from soil biotopes of the antarctic region depending on storage time and temperature , X International Antarctic Conference Kyiv, Ukraine, May 11-13, 2021, 106.
14. Holovan V, Zlatohurska M, Andriichuk O. Pseudomonas phage uantarctica – a novel lytic virus isolated from Antarctic soil, Young scientists conference “Youth and modern problems of microbiology and virology”, 9–11 November 2021, Kyiv, Ukraine.
15. Головань В., Андрійчук О., Перспективи використання безпечних терапевтичних препаратів на основі бактеріофагів антарктичної біоти, Біологічні процеси оптимізації продукційного процесу культурних рослин, Науково-практична онлайн-конференція, присвячена 60-річчю ІСМАВ НААН, 26–27 жовтня 2021 року, м. Чернігів.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	17
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1 Антарктичні віруси: частина мікровсесвіту	24
1.1.1. Віруси тварин	26
1.1.2. Віруси рослин	27
1.1.3. Віруси в ґрунтах	28
1.2. Особливості поширення бактеріофагів	30
1.2.1. Літичний цикл	30
1.2.2. Лізогенний цикл	31
1.2.3. Геноміка бактеріофагів	32
1.3. Екологія бактеріофагів Антарктиди	36
1.4. Екологічні аспекти поширення мікроорганізмів Антарктичного регіону	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	43
2.1. Відбір зразків бактерій та бактеріофагів	43
2.2. Поживні середовища, хімічні реактиви та буферні розчини використані у роботі	45
2.3. Культивування бактерій	48
2.4. Флуоресцентна мікроскопія	51
2.5. Індукція помірних фагів	51
2.6. Виділення бактеріофагів із зразків	52
2.7. Титрування бактеріофагів	53
2.8. Спектр літичної активності бактеріофагів	54
2.9. Трансмійна електронна мікроскопія	55
2.10. Виділення ДНК	56
2.11. Секвенування ДНК бактеріофагів	59
2.12. Біоінформатичний аналіз	60

2.13. Філогенетичний аналіз	62
2.14. Статистична обробка одержаних результатів	63
РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ІНДИКАТОРНИХ КУЛЬТУР БАКТЕРІЙ	65
3.1. Температурні оптимуми культивування бактерій	65
3.2. Морфологічні та біохімічні особливості мікроорганізмів	67
3.3. Виділення та характеристика чистих ліній бактерій із бактеріального консорціуму Cq13	75
РОЗДІЛ 4. БІОРІЗНОМАНІТТЯ БАКТЕРІОФАГІВ У НАЗЕМНИХ БІОТОПАХ АНТАРКТИДИ	78
РОЗДІЛ 5. БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОФАГІВ	88
5.1. Морфологія негативних колоній досліджуваних фагів	89
5.2. Спектр літичної активності культивованих бактеріофагів	96
РОЗДІЛ 6. МОЛЕКУЛЯНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОФАГІВ <i>PSEUDOMONAS</i> PHAGE UAntarctica ТА <i>PSEUDOMONAS</i> PHAGE UAvern	100
6.1. Загальна характеристика геномів фагів	100
6.2. Організація геномів UAntarctica та UAvern	104
6.3. Філогенетичний аналіз	113
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	115
ВИСНОВКИ	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	122

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БУО – бляшкоутворюючі одиниці

т.п.н. – тисячі пар нуклеотидів

gp – продукт гена (gene product)

КУО – колонієутворюючі одиниці

ВРЗ – відкрита рамка зчитування

ID – ідентичність (identity)

QC – перекриття послідовностей (query cover)

НАНЦ – Національного антарктичного наукового центру

УАС – Українська антарктична станція

NCBI – Національний центр біотехнологічної інформації

dsDNA – дволанцюгова дезоксирибонуклеїнова кислота

VBR – virus-to-bacteria ratios

ВСТУП

Актуальність теми. Аналіз досліджень останніх десятиліть [2–4] доводить глобальне значення бактеріофагів у екології Всесвіту. Бактеріофаги є найбільш поширеними біологічними об'єктами на Землі [5]. Як внутрішньоклітинні паразити, бактеріофаги залежать від своїх хазяїв, а значить будуть поширені в усіх екосистемах, де мешкають бактерії. Тому цілісне дослідження біології бактеріофагів повинно включати системний підхід, за якого вони розглядаються у контексті взаємодій з бактеріальними хазяями, а також включають генетично-молекулярні дослідження особливостей організації геномів фагів.

За останні роки в екології вірусів було досягнуто значного прогресу. У дослідженнях морських екосистем, встановлено, що віруси відіграють ключову роль у біогеохімічному кругообігу поживних речовин і є учасниками еволюції прокариот, спричинюючи горизонтальне перенесення генів [5–10]. У ґрунтах Антарктичного регіону різноманітність та екологія вірусів недостатньо вивчені, але є дані, які підтверджують думку про те, що вони суттєво відрізняються від водних систем. Екстремальні чинники впливають на біорізноманіття у ґрунтах навколишнього середовища, наприклад у спекотних гіпераридних пустелях зареєстрована висока концентрацій вірусів. У ґрунтах холодних пустель повідомляється про ще більшу кількість вірусів [11]. Це спостереження, хоча і засноване на обмеженій кількості досліджень, проте призводить до висунення гіпотези, що температура є основним фактором визначення схильності ґрунтових вірусів прокариот зберігатися в лізогенному або літичному стані. Саме тому дослідження на найхолоднішому континенті Земної кулі - Антарктиді є актуальними та можуть пролити світло на закономірності розповсюдження та функціонування вірусних популяцій.

Аналіз вірусного філогенетичного різноманіття ґрунтів показав широкий спектр таксонів вірусів, включаючи бактеріофаги порядку *Caudovirales*. Аналізи геномів ґрунтових вірусів показують низькі значення ідентичності у порівнянні з

фагами, відомими на сьогодні у загальнодоступних базах даних, що свідчить про існування нових, поки не охарактеризованих філогенетичних ліній. Варто зазначити, що на даний момент існує декілька досліджених помірних фагів і невідомо жодного літичного бактеріофага, виділеного з ґрунтових біотопів Антарктиди.

Глобальне потепління робить актуальним вивчення екологічних наслідків танення льодовиків вічної мерзлоти. В результаті танення льодовиків Антарктики навколишнє середовище «забруднюється» їх мікрофлорою. Тому існує можливість появи нових небезпечних інфекцій невідомої природи, внаслідок активації давньої мікрофлори, а також перенесення бактеріофагами факторів вірулентності та патогенності, що зберігаються в їх геномі. Тому з точки зору прикладної науки, ми повинні заздалегідь мати шляхи вирішення проблем пов'язаних з виникненням нових вірусних інфекцій.

Отже, дослідження біорізноманіття бактеріофагів ґрунтових біотопів Антарктиди, молекулярно-біологічні характеристики, філогенетичний аналіз зв'язків з іншими ізолятами, а також цілісне розуміння функціонування системи фаг-бактерія є важливими для фундаментальної та прикладної науки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами. Дисертаційна робота виконана у межах науково-дослідницьких тем кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка: "Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій" (№ держреєстрації: 0111U004649) та частково виконана за підтримки Національного антарктичного наукового центру (НАНЦ) Міністерства освіти і науки України (грант № 17DF036-10).

Мета та завдання досліджень. Метою дисертаційної роботи є біологічна та генетична характеристика бактеріофагів Антарктичного регіону.

Відповідно до мети вирішували наступні задачі:

- із зразків ґрунту Антарктичного регіону виділити бактеріофаги;

- провести вивчення морфологічних особливостей виділених бактеріофагів;
- дослідити біологічні властивості виділених фагів;
- провести повногеномне секвенування та здійснити біоінформатичний аналіз геномів фагів;
- провести філогенетичний аналіз та порівняти амінокислотні та нуклеотидні послідовності виділених фагів з відомими вірусами бактерій;
- на основі морфологічних, біологічних та генетичних властивостей встановити таксономічну приналежність фагових ізолятів;

Об'єкт дослідження – різноманітність та властивості ізолятів фагів, виділених з ґрунту Антарктичного регіону.

Предмет дослідження – морфологія, біологічні та генетичні особливості ізолятів бактеріофагів.

Методи дослідження. Для вирішення задач досліджень були використані вірусологічні, молекулярно-генетичні, біоінформатичні та мікробіологічні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше виділено та охарактеризовано біорізноманіття бактеріофагів ґрунтових біотопів Антарктиди, вивчено їх біологічні особливості.

При дослідженні біологічних властивостей виділених бактеріофагів доведено літичний характер їхніх життєвих циклів. Отримані ізоляти є єдиними відомими на сьогодні літичними ґрунтовими фагами на території Антарктиди.

В результаті секвенування отримано унікальні нуклеотидні послідовності двох фагів, які не мають подібності до геномів референтних бактеріофагів, представлених у базі NCBI.

Аналіз білкових послідовностей показав, що фаги містять деякі особливі білкові продукти, які більш характерні для бактеріальних організмів, але, вірогідно, були запозичені фагами в процесі еволюції.

При проведенні філогенетичного аналізу визначено, що фаги не відносяться до жодних відомих на сьогодні родів вірусів у відповідних родин.

Практичне значення. Кінцева науково-технічна продукція має фундаментальне і вагоме прикладне значення. Одержана колекція бактеріофагів придатна для використання в наукових дослідженнях, спрямованих на комплексне вивчення структури та функцій антарктичних організмів, створення узагальнених моделей екосистем. У перспективі нові бактеріофаги можуть бути корисними для розробки систем біоконтролю та ідентифікації мікроорганізмів. Результати отримані в дисертаційному дослідженні можуть бути використані в розробці спецкурсів для навчального процесу в Навчально-науковому центрі «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Зокрема у вдосконаленні таких спецкурсів як: «Бактеріофагія», «Молекулярна біологія вірусів», «Генетика вірусів», «Еволюція вірусів», «Діагностика вірусних інфекцій».

Особистий внесок здобувача. Аналіз літературних даних, виконання експериментальних робіт та аналіз отриманих результатів є самостійним та оригінальними науковими дослідженнями. Дисертанткою особисто виконано виділення бактеріофагів, здійснено підготовку зразків для проведення електронно-мікроскопічних досліджень, проведено експерименти з встановлення біологічних особливостей бактеріофагів. Підготовано до секвенування фагову ДНК. Проведено біоінформатичний аналіз геномів, їх порівняння з відомими представниками у базі NCBI.

Збір зразків на території Антарктиди проводили біологи Української антарктичної станції «Академік Вернадський», за що автор висловлює щире подяку.

Електронно-мікроскопічні дослідження поводити на базі Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України та Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Центрифугування здійснювали в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Секвенування ДНК фагів відбувалось у Лабораторії рекомбінантних вакцин Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG&MUG (Gdansk, Poland).

Аналіз та узагальнення результатів, їх статистична обробка, формулювання висновків дисертації зроблені автором особисто під керівництвом співробітників кафедри вірусології ННЦ «Інституту біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, які є співавторами опублікованих робіт.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень були представлені на таких вітчизняних та міжнародних конференціях:

- Conference 2019 and 1st SK-AT Structural Virology Meeting, February 13th - 15th 2019, Bratislava, Slovakia
- IX Міжнародна антарктична конференція, 14-16 травня 2019 р., м. Київ, Україна
- IX Міжнародна конференція «Біоресурси і віруси», 9-11 вересня 2019 р., м. Київ, Україна
- I Young scientists conference “Youth and modern problems of microbiology and virology”, 12-14 November 2019, Kyiv
- XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 27 – 29 квітня 2020, Львів, Україна
- XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 19 – 21 квітня 2021, Львів, Україна
- X International Antarctic Conference Kyiv, Ukraine, May 11-13, 2021
- III Young scientists conference “Youth and modern problems of microbiology and virology”, 9-11 November 2021, Kyiv
- Науково-практична онлайн-конференція, присвячена 60-річчю ІСМАВ НААН “Біологічні аспекти оптимізації продукційного процесу культурних рослин”, 26 жовтня 2021, Чернігів, Україна

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 18 наукових праць, серед яких 3 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених МОН України та міжнародних фахових журналах (1 стаття у

журналі, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS), та 15 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 167 сторінках друкованого тексту і складається з традиційних розділів: Вступ, Огляд літератури (2 розділи), Матеріали та методи досліджень, Результати та обговорення (3 розділи), Узагальнення результатів, Висновки, Список використаної літератури (247 посилань) та Додатки (3 додатки). Ілюстративний матеріал включає 22 рисунки та 12 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Антарктичні віруси: частина мікробіосфери

Віруси – це найпоширеніші біологічні об'єкти в біосфері. У морях та ґрунтах кількість вірусних частинок перевищує кількість клітин щонайменше на порядок [9, 12,13]. Віруси здатні заражати організми всіх сфер клітинного життя. В даний час Міжнародним комітетом з таксономії вірусів визнано приблизно 9110 видів різних вірусів, але більшість із них мають медичне, ветеринарне, сільськогосподарське, або біотехнологічне значення [1]. Кількість таксономічно визнаних вірусів є значно меншою, ніж справжнє різноманіття, через відсутність можливості проведення скринінгу в усіх потенційних хазяїв та багатьох природних середовищах [13–15]. Незважаючи на докази, щодо чисельності та різноманітності вірусів, дуже мало природних середовищ існування були системно дослідженими, але останні метагеномні дослідження демонструють наявність вірусів у зразках повітря, ґрунту та води [16–23].

Віруси поширені в усіх екосистемах, однак залишаються частини Земної кулі, де вивчення їх майже не відбувається. Одним з таких материків є Антарктида. І хоча наші знання про біорізноманіття вірусів є обмеженими, важливо зазначити, що Антарктида може відкрити нові уявлення про біорізноманіття вірусів у регіонах вічної мерзлоти. Дослідження вірусів в Антарктиді в цілому і, зокрема, у наземних середовищах існування перебуває в зародковому стані, а літературна база містить переважно одинокі звіти. Це ускладнює узагальнення та виявлення екологічних закономірностей та процесів. Близько двадцяти років тому Пірс і Вільсон (2003) вперше розглянули екологічні аспекти вірусів у водних середовищах Антарктиди [24]. Комплексного дослідження біологічних, екологічних та генетичних властивостей вірусів у наземній Антарктиді не існує досі.

Екосистеми холодних регіонів вважаються простими в порівнянні з гарячими пустелями, через відсутність вищих рослин, а також залежності екосистем від мікроорганізмів [25]. Таким чином, антарктичні ґрунти є відмінним середовищем для дослідження мікробних взаємодій та екосистемних процесів. Динаміка вірусних спільнот тісно пов'язана з чинниками навколишнього середовища та варіаціями динаміки хазяїна (Breitbart, 2012). Фаги відіграють важливу роль у екосистемах завдяки горизонтальному переносу генів та вивільненню розчиненої органічної речовини в навколишнє середовище шляхом лізису хазяїна [26]. Дослідження, проведені за межами Антарктиди доводять значимість вірусів в екології бактерій. Віруси безпосередньо впливають на харчові ланцюги, лізуючи бактерії та надаючи окремі макро- та мікроелементи іншим живим організмам [27]. Крім того, віруси можуть побічно впливати на первинну продуктивність, шляхом впливу на структуру та кількість бактеріальних спільнот [28]. Навіть якщо віруси лізують лише незначну частку бактерій в популяції, вони мають величезний вплив на вміст різних видів або штамів в бактерій. Усі клітинні форми життя сприйнятливі до вірусної інфекції, як еукаріоти, так і прокаріоти, і навіть археї [6]. Оскільки бактерії є найпоширенішими клітинними організмами, вважається, що найбільша кількість інфекційних вірусів представлена бактеріофагами [26].

Фагові частки складаються з одно- або дволанцюгової ДНК або РНК, оточеної білковою оболонкою – у деяких наявна ліпідна оболонка [29]. Фагові геноми мають модульну організацію, гени згруповані в модулі структурних ядер з відповідною функцією [30]. Ця структура є результатом негомологічної рекомбінації під час еволюції вірусів у різних таксонах [31]. Більшість описаних фагів належать до порядку *Caudovirales*, який ще називають хвостатими фагами [32]. Цей порядок розділений на чотирнадцять родини на основі морфології хвостового відростка (історію випусків таксономії див. за адресою https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases). Родини *Myoviridae*, *Podoviridae* і *Siphoviridae* були офіційно прийняті Міжнародним комітетом з

таксономії вірусів (ICTV) в 1981 і 1984 роках. Порядок *Caudovirales*, що об'єднує всі хвостаті фаги, був запропонований в 1998 році Хансом-Вольфгангом Акерманом і схвалений поштовим голосуванням [33]. Епоха геноміки настала на початку 2000-х років, секвенування геномів фагів виявило набагато більш високу геномну різноманітність, ніж вважалося раніше. Особливо у бактеріофагів, що належать до порядку *Caudovirales*, що призвело до створення перших субродин в існуючих трьох родин *Podoviridae* [34], *Myoviridae* [35], а потім *Siphoviridae* [36]. З урахуванням зростання числа геномних послідовностей фагів в базах даних швидко стало очевидно, що ці три родини не є монофілетично згрупованими в родини. На сьогоднішній день три нових родини міовірусів були офіційно ратифіковані: *Ackermannviridae* [37], *Chaseviridae* [38], *Herelleviridae* [39,40]; два для сіфовірусів: *Demereciviridae* [38] і *Drexelviraidae* [38], і один з подовірусів: *Autographiviridae* [38].

Досягнення в технології секвенування та епоха мікробіома призводить до необхідності класифікації на основі геномних послідовностей. У 2021 році були зроблені перші кроки на шляху до перспективної таксономії [1], але остаточних принципів класифікації ще не сформованою. Тому наразі досить складно однозначно охарактеризувати таксономічне різноманіття вірусів бактерій.

1.1.1. Віруси тварин

За винятком прибережних районів континентальної Антарктиди та морської Антарктики, де ссавці та птахи періодично виходять на берег переважно для розмноження та гніздування, фауна Антарктики складається виключно з безхребетних, серед яких більшість – це членистоногі, нематоди, коловертки та найпростішими. Дані про віруси антарктичних безхребетних відсутні, хоча немає підстав вважати, що ці віруси не існують, оскільки віруси безхребетних трапляються в інших екосистемах, де фауна краще охарактеризована.

На відміну від вірусологічних досліджень безхребетних, дослідження морських птахів і ссавців, які періодично виходять на континентальну частину Антарктиди, проводяться. У пінгвінів були виявлені збудники та антитіла до хвороб Гамборо, пташиного грипу та хвороби [41–46], що поширені і серед птахів поморників [41–43]. Повідомлень про віруси птахів в антарктичних ґрунтах дуже мало, хоча ці ґрунти містять велику кількість гуано та пір'я і є ймовірними резервуарами вірусів птахів [47]. Тюлені мають антитіла до герпесвірусу собак та котів [48–51], а також до вірусу фоцинової чумки [49,50,52]. Існує думка, що деякі віруси завезені штучно, тому пінгвіни та морські птахи можуть бути під загрозою вимирання [53,54]. Ризики для пінгвінів від вірусу інфекційної бурсальної інфекції та для тюленів від вірусу чуми собак [56,57] сприяли обмеженню ввезення яєць, їжі людьми в деякі райони Антарктиди та вивезення собак з Антарктики. Вплив людини також є фактором ризику для антарктичних морських птахів, через можливість завезення сезонного грипу [55,57].

1.1.2. Віруси рослин

Дані про віруси рослин є ще більш обмеженими, у порівнянні з дослідженнями вірусів тварин. Є всього кілька повідомлень про віруси рослин, одне з яких стосується зараження вищих рослин в Антарктиці - *Deschampsia antarctica* (єдина антарктична однодольна рослина) та одне повідомлення про вірусну інфекцію у мохів. Немає повідомлень про віруси дводольного *Colobanthus quitensis*, лише дані про наявність антигенів до вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка [58]. Скотніцький та ін. у 2003 році повідомляли про *Stilbocarpa mosaic bacilliform badnavirus* на острові Маккуорі, а Поліщук та ін. у 2007 про віруси *D. antarctica* біля Української антарктичної станції “Академік Вернадський”, що розташована на Аргентинських островах у морській Антарктиці [59,60]. Поліщук та ін. (2007) повідомляли про наявність антигенів вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка, вірусу огіркової мозаїки та вірусу

плямистого в'янення томатів у *D. antarctica* – вірусів, які зазвичай уражують дводольні рослини. Також було знайдено антигени тобамовірусів, вірусу тютюнової мозаїки та вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка у мохів родів *Polytrichum* та *Barbilophozia*, що є незвичним, оскільки ці віруси зазвичай уражають вищі рослини. Відсутність даних про віруси, що інфікують печіночники або лишайники, не можна розглядати як доказ відсутності таких інфекцій в Антарктиді; інформація про віруси печіночників та лишайників рідкість для всіх екосистем [61,62]. Враховуючи, що багато рослинних безхребетних, зокрема комахи та нематоди, є важливими переносниками вірусів рослин в інших екосистемах, ймовірно, рослинні безхребетні також є переносниками вірусів в Антарктиді. У субантарктиці є безліч прикладів безхребетних, що є переносниками вірусів рослин [63–65], але звітів про безхребетних, що передають віруси рослин в Антарктиді немає.

1.1.3. Віруси в ґрунтах

У цей час зростає інтерес до досліджень ґрунту в Антарктиді. Прогнозоване глобальне потепління робить актуальним вивчення екологічних наслідків танення льодовиків вічної мерзлоти. В результаті танення льодовиків Антарктики навколишнє середовище «забруднюється» їх мікрофлорою. Тому існує можливість появи небезпечних інфекцій невідомої природи, внаслідок активації давньої мікрофлори, а також перенесення бактеріофагами факторів вірулентності та патогенності, що зберігаються в їх геномі [66]. Встановлено, що неродючі антарктичні ґрунти гомогенні лише в межах одного острова [67], або між різними Сухими долинами [68], що безпосередньо впливає на склад бактеріальних спільнот. Окрім загальних фізико-хімічних відмінностей ґрунту, рН – є головним фактором, що визначає розселення мікроорганізмами. Наприклад, типи *Acidobacteria* і *Bacteroidetes* домінують у лужних ґрунтах, а *Deinococcus/Thermus* та *Gamma proteobacteria* – у більш нейтральних ґрунтах, причому відносна

кількість ацидобактерій обернено корелює з широтою [69–71]. У більш вологих ґрунтах зростає кількість ціанобактерій [72,73].

Мікроеукаріотичне різноманіття в антарктичних ґрунтах складається з грибів (аскоміцетів та базидіоміцетів), хлорофітів, інфузорій, страменопілів та церкозуанів, а також нематод, тардіградів та коловерток у вологих ґрунтах [72,74,75]. Як і у випадку бактеріального різноманіття, біорізноманіття еукаріотів пов'язане з локалізованими факторами навколишнього середовища [76].

Дослідження вірусів в антарктичних ґрунтах дещо чисельніші, порівняно дослідженнями інших груп організмів. Вивчення вірусів полярних екосистем, включаючи ґрунт, показало, що вони в основному заселені бактеріофагами [77–79].

В переважній більшості досліджень хвостаті бактеріофаги *Caudovirales* є домінуючими у зразках ґрунту [11,23,77,80]. Метагеномні дослідження дозволили розширити уявлення про фагове різноманітність, зокрема РНК-бактеріофаги родини *Leviviridae*, ssDNA-фагів родини *Microviridae* та dsDNA *Tectiviridae* [81]. Віруси родини *Myoviridae* лізують бактеріальні культури *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* та *Bacillus*. Бактеріофаги родини *Siphoviridae* асоційовані з *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Bacillus* та *Aeromicrobium*. Бактеріофаги *Podoviridae* не асоціюються з жодною з бактеріальних культур [82]. Описано, що представники родини *Leviviridae* асоціюються з видами *Pseudomonas*; *Tectiviridae* – з бактеріями *Bacillus* [83]. *Inovirus* містять циркулярну ssDNA, ниткоподібні віріони і асоційовані з бактеріями *Pseudomonas* [83,84]. Вільямсон та співавтори (2007) вивчаючи ґрунти із сухих долин встановив, що рівень вірусів у цих ґрунтах перевищував вміст бактерій більш ніж у 1000 разів і був високим навіть у порівнянні з ґрунтами, які походили з помірних широт [23], що призвело до припущень, що надзвичайно холодні та сухі долини сприяють збереженню вірусів у ґрунті [5,23].

1.2. Особливості поширення бактеріофагів

Цикл розмноження вірусу безпосередньо залежить від його хазяїна [85]. Існують два основні цикли розвитку бактеріофагів, зокрема і фагів порядку *Caudovirales*. Знання про фаги порядку *Caudovirales* стали фундаментальними для ранніх описів вірусів та використовувались як визначаючі фактори у класифікації і таксономії бактеріофагів [86].

Фаги порядку *Caudovirales* інокують свою dsDNA в бактерію-хазяїна при зараженні, а потім можливий розвиток літичного або лізогенного циклу розвитку фага [87]. Обидва цикли спричиняють різний вплив на життєдіяльність та розвиток популяції клітин-хазяїв, а також вплив на екологічні процеси в навколишньому середовищі бактерій.

1.2.1. Літичний цикл

Літичний цикл - це процес реплікації вірусів під час розвитку якого, фаг з дволанцюговою ДНК перелаштовує метаболізм клітини-хазяїна на утворення та збірку нових фагів [2]. Цей цикл має такі етапи: адсорбція, інокуляція нуклеїнової кислоти в бактеріальну клітину, експресія, реплікація нуклеїнової кислоти, збірка нових фагів та лізис клітин-хазяїв для вивільнення нових фагів (рис. 1.1) [88]. Після того, як фаг остаточно приєднався до рецептора мембрани хазяїна, геном фага вводиться в цитоплазму хазяїна [89,90]. У деяких фагів усередині клітини-хазяїна геном замикається в кільце (наприклад, шляхом кінцевих повторів, липких кінців або кінцевих надлишковостей), щоб захистити себе від екзонуклеаз та рестрикційних ферментів [90].

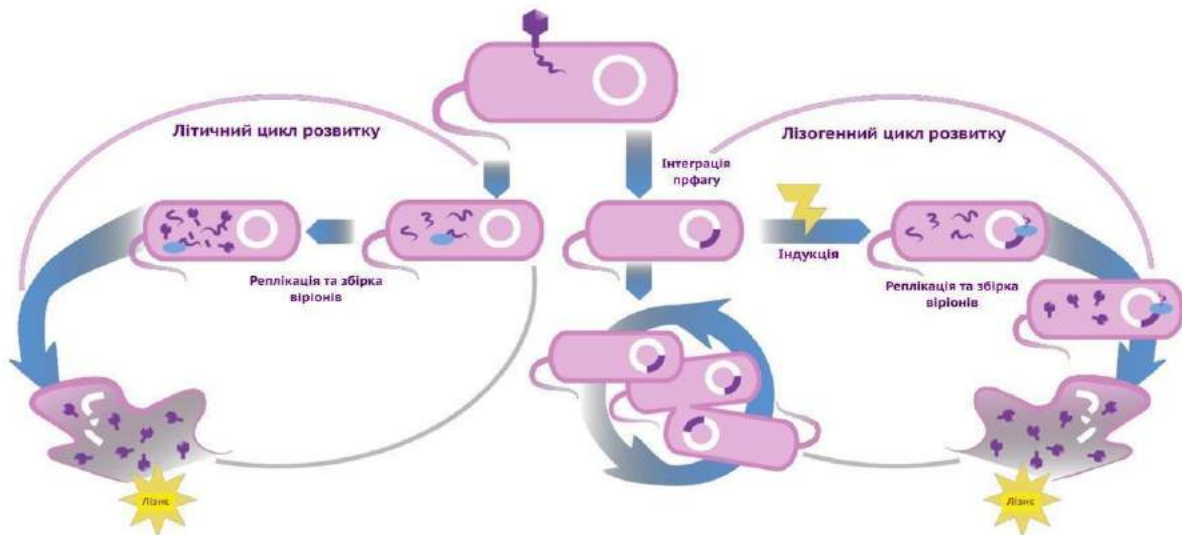


Рис 1.1. Основні цикли розвитку фагів порядку *Caudovirales*: літичний (ліворуч) та лізогенний цикл (праворуч) [2]

Якщо фагу вдалося захистити свій геном, то відбувається перемикання метаболізму хазяїна на реплікацію генома фага та на синтез нових віріонів [2]. У геномах хвостових фагів цей процес регулюється генами, що зібрані у модулі, які відповідають за лізис бактеріальної клітини [87].

На ранньому етапі розвитку транскрибуються гени, що захищають геном фага, потім гени, що відповідають за реплікацію нової фагової ДНК, а потім – пізні гени, що кодують білки віріону [90]. В результаті, зрілі віріони накопичуються в цитоплазмі та за рахунок пептидоглікан-лізуючих ферментів руйнують клітинну стінку бактерій, що призводить до вивільнення фагового потомства [2,26,89].

1.2.2. Лізогенний цикл

Під час лізогенного циклу геном помірною фага інтегрується в геном хазяїна (профаг) і реплікується разом з хазяїном (лізоген) [10]. Багато помірних фагів мають свої специфічні сайти інтеграції, наприклад, такі як сайти *att* для вбудовування в лізогенну хромосому фага лямбда [31]. Інші, такі як фаг *Mu*,

використовують інтегрази для неспецифічної інтеграції в геном хазяїна [90]. У стані профага, гени фагів репресуються, це триває доти, поки фактор зовнішнього середовища не вплине на профаг та змусить змінити цикл розвитку на літичний, таке явище називається індукцією профага (рис. 1.1) [10].

Загалом, лізогенію фаг використовує для переживання несприятливих умов. Профаги, які знаходяться у клітині хазяїна захищені від стресових факторів, таких як УФ-випромінювання, періоди низької чисельності хазяїна, тощо [6,10,91]. З іншого боку, бактерія-хазяїн набуває імунітет до зараження близькоспорідненими фагами та підвищує своє виживання завдяки придбанню нових функціональних генів або придушенню непотрібних метаболічних функцій [6,91,92]. Рішення для визначення літичного або лізогенного циклу розвитку обумовлене кількома факторами, такими як відносна щільність фага та популяції хазяїна [93,34], або вивільнення фагового пептиду, що регулює процес лізису[92]. Інші непрямі фактори – це температура, поживні речовини та/або рівень токсинів; всі ці фактори впливають на розподіл та поширення потенційних хазяїв у ґрунті [10,91,95,96,97].

1.2.3. Геноміка бактеріофагів

Сиквенси перших повнорозмірних геномів, які вдалося отримати, були зроблені на основі геномів бактеріофагів. Сиквенс фага φX174 довжиною 5 386 п.н. отримано у 1977 р. [98]. Першою повною послідовністю дволанцюгового ДНК фагу – була послідовність генома фага лямбда, розміром 48 502 п.н. [99], а незабаром була отримана послідовність генома фага T7 - 39 936 п.н. [100]. Після вдосконалення методів секвенування, майже через десять років, кількість фагових сиквенсів зросла значною мірою [101].

Генетична різноманітність популяції бактеріофагів надзвичайна. Наприклад, якщо порівнювати чотири опубліковані геноми фагів *Streptomyces* та колекцію 50 геномів фагів *Mycobacterium*, то подібності нуклеотидних послідовностей немає,

хоча *Mycobacterium* та *Streptomyces* належать до одного порядку – *Actinomycetales*. Якщо порівнювати бактеріофаги, що уражують одного бактеріального хазяїна, то іноді вони мають спільні послідовності нуклеотидів [102–104]. Але існує багато фагів одного хазяїна, які можуть мати і невелику схожість послідовностей або взагалі не мають подібних послідовностей, як наприклад фаги *Pseudomonas*. Фаги з різними морфотипами віріонів мають різну організацію геномів і більшу різноманітність послідовностей [102].

Порівняльний аналіз фагових геномів має деякі загальні принципи. У фагів із сіфовірусним морфотипом існує чітка закономірність синтезу генів, що кодують структуру та збірку віріона [105]. Гени, що відповідають за збірку головки та хвостового відростку, розташовані разом. Гени головки, як правило, включають одну або дві субодиниці термінази, порталний білок, протеазу головки, сигнальний білок та основний капсидний білок; гени хвостового відростка включають головну субодиницю хвостового відростка, білок, що відповідає за вприскування генетичної інформації, за яким слідує другорядні білки хвостового відростка [105].

Деякі фаги містять касету інтеграції (*int*, *attP*), як правило, гени інтеграції розташовуються близько до центру геному, при цьому довжина геному може збільшуватися удвічі [102]. У більшості випадків порядок структурних генів та генів, що відповідають за збірку віріонів зберігається, але між ними може існувати безліч додаткових генів невідомої функції [106].

Для анотації фагових геномів варто враховувати вище описані закономірності та дотримуватися певних правил. Основні етапи анотації будь-якого геному, фагового бактеріального чи еукаріотичного, полягають у виявленні послідовностей геному та визначенні функцій, що їх описують. Типові особливості, які визначають в геномі фагів, включають гени, що кодують білки, тРНК, транспозони, прямі та непрямі повтори, промотори, термінатори та сайти інтеграції. Анотації зазвичай додаються лише до генів, що кодують білок та тРНК, часто містять інформацію про сайти інтеграції. Специфічною особливістю для

анотації фагових геномів є те, що реплікація вірусної частинки безпосередньо залежить від клітини хазяїна і функції геному бактеріофагів потрібно розглядати в контексті геному хазяїна. Таким чином, ідентифікація бактерії хазяїна є важливою частиною анотації фагових геномів [107,108].

Гени, що кодують білки, є визначальними для більшості автоматизованих систем анотацій. Як правило, ген, що кодує білок, можна ідентифікувати як довгий відрізок послідовності в одній рамці зчитування, який можна перетворити в послідовність білка без включення одного з трьох стоп-кодонів; ці довгі відрізки називаються відкриті рамки зчитування. Більшість алгоритмів намагаються ідентифікувати найдовші неперекриваючі ВРЗ в геномі, базуючись на теорії, що чим довша відкрита рамка зчитування, тим менша ймовірність її випадковості. Існує багато альтернативних алгоритмів пошуку генів, які були розроблені за останні два десятиліття, включаючи CRITICA [109], GeneMark [110,111], GISMO [112], Glimmer [113,114], MetaGeneAnnotator [115] та Prodigal [116]. Алгоритми можуть відрізнятися в конкретних стартових сайтах, які вони ідентифікують; старт кодоном може бути метіонін (ATG) або валін (GTG), і передбачити, який саме стартовий кодон є правильним для даного гена, складно без попереднього знання меж трансляції гена. Короткі гени статистично важко відокремити і зрозуміти, які нуклеотиди не є стоп-кодонами, а є частиною білкової послідовності амінокислот. Часто алгоритми використовують штучне відсікання, наприклад 75 амінокислот. Залишається визначити, скільки малих білків кодується у фагових геномах, і навряд чи достатньо лише біоінформатичної точки зору, оскільки для цього потрібно біологічне підтвердження прогнозів біоінформатики або масштабні протеомічні дослідження.

Вважається, що більшість геномів бактерій не містять рамок зчитування, які перекриваються. Якщо під час біоінформатичного аналізу зустрічається перекриття ВРЗ, тоді його прийнято видаляти з анотації [116]. Однак у вірусів, включаючи фаги, є кілька добре відомих прикладів двох різних генів, що закодовані на одній і тій самій ділянці ДНК, таких як система Rz / Rz1 [117]. За

рахунок перекриття рамок зчитування утворюються нові гени, доказом цього є геноми рабдовірусів [118]. Зазвичай ділянки, що перекриваються, не включені до біоінформатичних алгоритмів, оскільки додавання перекриваючих ВРЗ до прогнозування генів включало б величезну кількість помилкових результатів. Отже, більшість схем, які прогнозують фагові білки ігнорують перекриття рамок зчитування. У фагових геномах дуже мало або взагалі немає висококонсервативних послідовностей, що ускладнює побудову моделі геному [119].

Функціональна анотація кодуючих генів фагів заснована на пошуках гомології щодо існуючих фагових білків. Фагові геноми, як і геноми бактерій, упорядковують деякі свої гени. Ця інформація може бути використана для виявлення груп генів. Наприклад, малі та великі термінази (TerS та TerL) часто суміжні в геномі, тому ідентифікація однієї субодиниці веде до ідентифікації іншої [119].

Основною складністю у функціональній анотації генів, що кодують фагові білки, шляхом пошуку за гомологією - є той факт, що більшість білків не мають близьких гомологів у довідкових базах даних. Особливо для нових фагів, це призводить до того, що більшість закодованих ВРЗ не мають жодної анотованої функції або, в кращому випадку, гіпотетичної функції [119].

Некодуючі гени тРНК (ncRNA) ідентифікуються за допомогою обчислювальних інструментів, побудованих спеціально для розпізнавання вторинної структури молекули тРНК [120]. Як і у випадку тРНК, функція інших небілкових кодуючих генів РНК залежить від структури молекули, а не від нуклеотидної послідовності. Отже, інші некодуючі гени РНК також розпізнаються за вторинною структурою, а не за пошуком гомології до вже існуючих послідовностей [121]. Програмне забезпечення tRNAScan-SE має базу даних для ідентифікації генів тРНК. Багато фагів кодують гени тРНК, було висунуте припущення, що гени тРНК фага доповнюють гени тРНК хазяїна та при трансляції прискорюють синтез фагових білків [122]. Ці гени тРНК також часто

використовуються як місця інтеграції фагів у геномі хазяїна (*attP*). Інтеграція фага пошкоджує ген, що кодує тРНК в геномі хазяїна. Таким чином, перенесення фагом повної або майже повної послідовності гена тРНК дозволяє йому відновити тРНК, яку він пошкодив під час інтеграції [123]. Роль ncRNA у способі життя фагів мало досліджена. Нещодавня робота з системами CRISPR / Cas виявила присутність цих систем у фагових геномах та метагеномах [124], і вважається, що вони використовуються для захисту від інших фагів, які можуть інфікувати того самого хазяїна.

Місця інтеграції фагів неможливо виявити *de novo*, якщо відомий лише фаг, але якщо відомі послідовності фага та генома хазяїна, їх можливо знайти. Фаг несе сайт прикріплення P (*attP*), який має гомологію послідовності до місця прикріплення бактерій B (*attB*). Інтеграція ініціюється шляхом рекомбінації між *attP* і *attB*, в результаті чого утворюються *attL* і *attR*, які є фланкуючими ділянками профага [119].

Метагеномні дослідження фагів [125], доводять що фагові геноми містять високу частку послідовностей, функції яких і досі невідомі, це узгоджується з тим, що фаги мають високе генетичне різноманіття. Ці дослідження дають значне розуміння географічного розподілу і типів фагів, але порівняно невелике розуміння структури та закономірності фагових геномів. Однак широкомасштабна вірусна метагеноміка стане найважливішим активом для розуміння геноміки фагів у найближчі кілька років.

1.3. Екологія бактеріофагів Антарктиди

Дослідження вірусних популяцій у ґрунтах Антарктиди проводились виключно у великих непокритих льодом регіонах (наприклад, у Східно-антарктичних сухих долинах Мак-Мердо). Прямий підрахунок вірусів за допомогою епіфлуоресцентної мікроскопії показав високу щільність VLP (virus-ike particle) в діапазоні від $2,3 \times 10^8$ до $6,4 \times 10^8$ позаклітинних вірусоподібних

часток на грам сухого ґрунту. Поширеність бактерій у цих ґрунтах становила від 4,6% до 21,1%, що є набагато меншою кількістю, ніж кількість бактерій в гарячих пустельних ґрунтах (84% [68,143]). Під час проведення епіфлуоресценції було розраховано співвідношення вірусів до бактерій (virus-to-bacteria ratios (VBR)). VBR склало 170 до 8200, що є найвищим показником для будь-якої ґрунтової екосистеми [52]. З Антарктичних ґрунтів було виділено бактеріальні ізоляти, які у своєму геномі містили унікальні профаги. Помірні сифовіруси (SраA1 та ВсеA1), виділені із *Staphylococcus pasteurii* та *Bacillus cereus*, містили додаткові гени фагів (MZTP02) [126]. Це розташування генів "Russian doll" раніше не було описано для ґрунтових бактеріофагів. В результаті висловлено припущення, що таке розташування генів може представляти "fast-track" шлях еволюції вірусу та горизонтального перенесення генів, що спричинює розширення ареалу хазяїна [11].

Піросеквенсування ДНК організмів, які мешкають у ґрунтах Антарктиди, дозволило виявити широкий спектр бактерій, архей, мікроеукаріотів, а також вірусів [127]. Вплив навколишнього середовища (наприклад, низький рівень вологи), який, як відомо, впливає на різноманітність бактеріальних популяцій в Антарктиді [52], впливає і на віруси. Метагеномне порівняння вірусних взаємодій (лише одно- та дволанцюгові ДНК-віруси) у поверхневих ґрунтах Антарктичних сухих долин Мак-Мердо [128,143] показало, що бактеріофаги становили більшість ідентифікованих вірусів, включаючи представників всіх родини *Caudovirales*. Фаги *Mycobacterium* були найбільш широко представлені у вірусній популяції [127]. Методом мікрочипового аналізу виявлено ще більшу різноманітність фагів, зокрема РНК-бактеріофагів з родини *Leviviridae*, дволанцюгових ДНК-фагів з родини *Microviridae* та одноланцюгових ДНК-фагів тективірусів [129]. Загалом ці спостереження свідчать про важливу роль фагів у структурах та функціях мікробних популяцій.

Наявність активних бактеріофагів у мікробних популяціях призводить до еволюції систем захисту у бактерій [130]. Було виявлено різноманітний спектр

механізмів захисту бактерій від фагів [131,132]. Серед механізмів захисту розрізняють: адаптивні елементи імунітету, такі як системи CRISPR-Cas, та вроджені механізми імунітету, такі як система рестрикцій-модифікацій (RM) та токсин-антитоксинова система (Abi) [56]. Нещодавні дослідження виявили нові захисні системи, які широко розповсюджені серед таксонів бактерій і, як вважають, відіграють певну роль у стійкості до фагів [11,24,128,133]. Сюди входять система виключення бактеріофагів (BREX), кодована кластером генів від 4 до 8, що забезпечує стійкість до хвостатих фагів *Siphoviridae* та *Myoviridae* шляхом інгібування реплікації фагової ДНК [134]. Та інші менш охарактеризовані системи, такі як Thoeris, Shedu та елементи Gabija, що підвищують стійкість бактерій до певних груп фагів [133].

Поєднуючи цінні докази різноманітності та поширеності фагів у ґрунтах, зрозуміло, що взаємодія фага-хазяїн відіграє важливу роль у формуванні структури бактеріальних популяцій у цих середовищах [77].

1.4. Екологічні аспекти поширення мікроорганізмів Антарктичного регіону

Хоча більшість континентальної Антарктиди постійно покрита крижаним покривом, приблизно 0,35% континенту залишається вільним від льодового та снігового покриву декілька місяців або весь рік [135]. Непокриті льодом прибережні райони, можуть бути, як багатими на поживні речовини, так і оліготрофними, особливо у пустельних районах континенту. Хоча більшість середовищ в Антарктиді характеризуються екстремальними екологічними умовами, ґрунти заселені різноманітними бактеріальними популяціями. Ці популяції пристосовані до місцевості, і, як правило, відображають фізико-хімічні та біологічні особливості ґрунтів. Умови навколишнього середовища стрімко змінюються в багатьох районах Антарктиди, це пов'язано зі збільшенням активності людини на континенті та наслідками зміни клімату [136].

Суворі екологічні умови континентальної Антарктиди сформували ґрунтові екосистеми з низьким різноманіттям і простою трофічною структурою. Низька доступність води та поживних речовин, надзвичайно низькі температури, часті цикли заморожування-відтавання, періоди тривалої темряви взимку та вплив високого рівня ультрафіолетового випромінювання влітку створюють важкі умови для виживання мікроорганізмів [136].

Бактерії антарктичних ґрунтів були предметом багатьох досліджень з 30-х років [137]. У 60-х роках було культивовано та описано багато штамів бактерій [138]. Однак ці штами, ймовірно, представляють лише незначну частку бактерій, які вдалося культивувати [139]. Застосування молекулярних методів значно збільшило кількість проаналізованих бактерій і виявило, що бактерії різноманітніші та поширені більше, ніж вважалось раніше [73,109,136,139–141].

Якщо розглядати території, які не покриті льодом, то можна їх розділити на п'ятнадцять географічно різних регіонів. Цей розподіл зроблений на основі експертної думки та наявної екологічної та біологічної інформації [142]. Оскільки багато з цих біорегіонів не були добре охарактеризовані з точки зору мікробіології, Ерік Боттос та Джошуа Скарроу, запропонували їх об'єднати у п'ять регіонів (рис. 1.2) [144]. На карті представлено п'ять регіонів: Антарктичний півострів, Західна Антарктида, Трансантарктичні гори, Земля Вікторія та Східна Антарктида.

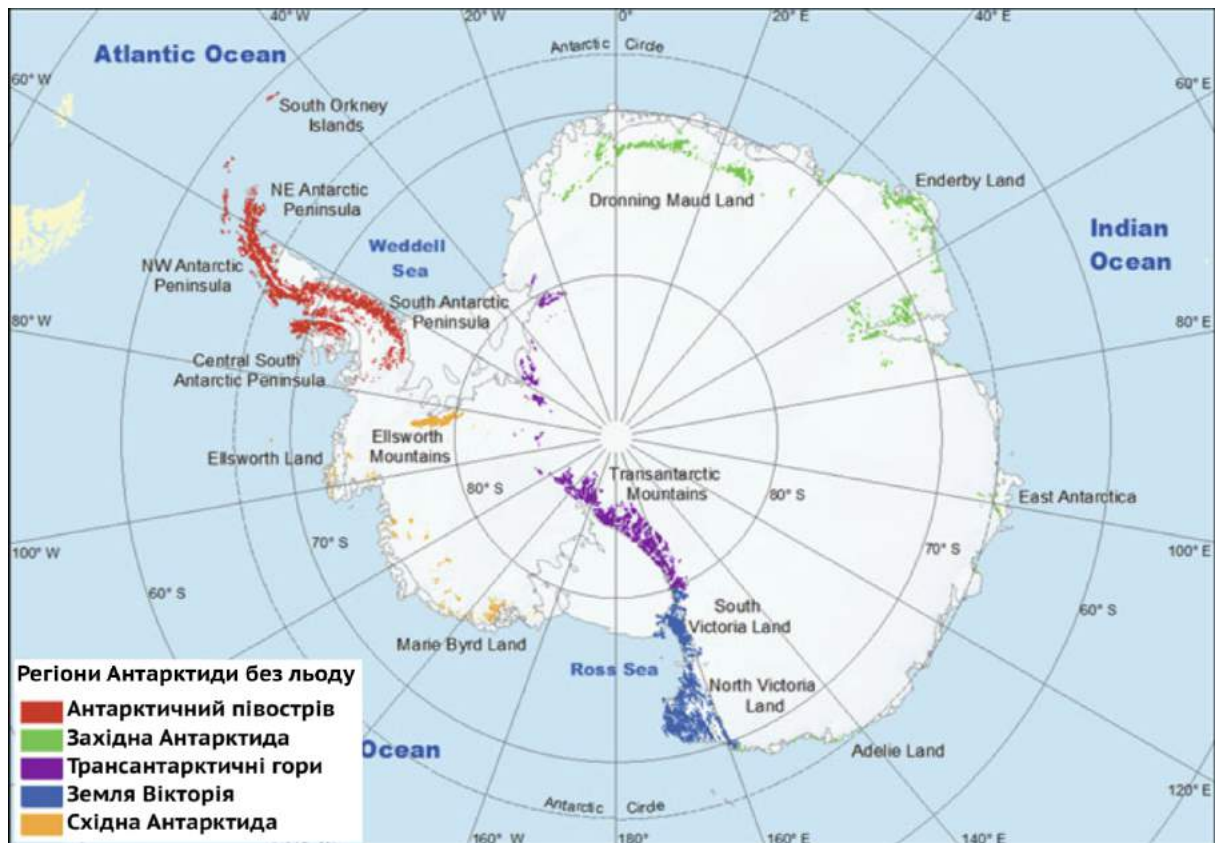


Рис. 1.2. Карта Антарктиди, що вказує на наземні антарктичні біогеографічні регіони вільні від льодового покриву [144]

Найбільші простори незамерзаючих земель знаходяться у регіонах Земель Вікторії, Трансантарктичних горах та Антарктичному півострові, тоді як регіони не вкриті льодом Східної та Західної Антарктиди значно менші за площею. Українська антарктична станція «Академік Вернадський» розташована на мисі Марина острова Галіндез за 7 км від західного узбережжя Антарктичного півострова, відповідно частини земної поверхні неподалік від станції не вкриті льодом.

Ґрунти між регіонами можуть бути досить неоднорідними. Фізико-хімічні та біологічні показники ґрунту залежать від п'яти основних факторів: часу, клімату, рельєфу, елементного складу та організмів-резидентів [145]. рН, наявність поживних речовин, вміст вуглецю – є результатом етапів розвитку ґрунту з

гірських порід або покладів. Антарктичні ґрунти, як правило, є грубозернистими пісками з мінімальною кількістю поживних речовин [146].

В різних регіонів континенту зустрічаються кілька бактеріальних типів, включаючи *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Deinococcus-Thermus*, та *Cyanobacteria*, хоча відносна чисельність цих груп в ґрунтах різниться. Багато досліджень також повідомляють про домінуючі філотипи [147–149], хоча для помірних ґрунтів характерне більш рівномірне розселення філотипів.

Оскільки українська антарктична станція «Академік Вернадський» розташована в регіоні Антарктичного півострова, розглянемо екологічні закономірності поширення бактерій. Ґрунти Антарктичного півострова розвивалися в найбільш сприятливих кліматичних умовах на континенті. За середньорічних температур від 0 до - 12°C та середньорічних опадів 200–1000 мм водного еквівалента [150], ці «прибережні оазиси» надзвичайно теплі та вологі в умовах Антарктики. Біологія півострова також суттєво відрізняється від біології внутрішньої частини континенту, оскільки безхребетні та рослини поширені на півострові майже відсутні в інших регіонах Антарктиди [151]. Більша доступність води в прибережних ґрунтах дозволяє накопичувати значну кількість органічних речовин [150]. Утворення торфу з моху є відносно характерною рисою для півострова, ґрунти, що утворюються на торфі, часто сильно кислі [150]. Хімічні та біологічні процеси сприяють розвитку ґрунту порівняно з іншими районами Антарктиди (хоча розвиток ґрунту все ще є слабким у глобальному контексті) і дозволяють накопичувати, переробляти та утримувати поживні речовини.

Популяції бактерій були досліджені по всьому ареалу Антарктичного півострова, що дозволило вивчити тенденції різноманітності. Встановлено, що різноманітність бактерій зменшуються із збільшенням широти вздовж півострова [152]. Подібних тенденцій з широтою не спостерігалось при дослідженні рослинності, що свідчить про те, що вплив кліматичного стресу на бактеріальні популяції пом'якшується завдяки стабільній температурі, наявності води та

поживних речовин [152]. Рослинність, аналогічним чином, може впливати на чисельність бактерій, оскільки виявлено, що кількість бактерій збільшується на рослинних ґрунтах порівняно з нерослими ділянками [70].

На більшій частині півострова в ґрунтах переважають *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, та *Verrucomicrobia*. Найбільша кількість протеобактерій, які належать до *Alpha*, *Beta*, *Delta*, та *Gamma* класів [152]. Дослідження ґрунту показали, що *Actinobacteria*, *Epsilon-proteobacteria* і *Verrucomicrobia* зменшуються із збільшенням широти, тоді як представництво *Cyanobacteria* зростає [70]. Крім того, виявилось, що представники *Acidobacteria* зменшуються із збільшенням широти. Кілька типів бактерій суттєво впливали на фізико-хімічні характеристики ґрунту, зокрема *Chloroflexi* та *Betaproteobacteria* негативно корелювали з рН, тоді як *Firmicutes* та *Verrucomicrobia* позитивно корелювали з рН. *Chloroflexi* та *Planctomycetes* позитивно корелювали з ґрунтовою водою, вмістом органічних речовин та азотом у ґрунті, а *Betaproteobacteria* позитивно корелювали з ґрунтовим азотом та нітратами [152]. Загалом мікробіологічний аналіз ґрунту на територіях розташування української антарктичної станції «Академік Вернадський» потребує подальшого детального вивчення.

Отже, актуальним з точки зору фундаментальної науки є вивчення закономірності розповсюдження та функціонування вірусних популяцій. Біорізноманіття вірусів ґрунтових біотопів Антарктиди є маловивченим. Глобальне потепління робить актуальним вивчення екологічних наслідків танення льодовиків вічної мерзлоти. Оскільки існує можливість появи нових небезпечних інфекцій невідомої природи, внаслідок активації давньої мікрофлори, а також перенесення бактеріофагами факторів вірулентності, що зберігаються в їх геномі. Найхолодніший континент Земної кулі - Антарктида є важливим об'єктом для досліджень.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Відбір зразків бактерій та бактеріофагів

Зразки ґрунту були зібрані під час 19 – 23-ої Української антарктичних експедицій (2015 – 2019 роки) в околицях Української антарктичної станції (УАС) «Академік Вернадський» (колишня станція Великобританії «Фарадей») (рис. 2.1).

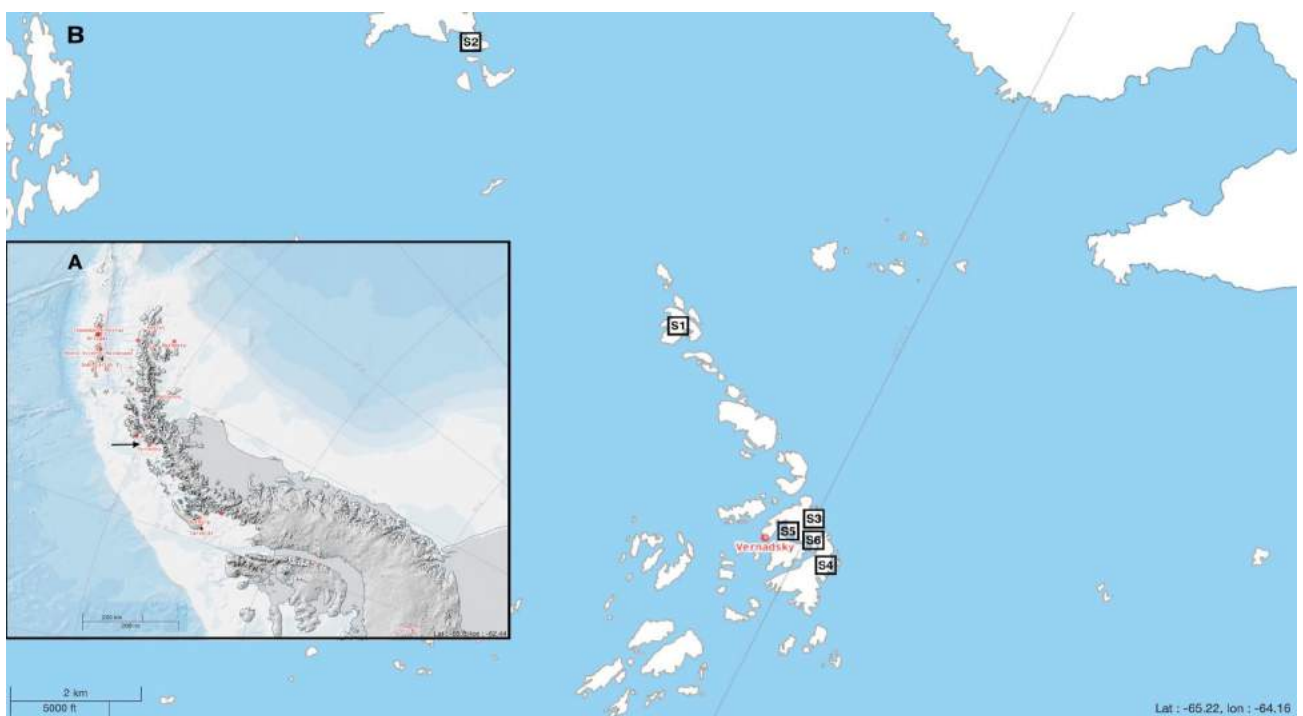


Рис. 2.1. Місцезнаходження Української антарктичної станції (Академік Вернадський) (позначене стрілкою) на Аргентинських островах (А) та місця відбору проб на островах Ірізар, Пітерманн та Галіндез (В) (S1-S6 – номери зразків). Географічні координати див. у таблиці 2.1. Карта створена за допомогою SCAR Antarctic Digital Database та Antarctic Digital Database map view resource (<https://www.add.scar.org/>)

Відбір зразків проводився на еталонних точках відбору. З кожної ділянки відбору проб, відібрано по чотири аліквоти 50г ґрунту (з глибини 0–5 см) з площі приблизно 1 м². Усі точки були позначенні географічними координатами, що

дозволяло більш точний та контрольований збір матеріалу. Місця відбору зразків наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1.

Місцезнаходження та тип відібраних антарктичних зразків із яких було виділено мікроорганізми

№ зразку	Місце відбору	Тип зразку
1	о. Ірізар, S 64.197222°, W 64.197222°	грунт + незначна кількість мілкої, скельної породи
2	о. Пітерманн S 65.176389°, W 64.138889°	грунт
3	о. Галіндез, схил куполу, скеля S 65.248170°, W 64.245029°	грунт + незначна кількість мілкої, скельної породи
4	о. Зимовий, скеля Ворді S 65.25109°, W 64.25487°	грунт + лишайники та мох
5	о. Галіндез, «Карпати» S 65.24607°, W 64.24998°	грунт + мох
6	о. Галіндез, схил купола Говоруча S 65.24823°, W 64.24467°	грунт

Зразки переносили в стерильні пробірки Falcon (Chongqing New World Trading Haimen, Китай) і зберігали при температурі нижче 0°C під час транспортування, а потім при - 10°C у лабораторії.

Для дослідження біорізноманіття бактеріофагів Антарктичного регіону, окрім вище згаданих зразків, з яких було виділено мікроорганізми, проводився відбір зразків на інших територіях (додаток А). Відібрані зразки ґрунту з переліку додатку А використовувались виключно для пошуку бактеріофагів.

2.2. Поживні середовища, хімічні реактиви та буферні розчини використані у роботі

Поживний бульйон Difco Nutrient Broth (Becton Dickinson, США) (NB), г/л: м'ясний екстракт – 3 г, пептон – 5 г; для приготування розчиняли 8 г порошку в 1 л дистильованої води, автоклаувати при 121°C протягом 15 хвилин.

Difco Reasoner 2A агаром (R2A), г/л: дріжджовий екстракт – 0,5 г, пептон №3 – 0,5 г казамінова кислота – 0,5 г декстроза – 0,5 г, крохмаль – 0,5 г, натрій піруват – 0,3 г, калій ортофосфат – 0,3 г, магній сульфат – 0,05 г, агар – 15,0 г; для приготування необхідно розчинити 18,2 г порошку в 1 л дистильованої води, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, автоклаувати при 121°C протягом 15 хвилин.

Beef extract agar (BEA, HiVeg), г/л: пептони сухий ферментативний – 10 г, натрій хлор – 5 г, агар – 13 г, м'ясний екстракт (з м'яса великої рогатої худоби) – 10 г; для приготування необхідно розчинити 38 г порошку в 1 л дистильованої води, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, автоклаувати при 121°C протягом 15 хвилин.

Trypticase-soy агаром (TCA, Sigma), г/л: панкреатичний гідролізат казеїну – 15 г, папаїновий гідролізат соєвого борошна – 5 г, натрій хлорид – 5 г, агар – 15 г, рН 7,3 ± 0,2; для приготування необхідно розчинити 40 г порошку в 1 л дистильованої води, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, автоклаувати при 121°C протягом 15 хвилин.

Nutrient агаром (NA, Sigma), г/л: пептон – 5 г, екстракт яловичини – 3 г, агар – 15 г; для приготування необхідно розчинити 23 г порошку в 1 л дистильованої

води, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, до повного розчинення, автоклавувати при 121°C протягом 15 хвилин.

Malt extract агаром (MEA, Merck KGaA, Germany), г/л: мальтоза – 12,75 г, декстрин – 2,75 г, гліцерин – 2,35 г, пептон – 0,78 г, агар – 15 г; для приготування необхідно розчинити 33,6 г порошку в 1 л дистильованої води, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, до повного розчинення, автоклавувати при 118°C протягом 10 хвилин.

MacConkey агаром (Sigma), г/л: підшлунковий гідролізат желатину – 17 г, моногідрат лактози – 10 г, натрій хлор – 5 г, пептони (м'ясо і казеїн) – 3 г, жовчні солі – 1,5 г, нейтральний червоний – 0,03 г, кристал Вайолет – 0,001 г, агар – 13,5 г; для приготування необхідно розчинити 50 г порошку в 1 л дистильованої води, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, до повного розчинення, автоклавувати при 121°C протягом 15 хвилин.

Potato-glucose агаром (PDA – Potato Dextrose Agar, Sigma), г/л: Глюкоза – 20,0 г, картопляній відвар (концентрований) – 4,0 г, агар – 15,0 г, рН: $5,6 \pm 0,2$; для приготування необхідно розчинити 39 г порошку в 1 л дистильованої води, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, до повного розчинення, автоклавувати при 121°C протягом 15 хвилин.

King A середовище (KA medium, HiMedia Laboratories Pvt. Limited, India), г/л: підшлунковий гідролізат желатину – 20 г, калій сульфат – 10 г, магній хлорид – 1,4 г, агар – 13,6 г. для приготування необхідно розчинити 45 г порошку в 1 л дистильованої води та додати 10 мл гліцерину, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, до повного розчинення, автоклавувати при 121°C протягом 15 хвилин.

King B середовище (KB medium, HiMedia Laboratories Pvt. Limited, India), г/л: пептонова суміш – 20 г, калій ортофосфат – 1,5 г, магній сульфат – 1,5 г, агар – 14 г; для приготування необхідно розчинити 37 г порошку в 1 л дистильованої води та додати 10 мл гліцерину, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, до повного розчинення, автоклавувати при 121°C протягом 15 хвилин.

Барвників за Грамом (Merck KGaA, Німеччина): генціановий фіолетовий карболовий (генціанвіолет), який виступає первинним барвником; розчин Люголя (йодний розчин); основний барвник розчин сафраніну; відмивальний розчин, матеріал для знебарвлення (етиловий спирт + диметилкетон).

Середовища глюкози Hugh Leifson OF, г/л: глюкоза – 10 г, натрій хлорид – 5,0 г, агар – 2,0 г, ферментативних перевар тваринної тканини – 2,0 г, калій гідрофосфат – 0,3 г, бромтимоловий синій – 0,05 г; розчинити 19,35 г середовища в 1 л дистильованої води. Обережно підігріти до повного розчинення часток середовища, автоклаувати при 121°C протягом 15 хвилин.

Тіогліколеве середовище, г/л: гідролізат казеїну – 15,0 г, дріжджовий екстракт – 5,0 г, глюкоза – 5,5 г, натрій хлорид – 2,5 г, L-цистин – 0,5 г, натрій тіогліколят - 0,5 г, резазурін - 0,001 г, агар-агар – 0,75 г, рН = 7,1 ± 0,2; для приготування необхідно розчинити 29,75 г порошку в 1 л дистильованої води, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, до повного розчинення, автоклаувати при 121°C протягом 15 хвилин.

Motility Test Medium (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Індія), г/л: триптоза – 10 г, натрій хлорид – 5 г, агар – 5 г, рН = 7.2 ± 0.2; для приготування необхідно розчинити 29,75 г порошку в 1 л дистильованої води, довести до кипіння та кип'ятити протягом 1 хв, до повного розчинення, автоклаувати при 121°C протягом 15 хвилин.

M9, г/л: натрій гідрогенортофосфат, г/л: – 6 г, калій гідрогенортофосфат - 3 г, амоній хлорид – 1 г, агар-агар – 15 г, дистильована вода – 944 мл. Після автоклаування додавали: 10 мл 0,01М розчину кальцій хлориду, 1 мл 1М розчину магній сульфату, 5 мл 40% розчину глюкози; 40 мл 10% розчину желатину; рН = 7,0.

Фосфатно-сольовим буфером (PBS): 8,0 г – натрій хлорид, 0,2 г – калій хлорид, 1,44 г – натрій гідрогенортофосфат, 0,24 г – калій гідрогенортофосфат розчиняють в 800 мл дистильованої води, доводять рН до 7,4 хлоридно кислотою або натрій гідроксидом, додають дистильованої води до 1 літра.

Tris-EDTA (TE): буфер складається з 10 мМ трис-НСl, 1 мМ динатрієвої солі ЕДТА, рН 8,0. Для приготування 100 мл розчину буфера TE використовують деіонізовану воду, 1 мл 1 М Tris-НСl і 200 мкл 0,5 М ЕДТА.

2.3. Культивування та характеристика бактерій

Виділення та очистку бактеріальних культур проводили в ламінарному боксі. Для виділення мікроорганізмів 2 г ґрунту / субстрату ресуспендували в 10 мл стерильного 0,9% розчину NaCl і перемішували на вортексі протягом 30 с.

Надосадову рідину послідовно розводили (10^{-1} – 10^{-6}) і додавали до 100 мл стерильного 1/100 розведеного (0,08 г на літр) поживного бульйону Difco Nutrient Broth і ретельно перемішували [153].

Потім 1 мл отриманої суміші розливали на чашки Петрі, кожна з яких попередньо була залита різними типами агару (1,5%), зокрема TSA, NA, MPA, MEA, KGA, R2A агаром, Кінг А середовищем та Кінг В середовищем. Вибір поживних середовищ зроблено на основі досліджень, у яких проводили виділення бактерій Антарктичного регіону [153–158]. Культивування антарктичних мікроорганізмів проводили при різних температурах від -7°C до $+40^{\circ}\text{C}$ (-10°C , -7°C , -4°C , 0°C , $+4^{\circ}\text{C}$, $+10^{\circ}\text{C}$, $+16^{\circ}\text{C}$, $+19^{\circ}\text{C}$, $+25^{\circ}\text{C}$, $+28^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$, $+40^{\circ}\text{C}$) у темряві до 5 тижнів. Щоб уникнути осушення агару, чашки інкубували всередині поліетиленових пакетів [154,156]. Колонії бактерій були відібрані на основі їх відмінності у морфологічних характеристиках, щоб уникнути виділення подібних колоній, що утворювались на чашках одночасно. Для відокремлення різних за морфологією колоній, їх переносили на нові стерильні тверді середовища залиті у чашки. Потім чашки інкубували при температурі $+20^{\circ}\text{C}$ у темряві протягом 24 годин (експериментально було доведено, що ці умови інкубації є оптимальними). Після виділення бактеріальні колонії повторно наносили на тверді середовища у чашках із розведенням 1/100 та 1/10 (у 10 разів менше розведення) для оцінки переваг росту. Там, де це було можливо, бактерії культивували в рідкому бульйоні

1/10 та 1/100 для отримання біомаси, необхідної для подальшої роботи. Однак багато ізолятів не розмножувалися в рідких середовищах. У такому випадку колонії залишали для росту на чашках Петрі [157].

Цитологічне дослідження отриманих бактерій проводили шляхом нанесення їх на покривні скельця з подальшим фарбуванням за Грамом із використанням набору барвників за Грамом згідно інструкцій виробника [159, 160]. Морфологію бактеріальних клітин та спор вивчали за допомогою бінокularного мікроскопа Primo Star (Німеччина) при малому (x40) та великому (x100) збільшенні. Для великого збільшення використовували емерсійне масло [161]. Фотографії пофарбованих за Грамом мікроорганізмів та вимірювання необхідних параметрів (діаметр клітини та спори, відстань між клітинами тощо) проводили за допомогою морфометричної комп'ютерної програми Axio Vision 4.8 та бінокularного мікроскопа PrimoStar Carl Zeiss (Німеччина).

Ідентифікацію ізольованих бактерій проводили з використанням мікробіологічного аналізатора VITEC 2 compact (bioMérieux, Inc.) відповідних ID-карток для грампозитивних, грамнегативних та спороутворювальних бактерій (GP-, GN-, BCL-картки, відповідно). В роботі застосовували також тест-системи Mikro-La-Test (Erba Lachema, Чехія), дотримуючись інструкцій виробника [162].

Визначення здатності ізольованих антарктичних мікроорганізмів до аеробного дихання, або бродіння проводили методом OF-тесту із застосуванням середовища, що містять глюкозу Hugh Leifson OF [163]. Визначення наявності у дихальному ланцюзі ізольованих бактерій термінальної цитохром с-оксидази проводили за допомогою тест-системи Batident Oxidase (Merck KGaA, Німеччина), як було описано раніше [164], з додаванням відповідних реагентів tetramethyl-*p*-phenylenediamine та dimethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, DMPD) до середовища. Визначення здатності ізольованих антарктичних мікроорганізмів до нітратного дихання (тест на нітрат редукцію) проводили за допомогою нітратного бульйону та реагенту Грисса [165]. Молекулярний вплив кисню на бактерії вивчали за допомогою тіогліколевого середовища [166]. Для

проведення тестів на утворення антарктичними мікроорганізмами каталази використовували 3% розчин гідроген пероксиду [167]. Рухливість бактерій визначали за допомогою середовища Motility Test Medium [168,169]. Здатність досліджуваних бактерій утворювати розчинні пігменти визначали за допомогою середовищ King A (*Pseudomonas* agar (для флуоресцеїну)) та King B (*Pseudomonas* agar (для піоціаніну)) середовищ (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, India) [170]. Здатність бактерій гідролізувати желатин визначали за допомогою сольового середовища M9 з 0,4% желатину. Гідроліз желатину оцінювали за наявністю зон просвітлення навколо колоній мікроорганізмів [171].

Для одного з виділених бактеріальних консорціумів проводили висіви бактеріальної культури для отримання чистих ліній. Готували суспензію по стандарту 5 одиниць ($5 \cdot 10^8$ КУО/мл); 1мл суспензії вносили в 99 мл фізіологічного розчину, ставили на шейкер на 1 годину, отримуючи розведення $5 \cdot 10^6$ КУО/мл. Отриману суспензію розводили до $5 \cdot 10^4$ КУО/мл, вносячи 1 мл суспензії в 99 мл фізіологічного розчину; ставили на шейкер на 40 хвилин. Після двох етапів відмивки робили 10-кратні розведення отриманої суспензії. Суспензію в об'ємі 1 мл з кінцевим розведенням 5 КУО/мл та 50 КУО/мл висівали на МПА та інкубували при температурі 28°C. Ріст колоній фіксували різними кольоровими маркерами на 1 та 2 добу. Після чого проводили опис колоній, що візуально відрізнялись, фарбували по Граму та відсівали на тверді поживні середовища.

2.4. Флуоресцентна мікроскопія

Під час культивування бактерій, один із зразків виявився консоціумом бактерій (Cq13), саме для нього було здійснено фарбування барвником DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) та проведено флуоресцентну мікроскопію, для того щоб з'ясувати, чи є в консорціумі еукаріотичні клітини. DAPI – вітальний барвник, що зв'язується з малою бороздкою ДНК. При обробці еукаріотичних клітин, в тому числі дріжджів, візуально добре видно ядерну ДНК та мітохондріальну. При фарбуванні даним барвником прокаріот – профарбовується

вся клітина, оскільки вони не мають чітко оформлених органел з НК. DAPI є широко використовуваним флуоресцентним зондом. Він специфічно зв'язується з дволанцюговими ділянками ДНК, багатими АТ парами. Після зв'язування з ДНК інтенсивність її флуоресценції зростає у двадцять разів. Це пов'язано з тим, що флуоресценція перестає інгібуватися молекулами води [172].

Для фарбування бактеріального консорціуму використовували розчин DAPI у концентрації 5 мкг/мл. Суміш інкубували при температурі 4°C протягом 30–60 хвилин у темряві, а потім перемішували протягом 30 с. Аліквоту пофарбованого зразку (5 мкл) поміщали на предметне скло і накривали покривним скельцем. Надалі проводили флуоресцентну мікроскопію (BX53, Olympus Corporation, Токіо, Японія) для детекції бактеріальних клітин [173].

2.5. Індукція помірних фагів

Для перевірки виділених бактеріальних ізолятів на наявність профагів використовували два методи, а саме індукцію ультрафіолетом та індукцію налідиксовою кислотою (20 мкг/мл) (Nal-кислота). Дана перевірка є обов'язковою, оскільки у разі позитивного результату, фаги зразків можуть не проявляти своїх інфекційних властивостей, або взаємодіяти з профаговими елементами.

Культуру бактерій наносили на чашки методом виснажливого штриха. Чашки Петрі опромінювали ультрафіолетовим промінням з довжиною хвилі 320 нм, від однієї до трьох годин. Після опромінення чашки інкубували в термостаті. Літичну активність індукованих фагів перевіряли методом двошарових агарів за Грація [174].

Для індукції Nal-кислотою нічну культуру бактерії, вирощену при + 20°C, додавали до 100 мл поживного бульйону (м'ясо-пептонний бульйон, Углич, Росія) 1,5% концентрації та вносили у колбу для проведення аерації. Після збільшення концентрації бактерій через 3-3,5 годин додавали 20 мкг/мл Nal-кислоти і залишали ще на 3 години при температурі 20°C з інтенсивною аерацією. Для

звільнення лізату від клітинних решток бактерій проводили низькошвидкісне центрифугування при 6000 об/хв. протягом 30 хвилин. Літичну активність індукованих фагів перевіряли методом двошарових агарів за Грація [175].

2.6. Виділення бактеріофагів із зразків

Зразки ґрунту гомогенізували у стерильних ступках з 0,1 М фосфатно-сольовим буфером, рН 7,4, при 4°C [176]. Отриманий супернатант центрифугували при 4000–5000 об/хв (низькошвидкісне центрифугування) протягом 20 хвилин за допомогою центрифуги OPTIMA L-90K (Beckman Coulter, Японія), а потім пропускали через бактеріальний фільтр 0,22 мкм (Chongqing New World Trading Haimen, Китай). Фагові частки концентрували центрифугуванням при 90000g (31000 об/хв) протягом 6 годин, при температурі 2°C – 4°C в стерильних 30 мл поліпропіленових пробірках Nalgene (Thermo Fisher Scientific, штат Массачусетс, США) за допомогою центрифуги OPTIMA L-90K. Потім осад з окремих пробірок послідовно ресуспендували наступним чином: кожен осад ресуспендували в 3 мл буфера TE, потім отриману суміш переносили в наступну стерильну пробірку, і знову ретельно ресуспендували в 1 мл буфера TE [133,177]. Після диференційного центрифугування підтвердження фагів у препаратах здійснювалося за допомогою електронної мікроскопії.

Для отримання “чистих ліній” бактеріофагів методом подвійних агарових шарів використовували тест культури бактерій. Пару фаг-хазяїн встановлювали експериментально, проводячи інфікування усіх виділених бактеріальних хазяїв. Якщо фаги утворювали негативні колонії на чашках, колонії виколювали та поміщали в окремі пробірки, заливаючи фізіологічним розчином. Для подальшої роботи фаги очищали методом виколювання бляшок, повторюючи дослід п'ять разів. Після вдалого отримання “чистих ліній” проводили накопичення вірусних частинок, для цього змішували 50 мл зразка фагу змішували зі 100 мл поживного бульйону (м'ясо-пептонний бульйон, Углич, Росія) 1,5% концентрації та 10 мл

суспензії з культурою бактерії-хазяїна, а потім інкубували протягом 6 годин при 20°C з постійною аерацією. Після отримання лізату, надосад зливали та пропускали через бактеріальні фільтри [178]. Для подальшого концентрування проводили диференційне центрифугування описане вище.

2.7. Титрування бактеріофагів

Титр кожного фага, виділеного із зібраних зразків, виражали у бляшкоутворюючих одиницях (БУО/мл) виконуючи серійні розведення фагових зразків та їх титрування методом двошарових агарів за Грація, як описано Sambrook and Russel [176]. Фаговий зконцентрований зразок (100 мкл) змішували з 200 мкл відповідної бактеріальної культури хазяїна (3×10^7 - 1×10^8 КУО / мл). Отриману суміш додавали до 4 мл верхнього 0,7% агару R2A (розплавленого та охолодженого до 35°C), обережно струшували та виливали в стерильну чашку Петрі, попередньо заповнену 10 мл твердого 1,5% агару R2A. Закриті чашки залишали до повного затвердіння протягом 10 хв при кімнатній температурі в стерильних умовах, а потім інкубували при 20°C у темряві до 24 годин у термостаті. Титр фага визначали за такою формулою (Adams, 1959):

$$T = (n/v)R$$

де T - титр фага, БУО/мл, n - кількість негативних колоній, v - об'єм суспензії фага, що наносився на чашку, мл (1 мл), R - кратність розведення (10^n).

2.8. Спектр літичної активності бактеріофагів

Системи фаг-хазяїн використовувались для вивчення взаємодії фагів та їх хазяїв, включаючи коєволюцію та передачу генів [2,179]. Система фаг-хазяїн дозволяє розмножувати фаги для аналізу їх параметрів росту, інтеграції (у випадку помірних фагів), а також для тестів на вивчення перехресного зараження на інших ізольованих бактеріальних хазяїнах [2,180].

Для визначення спектру літичної активності ізолюваних бактеріофагів щодо різних штамів мікроорганізмів ми використовували антарктичні бактерії, виділені в цьому дослідженні (7 ізолятів), та лабораторні бактеріальні ізоляти: *Clavibacter michiganensis*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *Serratia marcescens*, *Xanthomonas campestris* (9 ізолятів). Зразок фагу (100 мкл) змішували з 200 мкл бактеріальної культури (3×10^7 – 1×10^8 КУО / мл). Отриману суміш додавали до 4 мл верхнього 0,7% агару R2A (розплавленого та охолодженого до 35°C), обережно гомогенізували та виливали в стерильну чашку Петрі (Plastiques-Gosselin, Borre, France), попередньо залиту 10 мл 1,5% агару R2A (твердого). В якості негативного контролю використовували стерильне (без фагів та бактерій) середовище R2A. Чашки інкубували при 20°C протягом 1–14 днів. Літичну активність фагів доводили утворенням негативних колоній на чашках [181].

2.9. Трансмійна електронна мікроскопія

Трансмійна електронна мікроскопія (ТЕМ) для вивчення морфології бактеріофагів проводилась із застосуванням стандартних методик контрастування. Спочатку готували мідні сітки (Sigma, США) з покриттям формвару. Для цього предметне скло занурювали в ємність з формваром і висушували. Утворену плівку підрізали ножом, та обережно занурювали у воду таким чином, щоб плівка опинилася на поверхні води. На плівку викладали мідні сітки і за допомогою фільтрувального паперу знімали їх з поверхні води. Готові сітки висушували та зберігали у чашках Петрі, для запобігання потрапляння пилу. Потім сітки з покриттям занурювали в зразок, інкубували протягом 2-15 хв при кімнатній температурі й сушили на фільтрувальному папері протягом 1 хв. Після цього зразки контрастували. Принцип негативного фарбування полягає у нанесенні на

фагові частинки розчину солі металу з високою молекулярною масою, наприклад – уранілацетат [3,182]). Зразки, нанесені на сітки, фарбували 2,5% -м уранілацетатом рН 5,6 поротягом 30 секунд (Serva, Німеччина). Також використовували метод позитивного контрастування – 2% розчином фосфорновольфрамової кислоти (ФВК), рН 7,0. Подальші дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM 1400 (JEOL, Японія). Зразки були сфотографовані зі збільшенням 5000-60000x [183]. Розміри фагових частинок вимірювали у програмі Inkscape (<https://inkscape.org/ru/>)

2.10. Виділення ДНК

Екстракцію геномної ДНК фага проводили за допомогою модифікованого методу Promega Wizard. Особливістю методу є те, що ДНК можна виділити з неочищених лізатів фагів. Лізати є «брудними», оскільки вони містять компоненти середовища, залишки клітинних стінок, джгутики, нуклеїнові кислоти, бактеріальні білки та деякі фагові білки, крім самого фага. Для виділення ДНК використано модифікований комерційний набір для екстракції ДНК, набір для очищення ДНК Promega Wizard (номер у каталозі Promega № A7280).

Як правило, 1 мл фагового лізату з титром 1×10^{10} містить близько 0,5 мкг фагової ДНК. Для виділення ДНК використовують 10 мл фазового лізату з високим титром. Залежно від титру фага та очікуваного розміру геному фага може використовуватися більша або менша кількість лізату (до 20 мл). Для виділення ДНК фагів з низьким титром можна використовувати до 20 мл лізату. При високому титрі можна використовувати 10 мл лізату або менше, інакше колонка буде перевантажена і засмічена. Колонки мають максимальну ємність близько 30 мкг ДНК.

Використані матеріали:

- набір для очищення ДНК Promega Wizard (№ A7280)
- фаговий лізат (10-20 мл, $> 10^9$ БУО/мл)

- розчин нуклеази (20 мг/мл ДНКази I, 20 мг/мл РНКази А)
- розчин для утворення осаду (30% мас./об. PEG-8000, 3М NaCl).
Приготування розчину для утворення осаду: у чистий флакон додати 110 мл ddH₂O та 35г NaCl. Додати 60г PEG-8000, закрити флакон і провортексувати. Флакон інкубувати на водяній бані з температурою 50-60°C протягом 2 год, періодично струшуючи. Після водяної бані охолоджуємо до кімнатної температури, періодично струшуючи. Розчин повинен бути прозорим або злегка мутним. Додаємо ddH₂O до 200 мл, залишаємо при кімнатній температурі.
- ресуспендаційний буфер (водний розчин 5 мМ MgSO₄)
- 80% ізопропанол
- стерильна вода
- пробірки для центрифуги об'ємом 50 мл
- стерильні пробірки для мікроцентрифугування об'ємом 1,5 та 2 мл
- шприц об'ємом 3 см³
- теплблок, 80 °C

Етапи виділення:

1. Фагові лізати пропускали крізь бактеріальні фільтри (0,45 або 0,22 мкм).
2. Вносили лізати у чисті пробірки для центрифуги. Додавали 0,5 мкл розчину нуклеази на 1 мл лізату (10 мкг/мл ДНКази або РНКази). Інкубували лізати при 37°C протягом 30 хв.
3. Додавали розчин для осадження до лізату 1 (розчин для осадження): 2 (лізат). Перемішували на вортексі. Інкубували на льоду 60 хв. Осад випадає краще, якщо інкубувати при 4 °C протягом ночі.
4. Центрифугували осаджений фаголізат 10 000 g, 4°C, 10 хв.
5. Обережно вилили супернатант так, щоб сформована гранула осаду залишилась на дні пробірки.
6. Осад ресуспендували у 500 мкл буфера (5мМ MgSO₄) за допомогою піпетмана.

7. Переносили ресуспендований осад у 1,5 мл пробірки для мікроцентрифуги.

8. Центрифугували протягом 5-10 сек для осадження нерозчинних частинок. Переносили супернатант до нової промаркованої пробірки для мікроцентрифуги на 2 мл.

9. Ретельно ресуспендували розчином для очищення, що міститься у наборі ProgaWizardkit. Для цього додавали 1 мл розчину до супернатанту фага. Перемішували, перевернувши пробірку 5-6 разів.

10. Маркерували пробірки для мікроцентрифуги об'ємом 1,5 мл для кожного препарату ДНК, ставили у підставку для пробірок із відкритою кришкою. Мініколонку Wizard поміщували в кожену пробірку.

11. Виймаємо поршень зі шприца об'ємом 3 мл, прикріплюємо циліндр шприца до мініколонки і залишаємо у штативі у стійці для пробірок. Поршень кладемо поруч на чистий паперовий рушник.

12. Вводили піпеткою суміш лізату в шприц. Вставляли циліндр і просували лізат в мініколонку. Продовжували натискати, поки вся рідина не просочиться. Повільна швидкість потоку зазвичай означає хороший вихід ДНК.

13. Від'єднували мініколонку від шприца і клали його назад у пробірку для мікроцентрифуги. Виймали поршень зі шприца, а потім знову прикріплювали циліндр шприца до мініколонки.

14. Промивали колонку, додавши до шприца 2 мл 80% ізопропанолу. Вставляли поршень шприца і просували ізопропанол через мініколонку. Продовжували натискати, поки вся рідина не просочиться.

15. Виймали шприц із мініколонки та викидаємо його.

16. Відкручували кришку нової пробірки для мікроцентрифуги об'ємом 1,5 мл, маркували її та поміщаємо туди мініколонку. Центрифугували протягом 2 хв при 13000 g.

17. Відкручували кришку нової пробірки для мікроцентрифуги об'ємом 1,5 мл, маркерували її та поміщали туди мініколонку. Поміщали пробірку +

мініколонку в мікроцентрифугу. Вводили 100 мкл води, попередньо нагрітої до 80 °С, у верхню частину колонки і центрифугували при 13000 g, протягом 1 хв, щоб елюювати ДНК. Перевіряли об'єм елюту після центрифугування. Якщо елюту менше 100 мкл, то додаємо ще 100 мкл нагрітої води і знову центрифугуємо.

18. Відкручували кришку нової пробірки для мікроцентрифуги об'ємом 1,5 мл, маркерували її. Переносили елюйовану ДНК із етапу 17 у нову пробірку. Видаляли мініколонку. Пробірку закривали кришкою та зберігаємо при -20 °С [185].

2.11. Секвенування ДНК бактеріофагів

На сьогоднішній день, найефективнішим методом визначення геномної послідовності ДНК фага є секвенування. Біоінформатичний аналіз послідовності генома фага дає інформацію про розмір геному, вміст гуаніну та цитозину (GC %), а також дає можливість передбачити топологію геному, спосіб упаковки, та гени що кодують білки [3,186].

Протягом останніх кількох років методи секвенування стрічко розвиваються. Досягненням у цій галузі є розробка портативного секвенсора MinION від Oxford Nanopore Technologies (ONT). ONT вимірює зміну іонного струму при проходженні ДНК через білкові нанопори, які вбудовані в спеціальну полімерну мембрану [187]. Для кожної групи нуклеотидів характерна певна зміна струму, при проходженні ДНК через коливання струму фіксуються, що і дає можливість секвенувати основи. Цей процес масивно-паралельного секвенування однієї молекули в режимі реального часу може безперервно зчитувати довжини > 100 кб із загальним виходом циклу > 10 Гб [188]. Оскільки цей пристрій дозволяє здійснювати пряме секвенування нативних ДНК та дозволяє уникати помилок при ПЛР, він має корисне застосування у ситуаціях коли ПЛР є неможливим, або ДНК об'єктів дослідження є чутливою до коливання температур.

MinION – це невеликий автономний пристрій для нанопорового секвенування. Він підключається до стандартного порту USB 3.0 на стаціонарному або портативному комп'ютері. Пристрій MinION працює на програмному забезпеченні MinKNOW. MinION був готовий до роботи після перевірки якості проточної комірки (Flow Cell) за допомогою програмного забезпечення MinKNOW (ONT). Бібліотеки секвенування ДНК були підготовлені відповідно до рекомендованого виробником протоколу. Для ONT використовували набір Ligation Sequencing Kit (LSK). Повнорозмірні сиквенси були отримані запуском Flongle на MinION. Flongle – це адаптер для MinION, який дозволяє здійснювати секвенування ДНК у реальному часі. Під час base-calling процесу вдалі спроби оцінюються “pass” або “fail”, в залежності від результату. Перевірка повнорозмірних сиквенсів *de novo* була перевірена за допомогою програм Pomoxis (<https://nanoporetech.github.io/pomoxis/>), Medaka (<https://github.com/nanoporetech/medaka>) та Unicycler (<https://github.com/rrwick/Unicycler>). Pilon 1.23 (<https://github.com/broadinstitute/pilon>) був використаний для виправлення помилок. При вдалому секвенуванні були отримані послідовності, які за розмірами відповідали фаговим геномам, сиквенси були додатково перевірені вручну.

2.12. Біоінформатичний аналіз

Анотація фагових геномів складається з декількох етапів, а саме пошуку відкритих рамок зчитування, ідентифікації генів та білків, пошук консервативних доменів білків, Rho-термінаторів та тРНК генів. Для здійснення біоінформатичного аналізу використовувались онлайн та десктоп програми, зокрема:

GeneMark.hmm (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>) – програма для пошуку відкритих рамок зчитування та прогнозування генів [189].

Glimmer (<http://ccb.jhu.edu/software/glimmer/index.shtml>) – програмне забезпечення, що використовується для ідентифікації ORF. Програма використовує алгоритм Маркова, що відрізняється від того, що використовує програма GeneMark.hmm [133].

Для більшої достовірності при пошуку відкритих рамок зчитування використовувались обидві програми, вручну порівнювались та аналізувались отримані дані.

BLASTp та BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) – програми для функціональної анотації білкових та нуклеотидних послідовностей. Використовувались для ідентифікації гомологічних послідовностей у вже відомих бактеріофагових геномах.

ExPASy (<https://web.expasy.org/blast/>) – бази даних ExPASy включають такі інструменти аналізу: SWISS-PROT, TrEMBL, SWISS-2DPAGE, PROSITE, ENZYME, SWISS-MODEL. Програма виконує пошук подібних білкових послідовностей, прогнозує посттрансляційні модифікації, аналізує первинну, вторинну та третинну структури білків, а також вирівнює гомологічні послідовності [190].

VIRIDIC (<http://rhea.icbm.uni-oldenburg.de/VIRIDIC/>) – програма, яка використовує алгоритм, який затвержений Міжнародним комітетом з таксономії вірусів (ICTV), підкомітетом з бактеріальних та архейних вірусів для розрахунку міжгеномної подібності вірусів [191].

CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) - використовували для пошуку консервативних доменів білків [192].

tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) – програма виконує пошук транспортних РНК, які є некодуєчими РНК та універсальними для всіх живих організмів [193].

ARAGORN (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/ARAGORN/>) – так само, як і tRNAscan-SE виконує пошук тРНК генів, але з використанням іншого алгоритму [194].

ARNold (<http://rssf.i2bc.paris-saclay.fr/toolbox/arnold/>) – програма виконує пошук термінаторів [195].

Unipro UGENE (<http://ugene.net/ru/>) – програму використовували для аналізу, візуалізації та редагування нуклеотидних послідовностей [196].

STATISTICA та Microsoft Excel – використовували для статистичної обробки результатів досліджень.

2.13. Філогенетичний аналіз

За останнє десятиліття секвенування геномів стало ефективним способом дослідження широкого спектру біологічних систем – від масштабних досліджень біологічного різноманіття до розуміння еволюції та походження патогенних організмів, зокрема вірусів. Програмне забезпечення "Молекулярний еволюційний генетичний аналіз" (MEGA) надає інструменти для проведення досліджень, які включають програми для вирівнювання послідовностей, створення еволюційних дерев, оцінки генетичних відстаней та різноманітностей, встановлення еволюційного походження [197].

На відміну від клітинних організмів, у фагів не існує "універсального" гена, який би можна було використати як молекулярний маркер для встановлення філогенетичних зв'язків [198,199]. Як наслідок, гени що кодують білки, такі як велика субодиниця терміназа, основний капсидний білок, білки хвостового відростка та ДНК-полімераза, можуть бути використані для побудови філогенетичних дерев [198].

Основний капсидний білок та білок базальної пластинки використані для філогенетичного аналізу одного фага та велика субодиниця термінази для іншого. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей здійснено у програмі MEGAX за алгоритмом Clustal W. Для побудови філогенетичного дерева використано алгоритм Neighbour-Joining (Bootstrap = 1000).

Для порівняння кількох геномних послідовностей у декількох фагів використано програму Easyfig. У програмі можливо проводити попарні вирівнювання нуклеотидних послідовностей між кількома геномами, візуалізувати та забарвлювати окремі гени [200].

Геномні послідовності *Pseudomonas phage UA*Antarctica та *Pseudomonas phage UA*Vern депоновано через BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?form=history&session=new&tool=genbank>) в публічну базу даних GenBank під номерами доступу MZ605292 та MZ605293, відповідно.

2.14. Статистична обробка одержаних результатів

Одержані цифрові дані підлягали математичній обробці методом варіаційної статистики за допомогою двох величин: середньому значенню або дисперсії [184] з використанням прикладних програм Microsoft.

Середнє арифметичне, або просто середнє значення розподілення, рахується по формулі

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N},$$

де \bar{X} – середнє, $\sum X$ – сума індивідуальних значень у всіх особин вибірки, а N – число особин.

Дисперсією називається частка від ділення суми квадратів відмінних між індивідуальними значеннями та середнім його значенням на величину, яка на одиницю менше числа індивідуумів у виборці:

$$S^2 = \frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1};$$

Де S^2 – дисперсія, а всі останні символи мають те ж значення, що і в попередній формулі: X – індивідуальне значення, \bar{X} – середнє значення, N – число індивідуумів.

Дисперсію підраховували за допомогою формули, математично еквівалентній попередній:

$$S^2 = \frac{\sum X^2 - N\bar{X}^2}{N - 1}.$$

Дисперсія вимірюється в квадратних одиницях, оскільки виражається через суму квадратів відхилень від середнього. Щоб оцінити ширину розподілення в тих же одиницях, що і його середнє значення, використовують середньоквадратичне, або стандартне відхилення, яке визначається просто як квадратний корінь із дисперсії:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}}, \text{ де } S \text{ – стандартне відхилення.}$$

РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ІНДИКАТОРНИХ БАКТЕРІАЛЬНИХ КУЛЬТУР

Мікробіологічне різноманіття поблизу УАС “Академік Вернадський” представлене традиційними таксонами, поширеними в різноманітних регіонах землі з помірним кліматом: *Bacillus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium* тощо [201]. Загальна кількість хемоорганотрофних аеробних мікроорганізмів на 2-3 порядки менша ніж в регіонах з помірним кліматом, та становить 10^5 - 10^8 клітин/г зразку. Кількість мікроорганізмів в різних біотопах становить (клітин/г зразку): ґрунт (1×10^6 – 5×10^7), трава *Deschampsia antarctica* (10^6 – 10^8), підземна частина моху (1×10^6 – 5×10^8), мул прісноводної водойми (10^5 – 10^7), надземна частина моху (10^3 – 10^6), лишайники (10^3 – 10^6) [202]. Для вивчення біологічних властивостей фагів обов’язковим етапом є встановлення бактерій хазяїв. Тому розділ дисертації присвячено характеристиці бактеріальних культур, виділених із біотопів Антарктичного регіону. Вивченню мофролого-культуральних, біохімічних особливостей, оптимальних температур росту бактерій, а також їх таксономічну належність.

3.1. Температурні оптимуми культивування бактерій

Для встановлення температурних оптимумів, бактерії вирощували при різних температурах: від -7°C до $+40^\circ\text{C}$ (-10°C ; -7°C ; -4°C ; 0°C ; $+4^\circ\text{C}$; $+10^\circ\text{C}$; $+16^\circ\text{C}$; $+19^\circ\text{C}$; $+25^\circ\text{C}$; $+28^\circ\text{C}$; $+37^\circ\text{C}$; $+40^\circ\text{C}$) (Таблиця 3.1). Температури росту (мінімальні, оптимальні та максимальні) визначали для кожного з виділених мікроорганізмів. Усі культури культивували при 0°C . Сім культур демонстрували очевидні ознаки росту при інкубації при -7°C протягом 60 днів. Оптимальні температури росту визначали, оцінкою найшвидшого росту при інкубації протягом 1-3 днів.

Таблиця 3.1.

Екстремальні та оптимальні температури росту бактерій, виділених з антарктичних зразків

Зразок №.	Місце виділення	Лабораторна назва мікроорганізму	Температура росту, °C		
			Min	Optimal	Max
1	Irizar Island	FCKU 543	0	+19 –	+37
2	Pitermann Island, South Part	FCKU 539	-7	+16 – +28	+37
3	Galindez Island, Govorucha dome slope	FCKU 533	-7	+16 – +28	+37
4	Winter Island, rock near Wordie House	FCKU 534	-7	+16 – +28	+37
5	Galindez Island, Karpaty Ridge	FCKU 538	-7	+16 – +28	+37
		FCKU 542	-7	+16 – +28	+37
6	Pitermann Island	FCKU 537	0	+19 – +25	+37
7	Galindez Island	FCKU 540	-7	+16 – +28	+37
		Cq 13		+16 – +28	

Для бактерій FCKU 543 та FCKU 537 оптимальна температура була в межах + 19°C – + 25°C, для бактерій FCKU 539, FCKU 533, FCKU 534, FCKU 538, FCKU 542 та FCKU 540 та Cq 13 – +16°C – +28°C. Ці дані узгоджуються з подібними попередніми дослідженнями [203,204].

Ряд доказів свідчить про те, що ізольовані бактерії не були справді психрофільними, а навпаки, психотолерантними мікроорганізмами, здатними виживати при надзвичайно низьких температурах, водночас віддаючи перевагу

більш теплим (помірним) умовам для їх ефективного росту. Як повідомлялося раніше, холодостійкі або адаптовані до холоду бактерії мають більш широкий діапазон температур росту (від -5°C до $+40^{\circ}\text{C}$) з оптимальною температурою росту зазвичай вище $+20^{\circ}\text{C}$ [205]. Хоча є дослідження, яке доводило наявність життєздатних клітин бактерій, при температурі інкубації -20°C [206]. Крім того, бактерії роду *Pseudomonas* мають характерну особливість заселяти різні екологічні ніші, витримують несприятливі умови навколишнього середовища [207] і ростуть майже з однаковою швидкістю у широкому діапазоні температур [208].

3.2. Морфологічні та біохімічні особливості мікроорганізмів

У подальшому дослідженні були встановлені культурні, морфологічні та біохімічні особливості мікроорганізмів. Культуру FCKU 543 (із зразка 1, таблиця 3.1) виділяли, розмножували та зберігали на середовищі NA. Через 24 години культивування при 20°C в аеробних умовах мікроорганізми утворювали круглі колонії з рівним краєм діаметром приблизно 2–3 мм. Колонії мали виступаючий профіль з м'якою пастоподібною текстурою, однорідною структурою та гладкою матовою поверхнею. FCKU 543 утворював нерозчинний лимонно-жовтий пігмент та мав своєрідний ореол, який оточував колонії бактерій (рис 3.1).



Рис. 3.1. Морфологія чистої культури FCKU 543 на середовищі NA (857 – робоча назва)

Мікроскопічні дослідження показали сферичні грампозитивні клітини без спор та капсул. Клітини розташовувались окремо або утворювали кубічні агрегати (рис 3.2).

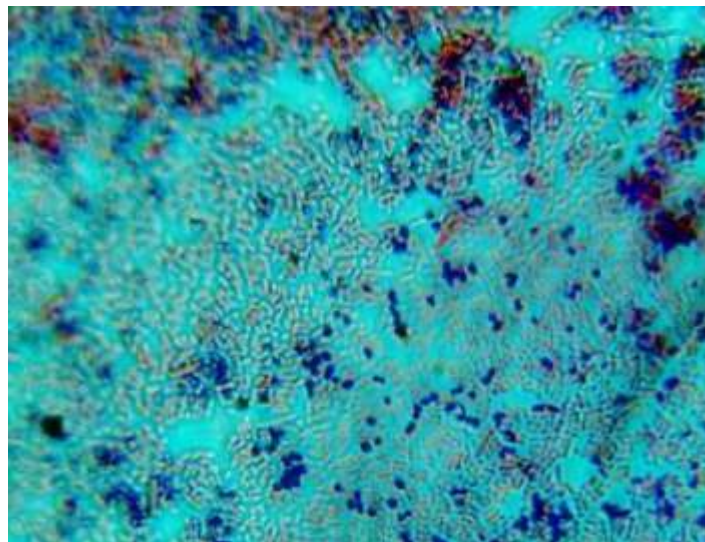


Рис 3.2. Морфологія бактеріальних клітин *Micricoccus* sp. FCKU 543 (фарбування за Грамом, збільшення x1600)

Після інкубації бактерій у NB, розчин був без осаду, рівномірно каламутний, плівка тонка, гладенька. Бактерії також могли рости на середовищах BEA, TSA та PDA. Бактерії FCKU 543 були каталазопозитивними, аеробними і не могли ферментувати глюкозу або маніт (таблиця 3.2). На основі експериментально встановлених культурних, морфологічних та біохімічних властивостей та згідно з Посібником систематичної бактеріології Берджі, виділену бактерію FCKU 543 можна віднести до родини *Micrococcae* (Vos et al. 2009).

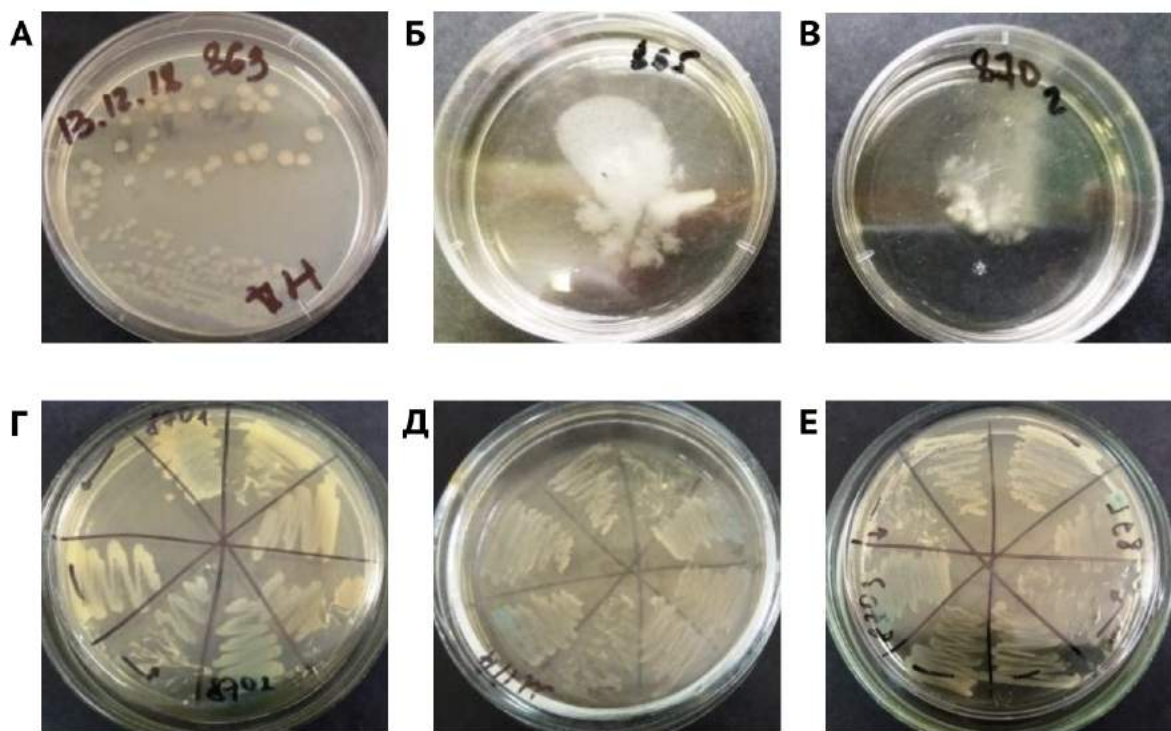


Рис. 3.3. Морфологія чистих культур: (А) FCKU 539 (869 – робоча назва), (Б) FCKU 533 (865 – робоча назва), (В) FCKU 534 (870/2 – робоча назва), (Г) FCKU 538 (870/1 – робоча назва), (Д) FCKU 542 (870/3 – робоча назва), (Е) FCKU 540 на середовищі NA (875 – робоча назва)

Культури FCKU 539, FCKU 533, FCKU 534, FCKU 538, FCKU 542, FCKU 540 (із зразків 2–5, 7 таблиця 3.1) були виділені та культивовані на середовищі NA при 20°C протягом 1 доби. Усі ці мікроорганізми утворювали подібні круглі поверхневі прозорі сіруваті колонії з нерівними краями, що досягали приблизно

1-2 мм (24 години інкубації) та 3-6 мм (48 годин інкубації) в діаметрі. Колонії мали плоский профіль з однорідною структурою, гладкою блискучою поверхнею та слизовою структурою (рис 3.3).

При культивуванні цих бактерій у NB утворювався рівномірно мутний розчин без осаду з тонкою гладкою плівкою. Бактерії також могли рости на картопляному агарі, ТСА, середовищі М9. При культивуванні на середовищі King A FCKU 539, FCKU 533, FCKU 534, FCKU 538, FCKU 542 та FCKU 540 не продукували розчинних пігментів, тоді як при вирощуванні на середовищі King B утворювався розчинний жовто-зелений флуоресцентний пігмент, протягом 3-6 днів при 20°C. Усі бактерії були аеробними, каталазо- та оксидазопозитивними, здатними утилізувати цитрат і не утворювали ні індолу, ні сірководню. На відміну від FCKU 538, FCKU 539, FCKU 533, FCKU 534, FCKU 542 та FCKU 540 бактерії змогли гідролізувати желатин та розкласти нітрати (таблиця 3.2)

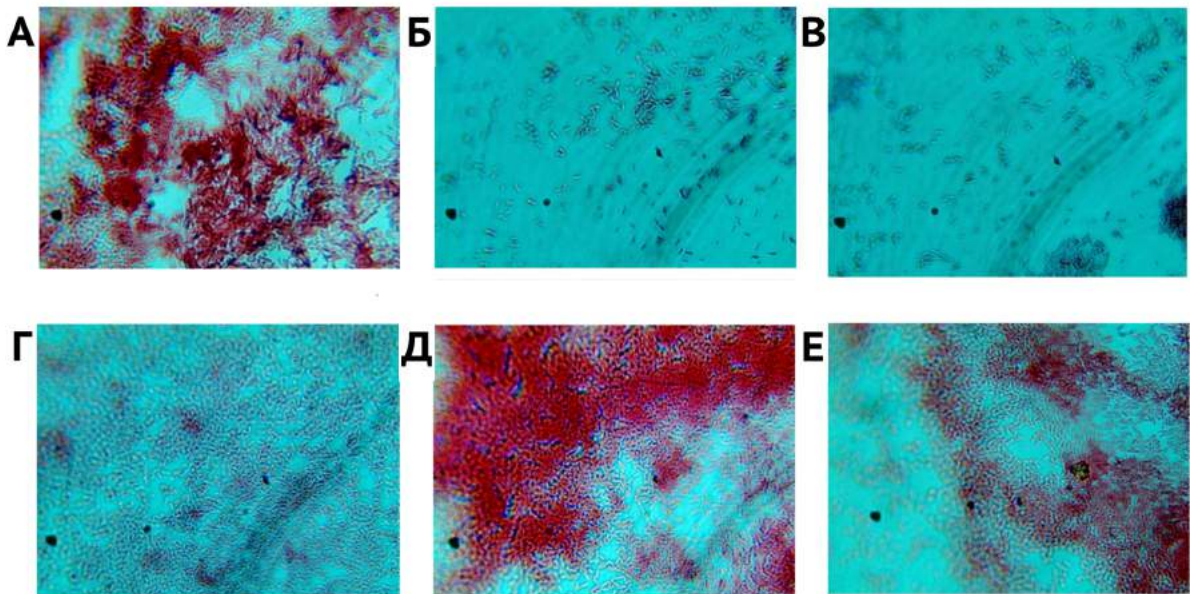


Рис 3.4. Морфологія бактеріальних клітин: (А) *Pseudomonas* sp. FCKU 539, (Б) *Pseudomonas fluorescens* FCKU 533, (В) *Pseudomonas fluorescens* FCKU 534, (Г) *Pseudomonas putida* FCKU 538, (Д) *Pseudomonas fluorescens* FCKU 542, (Е) *Pseudomonas fluorescens* FCKU 540 (фарбування за Грамом, збільшення 1600)

Мікроскопічні дослідження виявили рухливі грамнегативні паличкоподібні клітини із закругленими кінцями, що досягають приблизно 1,5-3 мкм в довжину. Такі клітини розташовувались окремо або попарно і не мали ні капсул, ні спор (рис 3.2).

Таблиця 3.2.

Культурально-морфологічні властивості бактерій, ізольованих з антарктичних зразків

Культурально - морфологічні властивості	FCKU 539	FCKU 533	FCKU 534	FCKU 538	FCKU 542	FCKU 536	FCKU 540
Морфологія бактерій	палички	палички	палички	палички	палички	палички	палички
Розмір клітини	2 мкм	1,5-3 мкм	1,5-3 мкм	1,5-3 мкм	1,5-3 мкм	1,5-3 мкм	1,5-3 мкм
Фарбування за Грамом	-	-	-	-	-	-	-
Рухливість	+	+	+	+	+	+	+
Гемоліз	-	-	-	-	-	-	-
Флуоресцентний пігмент	+	+	+	+	+	+	+
Нефлуоресцентний пігмент	-	-	-	-	-	-	-
Ріст на агарі МакКонкі	+	+	+	+	+	+	+

Виходячи з експериментально встановлених культурних, морфологічних (табл. 3.2) та біохімічних (табл 3.3) властивостей, а також згідно з Посібником систематичної бактеріології Берджі, усі ці ізольовані бактерії можуть бути віднесені до роду *Pseudomonas* [209]. Ідентифікація цих штамів за допомогою тест-системи Mikro-La-Test підтвердила, що біохімічний профіль бактерій FCKU 533, FCKU 534, FCKU 542, FCKU 540 з імовірністю 99% відповідає бактеріям

Pseudomonas fluorescens, тоді як бактерія FCKU 538 з ймовірністю 99% можна віднести до *Pseudomonas putida*. Специфічна ідентифікація *Pseudomonas* sp. штам FCKU 539 потребує подальшого дослідження.

Таблиця 3.3.

Біохімічні властивості бактерій, ізольованих з антарктичних зразків

Біохімічні властивості	FCKU 539	FCKU 533	FCKU 534	FCKU 538	FCKU 542	FCKU 536	FCKU 540
1	2	3	4	5	6	7	8
Ферментні тести							
Аргінінди-гідролаза	+	+	+	+	+	+	+
Лужна фосфатаза	-	-	-	-	-	-	-
Утворення сірководню	-	-	-	-	-	-	-
Утворення індолу	-	-	-	-	-	-	-
Редукція нітратів	+	+	+	-	+	+	+
Утворення лецитінази	-	-	-	-	-	-	-
Лізинде-карбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-
Орнітинде-карбоксілаза	-	-	-	-	-	-	-
β-галактозидаза	-	-	-	-	-	-	-
Гідроліз ескуліну	-	-	-	-	-	-	-
Гідроліз желатину	+	+	+	-	+	+	+
Гідроліз крохмалю	-	-	-	-	-	-	-
Уреаза	-	-	-	-	-	-	-
Оксидаза	+	+	+	+	+	+	+

Продовження таблиці 3.3.

1	2	3	4	5	6	7	8
Утилізація							
Ацетат	-	-	-	-	-	-	-
Арабіноза	-	-	+	+	-	+	+
Цитрат	+	+	+	+	+	+	+
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
Гліцерол	+	+	+	+	+	+	+
Інозитол	-	-	-	-	-	-	-
Малонат	-	-	+	+	-	+	+
Мальтоза	-	-	-	-	-	-	-
Маноза	-	-	-	-	-	-	-
Манітол	-	-	-	-	-	-	-
N-ацетил-глюкозамін	-	-	-	-	-	-	-
Сорбітол	-	-	-	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-	-
Трегалоза	-	-	-	-	-	-	-
Ксилоза	+	+	+	+	+	+	+

Ізоляти FCKU 533, FCKU 534 та FCKU 542 були подібними як за морфологічними, так і за біохімічними показниками. Однак ізоляти FCKU 539, FCKU 538 та FCKU 540 дещо відрізнялись за своїм біохімічним профілем. Наприклад, FCKU 539 ізолює асимільовану цитратну фруктозу, глюкозу та гліцерин, але не засвоює арабінозу, на відміну від інших ізолятів. Ізолят FCKU 538 також відрізнявся здатністю засвоювати речовини і не розкладав нітрат. Ізолят FCKU 540 виявився негативним до лецитинази (таблиця 3.3).

В результаті проведених досліджень було виділено та охарактеризовано сім бактеріальних ізолятів з антарктичних зразків, які належать до роду *Micrococcus* та *Pseudomonas*.

Дослідження проведені раніше показали, що ізоляти *Pseudomonas*, виділені зі зразків зібраних поблизу Антарктиди або в інших полярних регіонах, не виявляли метаболічних активностей, подібних до наших результатів, жоден з виділених ізолятів не міг катаболізувати ксилозу або арабінозу, але катаболізував різні вуглеводи-гексози [155, 210]. Раніше було висунуто гіпотезу, що деякі бактерії, зокрема псевдомонади, мають генетичну схильність до метаболізму таких вуглеводів гексоз і пентоз, гліцерину, органічних кислот та ароматичних речовин, частково завдяки обмеженій рослинності антарктичних квіткових рослин, таких як *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*, що продукують ці сполуки [60].

Чисті культури мікроорганізмів, які були виділені з антарктичних зразків, перерахованих у таблиці 3.1, та успішно культивовані (*Pseudomonas sp.* FCKU 539, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 533, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 534, *Pseudomonas putida* FCKU 538, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 542, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 540). Бактеріальні ізоляти віднесені до колекції Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Ця колекція є частиною «Культурної колекції грибів Київського університету» (FCKU), зареєстрованої у Всесвітньому центрі даних мікроорганізмів (WDCM 1000).

Зі зразків, зібраних під час 18–20-ї (2014-2016 рр.) експедицій на УАС, нашими колегами був виділений та охарактеризований ізолят *Bacillus subtilis* FCKU 537 [201]. Цей ізолят також використовувався в подальших дослідженнях взаємодії фаг-хазяїн.

3.3. Виділення та характеристика чистих ліній бактерій із бактеріального консорціуму Cq13

Окрім вищезгаданих бактеріальних організмів нам вдалось виділити бактеріальний консорціум – Cq13. Бактеріальний ізолят Cq13 являє собою консорціум кількох бактерій, які можливо будуть використані для накопичення вірусного матеріалу. Для подальшого виділення та пасажування вірусу, методом виколювання негативних колоній, ми з'ясовували, чи є в консорціумі еукаріотичні клітини. Для цього проводили фарбування бактеріальної культури Cq13 вітальним барвником DAPI та проводили флуоресцентну мікроскопію (рис. 3.5).

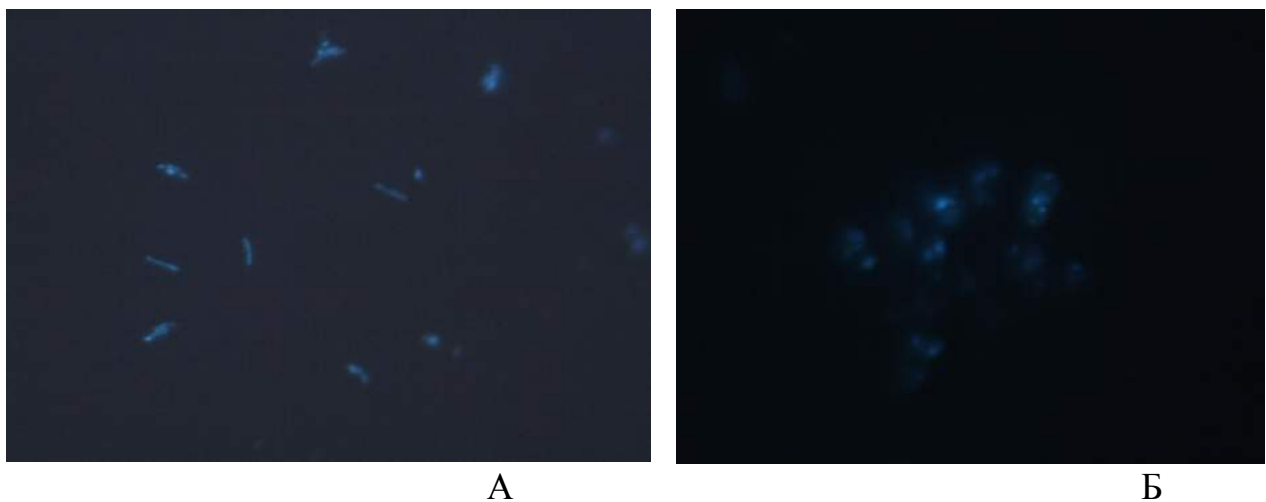


Рис. 3.5. Фарбування DAPI: А – бактеріальна суспензія Cq13 – видно бактеріальні клітини паличкоподібної форми; Б – дріжджі пофарбовані DAPI, позитивний контроль

Дослід підтвердив, що в консорціумі Cq13 відсутні еукаріотичні клітини. Далі було проведено розділення бактеріального консорціуму на окремі чисті лінії бактерій. Результати морфологічного опису та мікроскопічних досліджень виділених бактеріальних ізолятів представлено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4.

Морфологія бактеріальних ізолятів консорціуму Cq13

Бакт. лінія	Колір	Профіль	Край	Діа-метр, мм	Доба	Додаткова інформація	Грам +/-	Опис культури
1	Кремова прозора	Конусо-подібна	Зазубрений	5	2	Коричневий дифундуючий пігмент	Г-	Палички
2	Жовта прозора	Конусо-подібна	Складчастий або зазубрений	7	1		Г-	Палички
3	Кремова непрозора	Конусо-подібна	Рівний	3	2		Г-	Палички
4	Кремова непрозора	Випукла	Рівний	1	1		Г-	Палички
5	Жовта непрозора	Випукла (або конусо-подібна)	Рівний	3	1		Г+	Коки /плеоморфи
6	Жовта непрозора	Випукла	Рівний	2	1		Г+	Коки /плеоморфи

Виділені нами чисті бактеріальні лінії не використовувались як індикаторні культури для виділення та накопичення вірусного матеріалу, оскільки було помічено втрату літичної активності фагів. При повторному зараженні бактеріальних культур фагами, отриманими з першого пасажу титр фагу зменшувався вдвічі, а при наступному зараженні інфікування не відбувалось взагалі.

Різноманітність культивованих бактерій у наших дослідженнях є подібними, до раніше проведених досліджень у Антарктиді, Гренландії та інших льодових регіонах [173,211,212].

На сьогоднішній день були секвенсовані геноми близько 200 психротолерантних бактерій [213]. Відомо, що бактеріальні спільноти антарктичних ґрунтів мають специфічну локалізацію та гетерогенність [136,144]. Станом на сьогоднішній день для наземних екосистем Антарктиди були зареєстровані такі вищі таксони мікроорганізмів: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Armatimonadetes*, *Gemmatimonadetes* та *Planctomycetes* [152,214–217]. По всьому континенту постійно зустрічається кілька основних типів бактерій, проте протеобактерії є найпоширенішими бактеріями ґрунтового типу у всьому світі [143]. *Pseudomonas* – один з типових представників протеобактерій. Дослідження показали, що *Pseudomonas* sp. є (суб) домінуючим серед культивованих бактерій в Арктиці та Антарктиці [219–221], що відповідає нашим даним. Псевдомонади добре переносять екстремальні умови навколишнього середовища через їх високу метаболічну універсальність [222]. Не рідше зустрічаються представники актинобактерій (*Micrococcus*) та фірмікутів (*Bacillus*).

Отже, в результаті проведених досліджень охарактеризовано культурально-морфологічні та біохімічні ознаки 7 культур бактерій та 1 бактеріального консорціуму, виділених із зразків прибережних областей о. Галіндез у місці розташування УАС “Академік Вернадський“. Використовуючи тест-системи Mikro-La-Test визначено таксономічну приналежність 7 бактеріальних культур, з яких 6 культур ідентифіковані як представники класу *Gamma*proteobacteria, роду *Pseudomonas* та один представник класу *Actinobacteria*, роду *Micrococcus*. При вивченні температурного діапазону зростання виділених культур антарктичних мікроорганізмів встановлено, що вони утворюються у діапазоні температур -7 – $+37^{\circ}\text{C}$, оптимум зростання $+16$ – $+28^{\circ}\text{C}$. Виділені мікроорганізми можна віднести до психотолерантних, тобто таких, які здатні виживати при надзвичайно

низьких температурах, але водночас віддаючи перевагу більш теплим умовам для їх ефективного росту.

РОЗДІЛ 4. БІОРІЗНОМАНІТТЯ БАКТЕРІОФАГІВ У НАЗЕМНИХ БІОТОПАХ АНТАРКТИДИ

Існує досить мало досліджень, присвячених біологічним характеристикам вірусів та опису їх ізоляції з полярних областей. Дослідження водного середовища Антарктики показали, що віруси різноманітні і численні, і вони здатні змінювати спосіб життя підлаштовуючись під бактерій-хазяїв, від псевдолізогенних до літичних, коли кліматичні умови сприяють збільшенню біомаси бактерій [223,224]. Останні дослідження в Антарктиді та Арктиці виявляють велику різноманітність ДНК-вірусів, включаючи бактеріофаги, віруси з кільцевою одноланцюговою ДНК та вірофаги, адаптовані до таких екстремальних умов. Перше відкриття РНК- вмісних вірусів в Антарктиді було зареєстроване в озері Лімнопольне. Більшість ідентифікованих вірусів були віднесені до порядку *Picornavirales* (+одноланцюговою РНК). Віруси *Dicistroviridae* були поширені у зразках, зібраних у зимовий період (з 2006 по 2010 рік), тоді як представники роду *Bacillarnavirus* та *Picornavirales* були виділені у літніх зразках (2007 та 2010 рік) [179,225–229]. Також було показано наявність РНК-бактеріофагів родини *Leviviridae*, фаги з ssDNA родини *Microviridae* (ssDNA) та нехвостих теквірусів (dsDNA) [230]. Щодо бактеріофагів, було показано, що антарктичні пустелі містять значні популяції вірусів, де переважають хвостаті фаги порядку *Caudovirales* [11,231]. Розділ присвячений біорізноманіттю, особливостям виділення та морфологічним характеристикам бактеріофагів, виділених поблизу УАС «Академік Вернадський».

Зразки ґрунту були привезені з островів Ялур, Пітерман, Галіндез, Туксен, Барселот, Зимовий та Ірізар розташованих біля Української антарктичної станції “Академік Вернадський”, яка знаходиться на Аргентинських островах у морській Антарктиці.

Особливостями культивування бактеріофагів антарктичного регіону є підбір методики виділення. Адже при недотриманні температурних режимів транспортування або зберігання вірусів можуть втрачати свою літичну активність.

Ґрунти антарктичного регіону знаходяться під впливом суворих екологічних умов континентальної Антарктиди. Це в свою чергу впливає на біорізноманіття ґрунтових екосистем, які мають низьку різноманітність та просту трофічну структуру. У більшості районів континенту організми, що мешкають у ґрунті, переживають важкі кліматичні умови, включаючи низьку доступність води та поживних речовин, надзвичайно низькі температури, часті цикли заморожування – відтавання, періоди тривалої темряви взимку та вплив високого рівня ультрафіолетового випромінювання влітку.

Для визначенні різноманіття бактеріофагів Антарктичного регіону нами було використано “пряме” виділення на основі диференційного центрифугування, а також для фагів, що заражали бактерій-хазяїв було встановлено біологічні особливості. Зокрема температурні оптимуми взаємодії, особливості утворення негативних колоній, спектр літичної активності.

Для виділення, концентрування та біологічної характеристики бактеріофагів основною умовою є наявність бактерії, яка може бути використана як індикаторна. Але у випадку антарктичних вірусів, умови транспортування, зберігання, та культивування підібрати складно. Складність виділення фагів з ґрунтового середовища полягає також у тому, що ґрунт є неоднорідним субстратом, у якому наявні компоненти з різним зарядом, різного ступеня гідрофільності/гідрофобності все це має значний вплив на адсорбцію вільних вірусних часток. Даний фактор, на нашу думку, є вирішальним у «бідоступності» бактеріофагів для їх біологічних хазяїв – ґрунтових мікроорганізмів. Виходячи з таких міркувань, важливим етапом роботи є підбір оптимальної методики елюції вірусних часток зі зразків ґрунту.

В результаті досліджень прийняте рішення провести “пряме” виділення бактеріофагів із зразків. Тобто відібрані зразки поміщались у буферний розчин та

піддавались диференційному центрифугуванню, одразу після цього вірусний препарат наносився на сітки для електронного мікроскопа та аналізувався за допомогою ТЕМ. У такому разі при виділенні зразки не піддавались високому коливанню температур та дії хімічних компонентів, інгібуванню агаром, тощо.

Для представлення результатів ми згрупували отримані мікрофотографії бактеріофагів за морфологією віріонів та визначили таксономічну належність, зокрема фаги з довгим скоротливим хвостовим відростком відносили до родини *Myoviridae*, фаги з довгим нескоротливим хвостовим відростком – *Siphoviridae* та фаги з коротким хвостовим відростком – до родини *Podoviridae*, порядку *Caudovirales*. Оскільки сучасні методи класифікації базуються на принципах метагеноміки, остаточну класифікаційну належність можна визначити лише після секвенування, тому надалі ми будемо називати групи виділених фагів: “подібні до родини *Myoviridae*”, “подібні до родини *Siphoviridae*” та “подібні до родини *Podoviridae*”.

Отже, за даними електронної мікроскопії із зразків ґрунту було виділено 32 різних за розміром та морфологією бактеріофагів. Зразки були відібрані в різних місцях Аргентинських островів.

Протягом експедицій 2015-2020 роках із 140 зразків були виділені бактеріофаги різної морфології. За даними електронної мікроскопії всі бактеріофаги відносились до порядку *Caudovirales*. Група фагів подібних до родини *Myoviridae* мали довгі скоротливі хвостові відростки (рис 4.1).

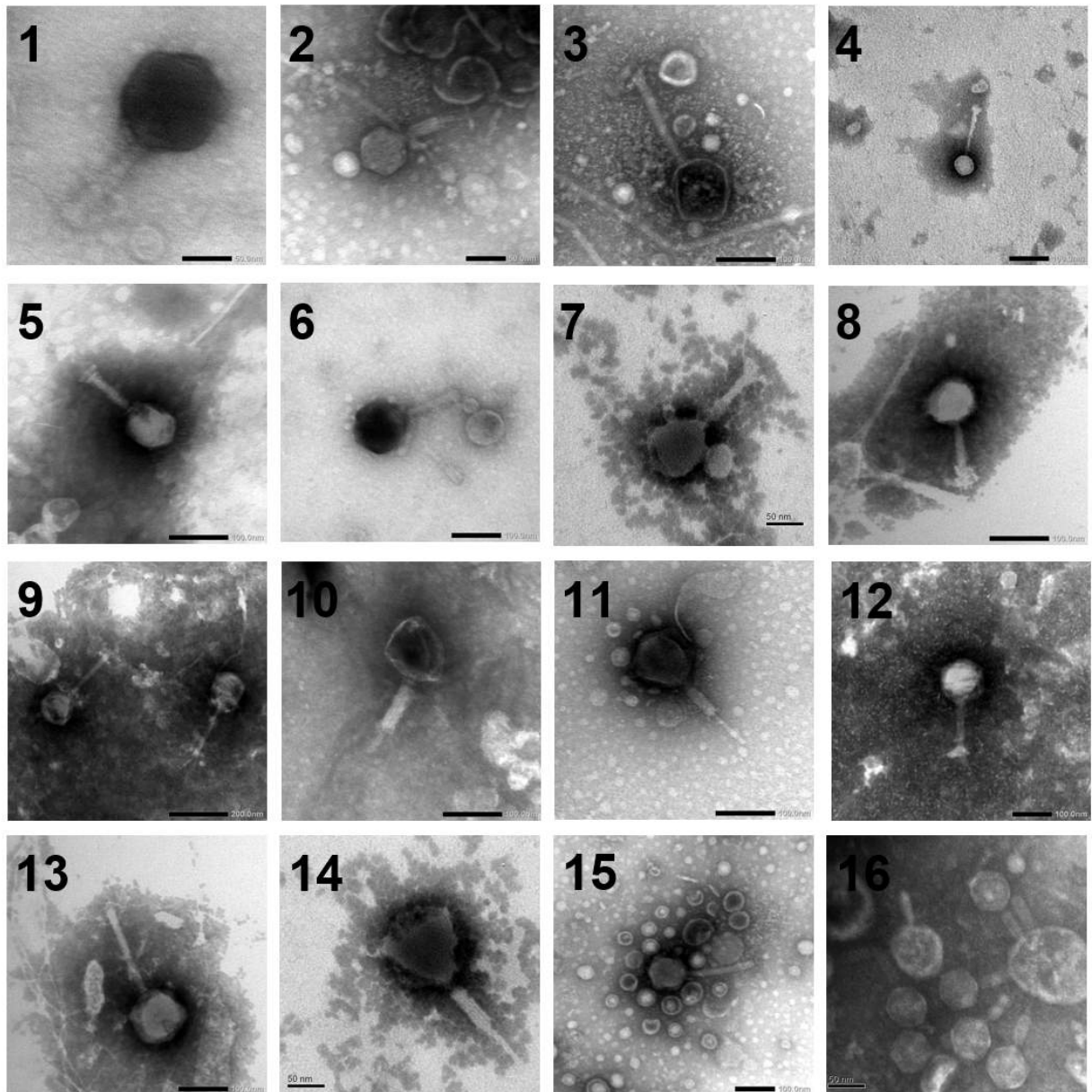


Рис. 4.1. Електронно-мікроскопічні зображення бактеріофагів подібних до родини *Muoviridae*

Бактеріофаги родини *Muoviridae*, виділені протягом 2015-2017 рр. та 2018-2020 рр., були різними за розмірами та особливостями будови (таблиця 4.1). Деякі зразки були відібрані з однієї точки відбору, але в різні роки (див. додаток А). За даними електронної мікроскопії можна стверджувати, що фаги родини *Muoviridae* демонструють досить високу різноманітність. Оскільки деякі зразки мають однакове походження, але відібрані в різні часові проміжки, ми можемо

припустити, що фаги одного і того самого середовища динамічно змінюються. Це, ймовірно, пов'язано з динамікою бактеріальної популяції, зміною кліматичних умов та постійною коєволюцією фагів та їх хазяїв.

Відповідні розміри віріонів наведені у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1.

Розміри головок та хвостових відростків ізолятів фагів родини *Myoviridae*

№	Діаметр головки, нм	Довжина хвостового відростку, нм
1	120,0 ± 3	100,0 ± 1
2	72,0 ± 1	87,0 ± 1
3	111,0 ± 2	176,0 ± 3
4	54,0 ± 1	136,0 ± 2
5	96,0 ± 1	105,0 ± 2
6	106 ± 1	111,0 ± 2
7	62,5 ± 1	81,0 ± 1
8	77,0 ± 1	123,0 ± 2
9	100,0 ± 2	174,5 ± 3
10	95,3 ± 1	138,5 ± 2
11	107,5 ± 2	158,0 ± 3
12	112,5 ± 2	145,0 ± 3
13	97,0 ± 1	190,0 ± 3
14	128 ± 3	157 ± 3
15	94 ± 2	176 ± 4
16	56 ± 2	101 ± 5

Окрім ізолятів фагів, подібних до родини *Muoviridae* зразки містили фаги з довгими нескоротливими хвостовими відростками, подібних до фагів родини *Siphoviridae* (рис 4.2).

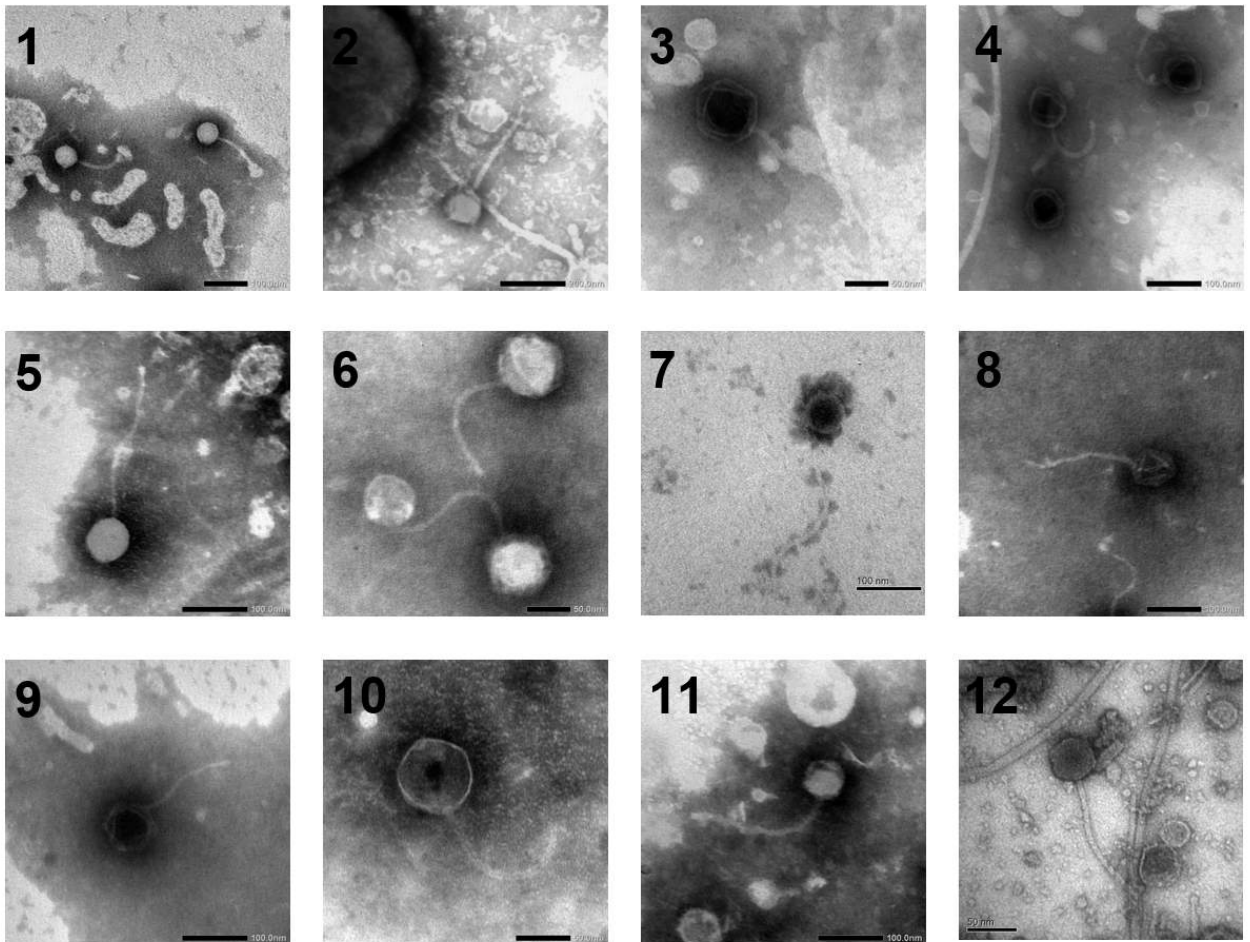


Рис. 4.2. Електронно-мікроскопічні зображення бактеріофагів подібних до родини *Siphoviridae*

Фаги родини *Siphoviridae* детектувалися дуже складно, при дослідженні зразка у полі зору електронного мікроскопа ми спостерігали окремі уламки хвостових відростків та головок. Оскільки, фаги родини *Siphoviridae* були досить великих розмірів і зазнавали руйнування під час центрифугування. Альтернативним поясненням складності дослідження фагів у полі зору електронного мікроскопа є їх нестабільність у одному з компонентів середовищ або буферних систем, використаних під час дослідження.

За даними ЕМ вдалося описати морфологію 12 бактеріофагів родини *Siphoviridae* виділених протягом 2015-2020 років. Група фагів, подібних до родини *Siphoviridae* мали довгі нескоротливі хвостові відростки (таблиця 4.2).

Таблиця 4.2.

Розміри головок та хвостових відростків ізолятів фагів родини *Siphoviridae*

№	Діаметр головки, нм	Довжина хвостового відростку, нм
1	52,0 ± 1	139,0 ± 2
2	71,0 ± 1	162,0 ± 3
3	69,0 ± 1	176,0 ± 3
4	73,0 ± 1	146,0 ± 1
5	82,0 ± 1	247,0 ± 3
6	57,5 ± 1	111,0 ± 2
7	71,0 ± 1	241,0 ± 4
8	95,0 ± 2	205,0 ± 3
9	90,5 ± 2	147,0 ± 3
10	58 ± 1	170 ± 2
11	66 ± 1	233 ± 4
12	48 ± 2	156 ± 5

За даними одного з небагатьох досліджень вірусів, поширених у ґрунтах Антарктиди [11], представники родини *Siphoviridae* домінують за чисельністю представників порядку *Caudovirales*. Наші дослідження узгоджуються з цими

даними та демонструють не лише велике біорізноманіття, а й дуже суттєву різницю у морфологічних показниках. Представники фагів родини *Siphoviridae* мали розміри головок коливаються від 52 ± 1 до 95 ± 2 нм, а хвостових відростків від 111 ± 2 до 247 ± 3 нм.

Фаги з короткими хвостовими відростками були подібними до представників родини *Podoviridae* (рис 4.3).

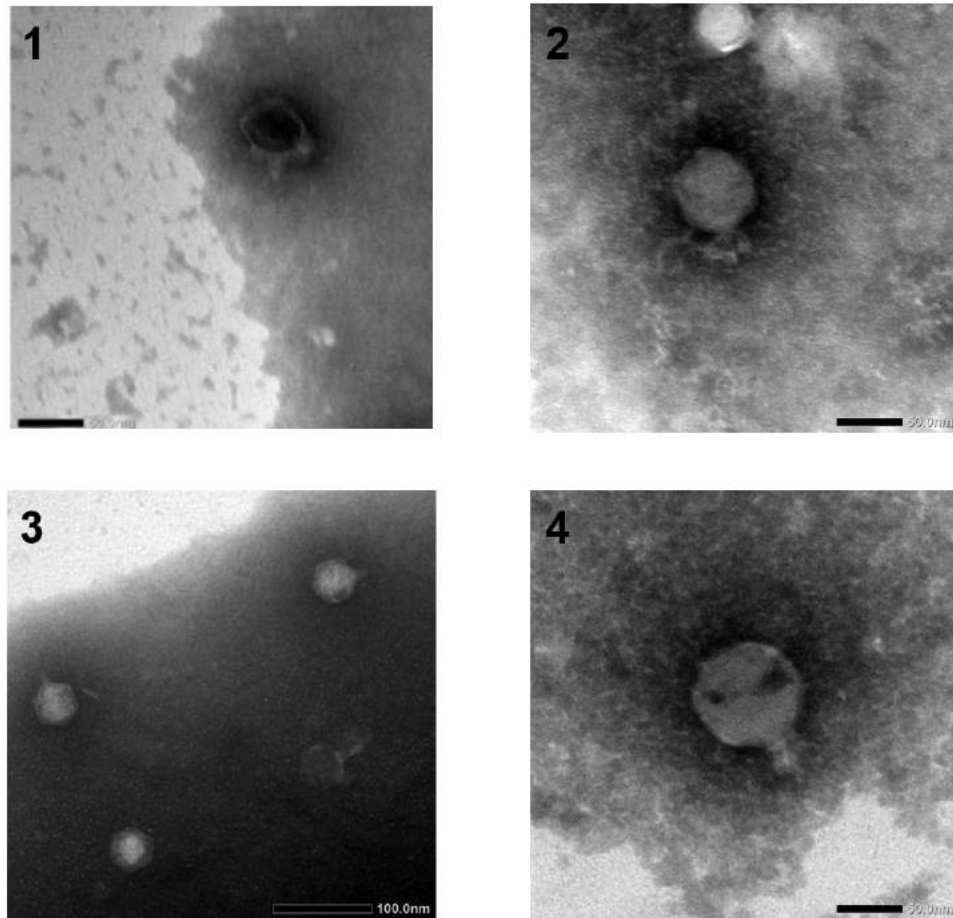


Рис. 4.3. Електронно-мікроскопічні зображення бактеріофагів подібних до родини *Podoviridae*

Чисельність фагів родини *Podoviridae* була невеликою. Це, ймовірно, пов'язано з відсутністю, або невеликою кількістю природних бактерій-хазяїв.

Біорізноманіття вірусів у будь-якій екосистемі залежить від складу бактеріальних популяцій, вологості, хімічного складу ґрунту, радіації,

температури та, навіть, сили вітру. Географічне положення Української антарктичної наукової станції «Академік Вернадський» визначається координатами 65°15'1 південної широти та 64°16'1 західної довготи. Значення температур рідко перетинають позначку мінус тридцять, а влітку можуть підніматись вище нуля. Кліматичні умови у місці розташування УАС сприятливіші, ніж на континентальній Антарктиді, різноманітність бактерій, а відповідно і бактеріофагів, є більш значною. Складність дослідження біорізноманіття пов'язана з проблемами виділення та накопичення фагів. Класичні методики культивування бактеріофагів неможливо застосувати, оскільки фаги руйнуються під впливом хімічних речовин та температури.

Розміри віріонів наведені у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3.

Розміри головок та хвостових відростків ізолятів фагів родини *Podoviridae*

№	Діаметр головки, нм	Довжина хвостового відростку, нм
1	40 ± 1	11,0 ± 0,5
2	71 ± 2	18,0 ± 0,5
3	44 ± 1	8,0 ± 0,5
4	75 ± 2	25 ± 0,5

Отже, нами вперше проведено пряме виділення (із застосуванням методу центрифугування та ЕМ) фагів з ґрунтів антарктичного регіону, встановлена їх морфологія та належність до таксономічних родин. Зокрема, фаги з довгим скоротливим хвостовим відростком родини *Myoviridae* (16 ізолятів), фаги з довгим нескоротливим хвостовим відростком – *Siphoviridae* (12 ізолятів) та фаги з коротким хвостовим відростком – родини *Podoviridae* (4 ізоляти), порядку

Caudovirales.

Культивування та подальша характеристика геномів холодоадаптованих вірусів із цього унікального середовища представляє великий інтерес, оскільки віруси потенційно представляють важливі елементи трофічної структури антарктичного ґрунту та можуть відігравати ключову роль у важливих процесах, таких як латеральне перенесення генів.

РОЗДІЛ 5. БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОФАГІВ

5.1. Морфологія негативних колоній досліджуваних фагів

Для фагів виділених безпосередньо із первинних зразків методом диференційного центрифугування, використовували термін – «первинні», а для фагів, які пройшли понад 10 пасажів – «чисті лінії». Відповідно в роботі використовували індикаторні культури бактерій виділені з антарктичного регіону та ізоляти фітопатогенних бактерій помірною регіону, що застосовували для дослідження біологічних властивостей, пасирування та накопичення фагів.

Перед проведенням пошуку літичних фагів у зразках, потрібно було переконатися чи не містять виділені бактерії у своєму геномі профагів. Для цього проводили УФ-опромінення бактеріальних культур та застосовували NaI-кислоту. У результаті проведеної індукції жоден з бактеріальних ізолятів вірогідно не містив профагів у своєму геномі.

Важливим етапом роботи є отримання генетично однорідних ізолятів - «чистих ліній». Для цього проводили пасажі зразків шляхом виколювання окремих негативних колоній. Аналіз ефективності репродукції фагів досліджували на дев'яти бактеріях, виділених з антарктичних зразків: *Pseudomonas sp.* FCKU 539, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 533, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 534, *Pseudomonas putida* FCKU 538, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 542, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 540, *Bacillus subtilis* FCKU 537, *Micricoccus sp.* FCKU 543 та бактеріального консорціуму Cq13.

Вісім фагів були успішно виділені, культивовані, очищені та описані в умовах лабораторії. Фаги отримали попередні назви, що відображають сприйнятливий бактеріальний організм, місце ізоляції та унікальний лабораторний номер. Далі у роботі будуть використані наступні назви та аббревіатури вірусів: *Pseudomonas fluorescens Antarctic virus 1* (PFAV1), *Pseudomonas fluorescens Antarctic virus 2* (PFAV2), *Pseudomonas fluorescens Antarctic virus 3* (PFAV3),

Pseudomonas putida Antarctic virus 4 (PPAV4), *Pseudomonas* sp. Antarctic virus 5 (PSAV5), *Bacillus subtilis* Antarctic virus 6 (BSAV6), *Pseudomonas* phage UAAntarctica (UAAntarctica) та *Pseudomonas* phage UAVern (UAVern).

Усі 8 фагів вірогідно є літичними (принаймні проти їх бактерій-хазяїв) і утворюють прозорі бляшки різного діаметру. Фаги родини *Myoviridae*, а саме *Antarctic virus 3* утворювали негативні колонії розміром 0,5 мм на бактеріальному ізоляті *Pseudomonas fluorescens* FCKU 534; *Antarctic virus 4* утворювали негативні колонії розміром від 1 до 2 мм на бактеріальному ізоляті *Pseudomonas putida* FCKU 538. Формування негативних колоній відбувалось на наступний день після зараження і закінчувались на третій день. *Antarctic virus 6*, утворював колонії розміром 1 мм на ізоляті *Bacillus subtilis* FCKU 537, формування яких починалось лише на третій і закінчувалось на сьомий день після зараження. *Pseudomonas phage* UAVern утворював негативні колонії розміром від 3 до 4 мм на бактеріальному ізоляті *Pseudomonas* sp. FCKU 539 на наступний день після зараження (рис. 5.1).

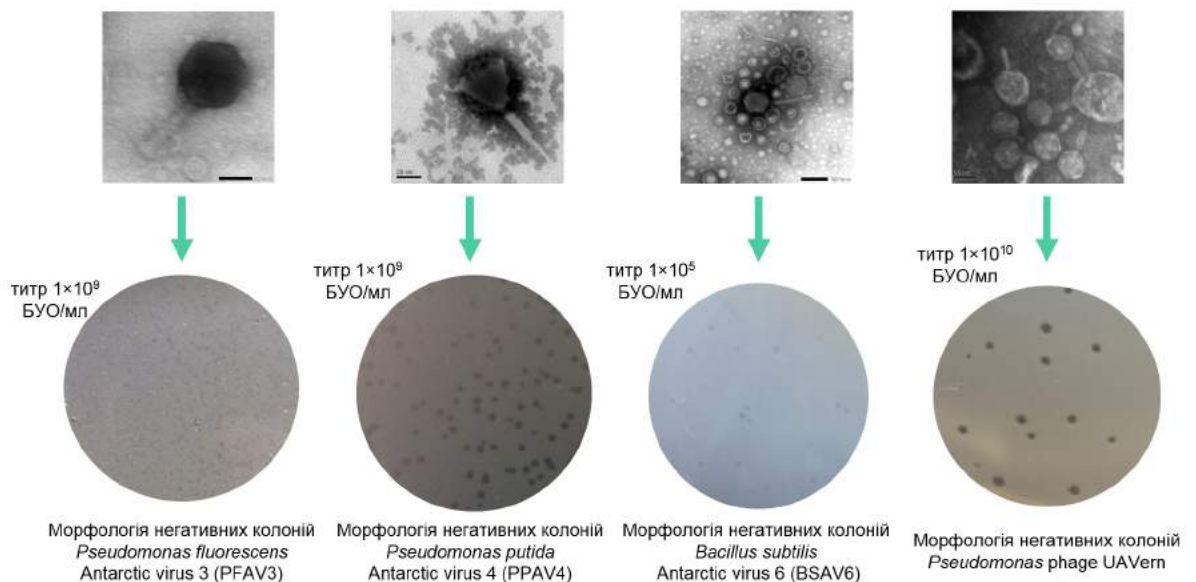


Рис. 5.1. Морфологія негативних колоній фагів родини *Myoviridae* (з електронно-мікроскопічними зображеннями відповідних віріонів).

Фаги родини *Siphoviridae* утворювали негативні колонії розміром від 1-го до 2-ох мм. *Antarctic virus 1* утворювали негативні колонії розміром 2 мм на бактеріальному ізоляті *Pseudomonas fluorescens* FCKU 542, фаги *Antarctic virus 5* утворювали негативні колонії розміром 1 мм на бактеріальному ізоляті *Pseudomonas sp* FCKU 539. Формування негативних колоній відбувалось на наступний день після зараження і закінчувались на третій день. *Pseudomonas* phage UAntarctica утворював колонії розміром 1 мм на ізоляті *Pseudomonas fluorescens* FCKU 533 формування яких починалось на третій день після зараження (рис.5.2).

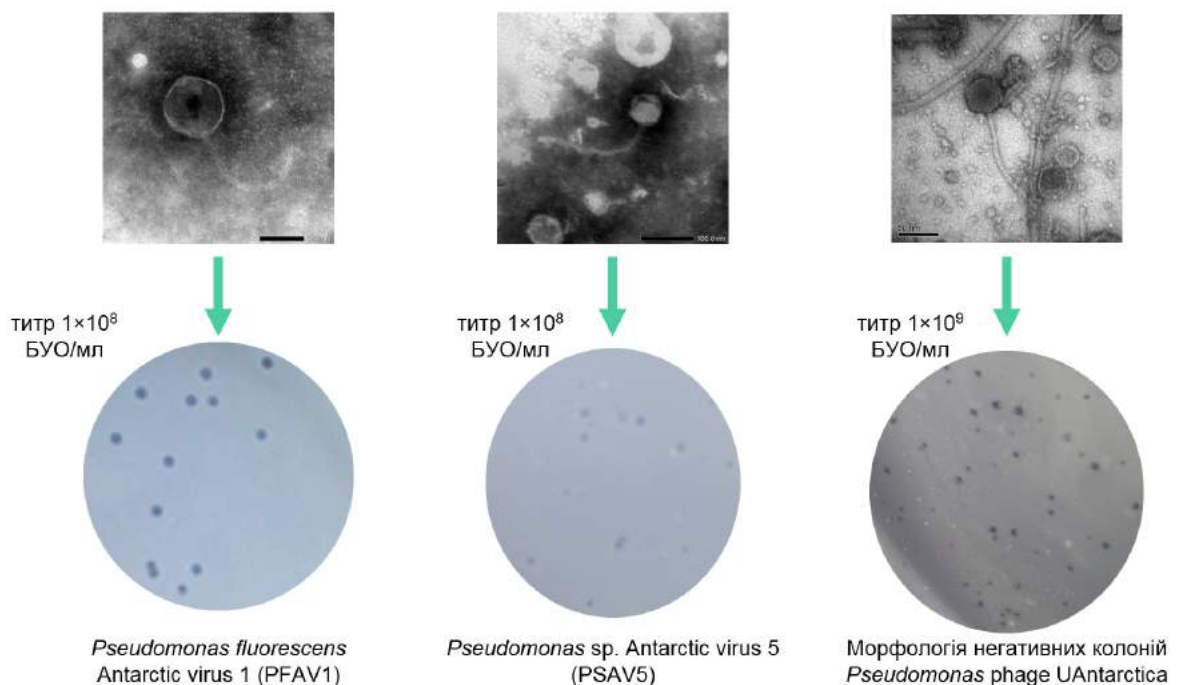


Рис. 5.2. Морфологія негативних колоній фагів родини *Siphoviridae* (з електронно-мікроскопічними зображеннями відповідних віріонів).

Фаги родини *Podoviridae* *Antarctic virus 2* утворював негативні колонії розміром 0,5 мм на бактеріальному ізоляті *Pseudomonas fluorescens* FCKU 542. Формування негативних колоній відбувалось на наступний день після зараження і закінчувались на третій день. Визначення біологічних властивостей фагів родини *Podoviridae* було обмеженим, оскільки природних хазяїв для інших ізолятів фагів виявлено не було (рис.5.3).

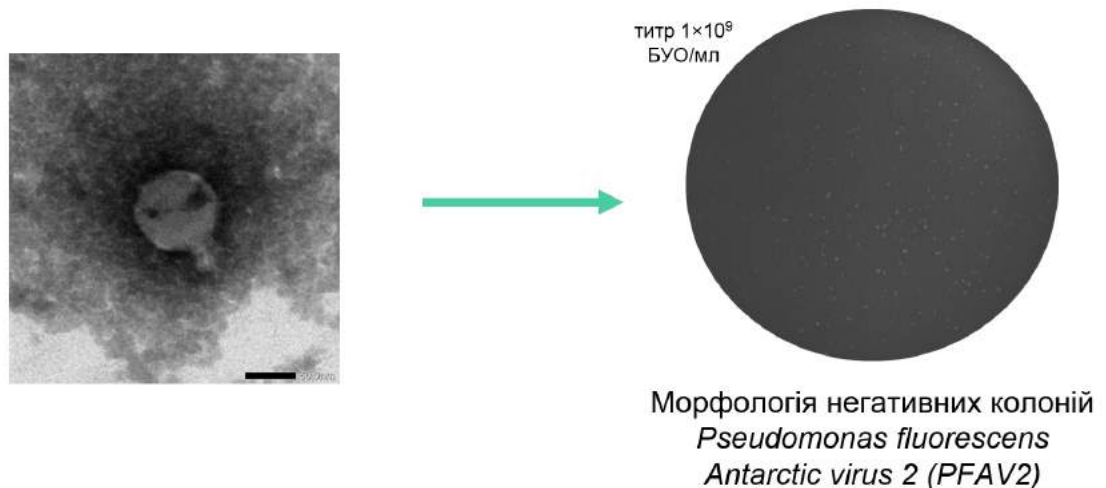


Рис. 5.3. Морфологія негативних колоній фагів родини *Podoviridae* (з електронно-мікроскопічними зображеннями відповідних віріонів).

Залежно від ізоляту титри лізатів фагів змінювалися від $\sim 1 \times 10^5$ до $\sim 1 \times 10^{10}$ бляшкоутворюючих одиниць (БУО) мл^{-1} (табл. 5.1). Ізолят UAntarctica та UAVern, які мали найбільші титри були обрані для подальших молекулярно-генетичних досліджень на наступному етапі роботи.

Дослідження показали, що інфекційність усіх лізатів зберігалася протягом кількох років при зберіганні при 4°C .

Після вдалого отримання «чистих ліній» проводили накопичення вірусних частинок на бактеріальних хазяях у рідкому середовищі, потім очищували та концентрували.

Наявність віріонів та їх морфологія була описана за допомогою електронної мікроскопії (рис. 5.1–5.3). За даними ЕМ, віріони не мали оболонки, що містить ліпіди. Як для фагів «первинних» (фагів виділених безпосередньо зі зразків), так і для «чистих ліній» (які пройшли декілька пасажів), визначена морфологія за допомогою ЕМ. За морфологічними особливостями хвостових відростків, фаги віднесені до трьох родин порядку *Caudovirales*. Діаметр капсиду вірусу коливався в межах 50-130 нм (табл. 5.1).

Таблиця 5.1.

Антарктичні фаги та їх чутливі бактеріальні хазяї

Бактеріофаги	Бактерії	Титр (БУО/мл)	Капсид/ діаметр головки (нм)	Довжина хвостового відростку (нм)	Родина
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Antarctic virus 1 (PFAV1)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> FCKU 542	1×10^8	58±1	170±2	<i>Siphoviridae</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Antarctic virus 2 (PFAV2)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> FCKU 542	1×10^9	75±2	25±0,5	<i>Podoviridae</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Antarctic virus 3 (PFAV3)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> FCKU 534	1×10^9	120 ±3	100±1	<i>Myoviridae</i>
<i>Pseudomonas putida</i> Antarctic virus 4 (PPAV4)	<i>Pseudomonas putida</i> FCKU 538	1×10^9	94±2	176±4	<i>Myoviridae</i>
<i>Pseudomonas</i> sp. Antarctic virus 5 (PSAV5)	<i>Pseudomonas</i> sp. FCKU 539	1×10^8	66±1	233±4	<i>Siphoviridae</i>
<i>Bacillus subtilis</i> Antarctic virus 6 (BSAV6)	<i>Bacillus subtilis</i> FCKU 537	1×10^5	128±3	157±3	<i>Myoviridae</i>
<i>Pseudomonas</i> phage UAntarctica	<i>Pseudomonas fluorescens</i> FCKU 533	1×10^9	48 ± 2	156 ± 5	<i>Siphoviridae</i>
<i>Pseudomonas</i> phage UAVern	<i>Pseudomonas</i> sp. FCKU 539	1×10^{10}	56 ± 2	101 ± 5	<i>Myoviridae</i>

Фагові ізоляти PFAV1 та PSAV5 мають типову морфологію подібну до фагів родини *Siphoviridae* з не скоротливими хвостовими відростками. Фаг PFAV1 мав розмір головки ~58 нм, хвостового відростка ~170 нм, тоді як фаговий ізолят PSAV5 мав розмір головки ~66 нм і хвостовий відросток ~233 нм. Фаг PFAV2 заражав того самого бактеріального хазяїна, що і PFAV1 (*Pseudomonas fluorescens*

FCKU 542), але мав відмінну морфологію: розмір головки ~ 75 нм та дуже короткий хвостовий відросток ~ 25 нм, характерний для родини *Podoviridae*. Ізоляти фагів PFAV3, PPAV4 та BSAV6 відрізнялися розмірами голівок та мали жорсткі скоротливі хвостові відростки, характерні для фагів родини *Myoviridae*. Фаг PFAV3 мав головку ~ 120 нм та хвостовий відросток ~ 100 нм, фаг PPAV4 мав голівку ~ 94 нм та хвостовий відросток ~ 176 нм, та фаговий ізолят BSAV6 мав розмір голівку ~ 128 нм та розмір хвостового відростку ~ 157 нм.

Ізолят UAntarctica та UAVern, були обрані для подальших молекулярно-генетичних досліджень на наступному етапі роботи. Їх морфологічні особливості були описані нижче. Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що фаги UAntarctica та UAVern є представниками порядку *Caudovirales*. Бактеріофаги *Pseudomonas* phage UAntarctica мали довгі нескоротливі хостові відростки розміром 156 ± 5 нм та ікосаедричну головку діаметром 48 ± 2 нм (67 вимірів фагових частинок), що є характерним для родини *Siphoviridae*. Фаги *Pseudomonas* phage UAVern мали головку діаметром 56 ± 2 нм і довгий скоротливий хвостовий відросток довжиною 101 ± 5 нм, що закінчується чітко вираженою базальною пластинкою (виміряно 45 фагових частинок), що характерно для представників родини *Myoviridae*.

Окрім морфологічних характеристик віріонів, встановлено особливості формування негативних колоній. Відтак було визначено оптимальну температуру для бактеріальної інокуляції ізольованими фагами. Усі штами ізольованих бактерій-хазяїв утворювали колонії при температурах від -7°C до $+37^{\circ}\text{C}$. Температурний вплив на реплікацію фагів (тобто утворення бляшок) перевіряли при температурах, що підтримують ріст бактерій-хазяїв. Усі фаги здатні заражати своїх природних хазяїв лише при помірних температурах від $+4^{\circ}\text{C}$ до $+20^{\circ}\text{C}$, але не при більш високих температурах. Фаги PFAV1, PFAV2, PFAV3, PPAV4 і PSAV5 та UAVern, утворювали бляшки на наступний день інкубації, UAntarctica – на третій день, тоді як фаги BSAV6 утворював бляшки на сьомій день від початку інкубації при температурі $+16^{\circ}\text{C}$.

Щоб визначити біологічні властивості ізолюваних фагів, було проведене перехресне зараження фагами усіх бактерій-хазяїв, виділених з антарктичних зразків (табл. 5.2).

Таблиця 5.2.

Перехресне зараження фагами бактерій, виділених з антарктичного регіону

Антарктичні бактеріальні ізоляти / Фаги	PFAV 1	PFAV 2	PFAV 3	PPAV4	PSAV 5	BSAV 6	UA Vern	UAntarctica
<i>Pseudomonas fluorescens</i> FCKU 533	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i> FCKU 534	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> FCKU 538	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. FCKU 539	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> FCKU 540	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> FCKU 542	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> FCKU 537	-	-	-	-	-	+	-	+

«+» – лізис бактеріальної культури (формування бляшок),

«-» – відсутність лізису бактеріальної культури (формування бляшок не відбувається).

Наші результати продемонстрували, що фаги PFAV1 та PFAV2 інфікували

одну і ту саму бактерію хазяїна (*Pseudomonas fluorescens* FCKU 542), що була виділена із того самого зразка, що і фаги. Фаги PFAV1 та PFAV2 не утворювали бляшки на всіх інших бактеріальних штаммах. Так само, фаги PFAV3, PPAV4, PSAV5 та BSAV6 експериментально інфікували лише тих бактерій хазяїв, що були виділені з тих самих зразків, що і фаги: *Pseudomonas fluorescens* FCKU 534, *Pseudomonas putida* FCKU 538, *Pseudomonas sp.* FCKU 539 та *Bacillus subtilis* FCKU 537, відповідно. Отримані дані свідчать про високу специфічність антарктичних фагів щодо їх природних хазяїв та їх не здатність уражувати близькоспоріднені види бактерій, навіть ті, що належать до одного виду *Pseudomonas fluorescens*.

Фаг UAntarctica проявляв біологічну активність до бактерії *Pseudomonas fluorescens* FCKU 533 та *Bacillus subtilis* FCKU 537, фаг UAVern міг інфікувати лише свого природного хазяїна *Pseudomonas sp.* FCKU 539. Однозначно не можна зробити висновок про специфічність фагів, оскільки кількість штамів бактерій обмежена. Але можна припустити, що фаги не заражають близькорідні бактерії та мають високу специфічність щодо природних хазяїв. Ймовірно моноспецифічність фагів ускладнює проведення досліджень пов'язаних в характеристику біологічних особливостей бактеріофагів екстремальних умов, тому усі сучасні дослідники все більше вдаються до метагеномних досліджень. Проаналізувавши геном фагів, ми спробуємо встановити особливості геномів антарктичних фагів та причинно-наслідкові зв'язки взаємодій у системі фаг-бактерія.

5.2. Спектр літичної активності культивованих бактеріофагів

При вивченні репродукції вірусів бактерій в природних екосистемах важливим є визначення спектру літичної активності та ефективності їх репродукції. Для фагів, як для біологічних об'єктів, характерною особливістю є пристосування до умов навколишнього середовища. Значна кількість природних

Для визначення спектру літичної активності були використані лабораторні штами бактерій (помірного клімату), щоб перевірити, чи здатні ізольовані фаги заразити їх (табл 5.3).

Clavibacter michiganensis, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* 8573, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *Serratia marcescens* та *Xanthomonas campestris* інюкулювали фагами PFAV1, PFAV2, PFAV3, PPAV4, PSAV5, BSAV6, UAntarctica та UAVern. Відповідно до отриманих результатів, лише два штами бактерій були чутливими щонайменше до одного з фагів. *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013 був чутливим до фагу PFAV2, тоді як *Pseudomonas fluorescens* 8573 заражався двома фагами – PFAV2 та PFAV3, які заражали різних, хоча і споріднених природних хазяїв (*Pseudomonas fluorescens* FCKU 542 та *Pseudomonas fluorescens* FCKU 534, відповідно). Інші фаги, виділені з антарктичних зразків (PFAV1, PPAV4 і PSAV5), не уражували штами бактерій помірного поясу. Отже, вузький спектр літичної активності може свідчити про існування механізмів пристосувань для ефективної репродукції фагів в природі, що забезпечує збереження генофонду популяції. Обмежений спектр бактерій не дає можливості однозначно стверджувати про широкий або вузький спектр літичної активності, але доповнює наші знання про антарктичні бактеріофаги та демонструє здатність фагів інфікувати та лізувати бактерії, поширені у помірній кліматичній зоні Євразії.

Таким чином, нами вперше охарактеризовано та описано біологічні властивості літичних фагів, виділених із біотопів ґрунту антарктичного регіону. Через складність культивування та особливості взаємодії фагів з бактеріями хазяїнами, дослідження зі застосуванням традиційних методів (метод подвійних агарових шарів) є обмеженими. Як відомо, репродукція вірусів залежить від активності білково-синтезуючих систем бактерій, а реплікація ДНК, синтез білків у бактеріальних організмів сповільнюється за низьких температур. У зв'язку з низьким рівнем чисельності бактеріального планктону у водних середовищах,

існує гіпотеза про поширеність у таких середовищах полівалентних бактеріофагів. Наші результати суперечать цій гіпотезі, що, ймовірно, відображає відмінності в особливостях взаємодії у системі фаг-хазяїн, або їх взаємної доступності в цих умовах [232]. Однак наші дані узгоджуються з біологічними закономірностями, які раніше спостерігалися в наземних біотопах інших кліматичних зон. Було показано, що більшість бактеріальних вірусів є високоспецифічними до одного виду мікроорганізмів (або навіть штаму бактерій) при тестуванні в лабораторії [233]. Антарктичні бактерії могли набути деякі вірусоспецифічні захисні механізми внаслідок спільної коеволюції з антарктичними фагами. Тим не менш, наземні біотопи в Антарктиді все ще залишаються маловивченими у плані біорізноманіття вірусів. Станом на 2022-й рік антарктичних вірусів ґрунту, виділених та культивованих класичними біологічними методами не існує. Наше дослідження вперше доводить існування літичних бактеріофагів у біотопах ґрунтів Антарктичного регіону.

РОЗДІЛ 6. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОФАГІВ *PSEUDOMONAS* PHAGE UAntarctica ТА *PSEUDOMONAS* PHAGE UAvern

Використовуючи колекцію природних бактеріальних хазяїв, а саме бактеріальні ізоляти *Pseudomonas* sp. FCKU 539 та *Pseudomonas fluorescens* FCKU533, нами було успішно виділено два фаги з найвищим титром. Бактеріофаги були культивовані, очищені та секвеновані. Ці фаги отримали назви, що вказують вид чутливої бактерії та зону ізоляції: *Pseudomonas* phage UAntarctica та *Pseudomonas* phage UAvern. Геномні послідовності *Pseudomonas* phage UAntarctica та *Pseudomonas* phage UAvern депоновано через BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?form=history&session=new&tool=genbank>) в публічну базу даних GenBank під номерами доступу MZ605292 та MZ605293, відповідно.

6.1. Загальна характеристика геномів фагів

Секвеновані бактеріофаги були проаналізовані з точки зору біоінформатики. Особливістю геномів фагів UAntarctica та UAvern є те, що вони не виявляють значної подібності до відомих фагових послідовностей, що містяться у відкритих базах даних. Оскільки фаги відносяться до різних родин, то порівнювати їх між собою не доцільно. Хоча геноми фагів між собою мають деякі подібності, а саме вміст G+C пар та розміри геномів (табл 6.1).

Таблиця 6.1.

Загальна характеристика нуклеотидних послідовностей бактеріофагів
UAntarctica та UAVern

Ознака	Фаг	
	UAntarctica	UAVern
Розмір генома, т.п.н.	81,1	101,6
G+C-склад, %	58,4	51,4
Загальна кількість відкритих рам зчитування (ВРЗ)	119	176
Кількість ВРЗ з відомими функціями	23	33
Гени тРНК	3	20

Геном фага UAntarctica представлений дволанцюговою лінійною молекулою ДНК, яка має розмір 81,1 т.п.н. та вміст G+C – 58,4% (рис.6.1). ДНК фага UAntarctica кодує 119 ВРЗ, з них 87 має правосторонню орієнтацію та 32 – лівосторонню. За допомогою аналізу бази даних білків вдалося визначити функціональну приналежність 23 ВРЗ (30,2% від загальної кількості). Геном фага містить гени, що кодують 3 тРНК: tRNA^{Gln}, tRNA^{His}, tRNA^{Met} (додаток В).

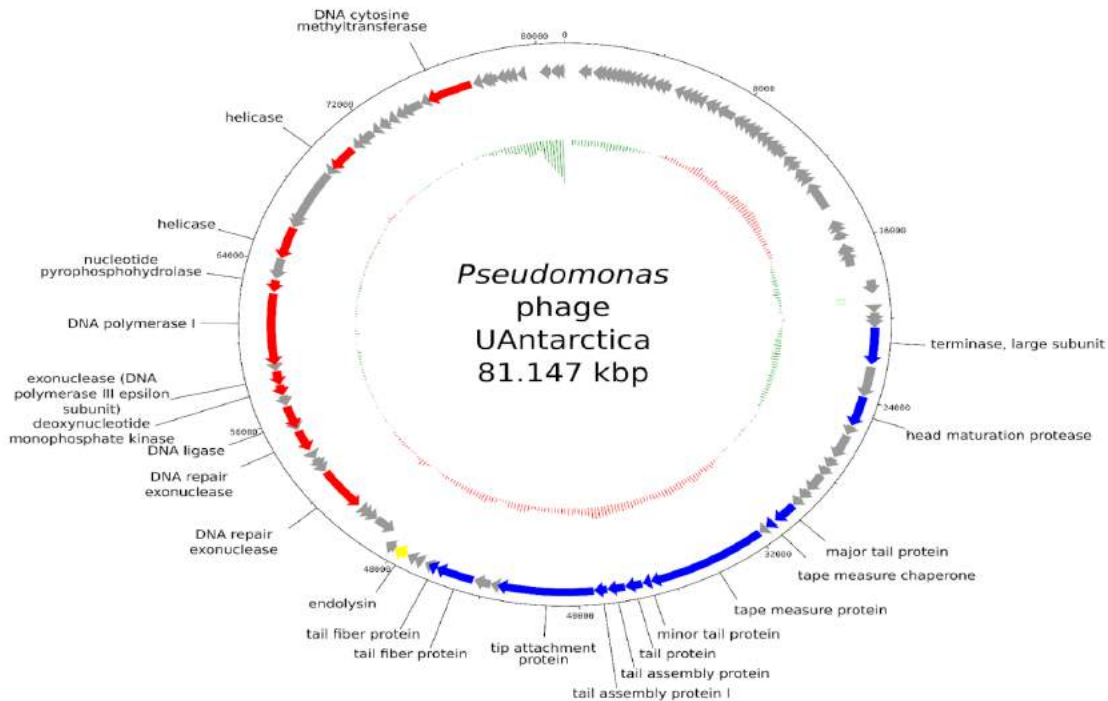


Рис. 6.1. Кільцева карта геному *Pseudomonas* phage UAantarctica. Напрямок транскрипції генів позначено стрілками. Забарвлення стрілок відображає функціональну належність: синій – упаковка ДНК та морфогенез віріону; жовтий – лізис клітин; червоний – реплікація, рекомбінація, репарація, модифікація ДНК; помаранчевий – регуляція транскрипції та трансляції, сірий – гени з невідомими функціями. Внутрішнє коло представляє розподіл GC-пар з позитивними та негативними значеннями червоним та зеленим відповідно. Кольорове кодування генів однакове для всіх наступних рисунків.

Геном фага UAvern містить дволанцюгову лінійною молекулою ДНК, яка має розмір 101.6 т.п.о та вміст G+C – 51,4% (рис.6.2). В геномі фага UAvern знайдено 176 ВРЗ. Кодуючими ДНК ланцюгами є як «мінус» так і «плюс», 117

ВРЗ має лівосторонню орієнтацію та 59 ВРЗ – правосторонню, відповідно. Фаг містить 33 гени, функції білкових продуктів яких було визначено (18,75% від загальної кількості). Генوم фага містить гени, що кодують 20 тРНК (додаток В).

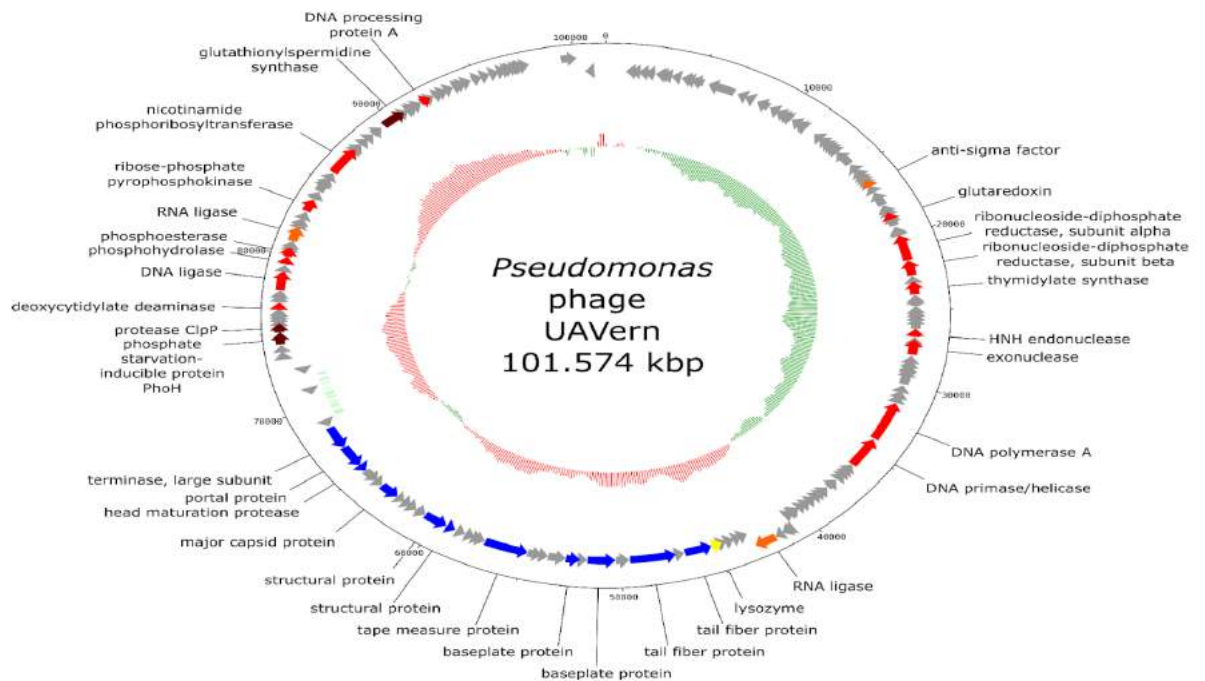


Рис. 6.2. Кільцева карта геному *Pseudomonas* phage UAvern. Напрямок транскрипції генів позначено стрілками. Забарвлення стрілок відображає функціональну приналежність: синій – упаковка ДНК та морфогенез віріону; жовтий – лізис клітин; червоний – реплікація, рекомбінація, репарація, модифікація ДНК; помаранчевий – регуляція транскрипції та трансляції, сірий – гени з невідомими функціями. Внутрішнє коло представляє розподіл GC-пар з позитивними та негативними значеннями червоним та зеленим відповідно. Кольорове кодування генів однакове для всіх наступних рисунків.

Гени фагів UAntarctica та UAVern, анотованих передбаченими функціями, наведено у додатку Б.

Як і для інших бактеріальних вірусів, геноми UAntarctica і UAVern мають модульну організацію геному, який містить найбільше генів для упаковки ДНК і морфогенезу, реплікації, рекомбінації, модифікації ДНК. Гени що кодують тРНК розміщені в окремому кластері. Примітно, що для обох фагів жоден з генів не має гомології з геномними маркерами (послідовності), що вказують на помірний цикл розвитку, детермінанти антибіотикорезистентності, а також фактори вірулентності, тож можемо стверджувати, що фаги є літичними.

6.2. Організація геномів UAntarctica та UAVern

Серед секвенованих раніше геномів вірусів прокаріот UAntarctica та UAVern мали дуже низьку подібність в порівнянні із представниками своїх родин. Для фагу UAntarctica (листопад, 2021) пошук подібних послідовностей виявив лише 2 бактеріофаги: *Pseudomonas* phage Lana (номер Genbank MK473373, 15% coverage, ~ 77,15% sequence identity) та *Pseudomonas* phage PMBT3 (номер Genbank MG596799, 18% coverage, ~ 76,71% sequence identity). Фаг *Pseudomonas* phage Lana (розмір геному 88,4 т.п.н.) був виділений із підземних вод на полігонах кельстофте (Ведбі, Данія), таксономічно належить та є єдиним представником роду *Lanavirus*. Подібність Lana та UAntarctica складає 35,8 % (рис. 6.3 А). Фаг *Pseudomonas* phage PMBT3 (розмір геному 87,1 т.п.н.) виділений зі стічних вод та є єдиним представником роду *Maxrubnervirus*, подібність до фагу UAntarctica складає 37,4% (рис. 6.3 А). Хоча середній розмір геномів фагів родини *Siphoviridae* коливається в межах 50 т.п.н., геном UAntarctica є значно більшим. Так само як і геноми фагів до яких UAntarctica виявляє подібність та складає більше 80 т.п.н.

При аналізі бактеріофага UAVern та пошуку споріднених вірусів з'ясовано, що єдиним близькоспорідненим представником є фаг *Pseudomonas* phage ventosus

(номер Genbank MG018930, 65% coverage, ~ 85,6% sequence identity), відсоток подібності складає 65,5% (рис. 6.3 Б). *Pseudomonas phage ventosus* виділений зі стічних вод та віднесений до некласифікованих представників *Myoviridae*.

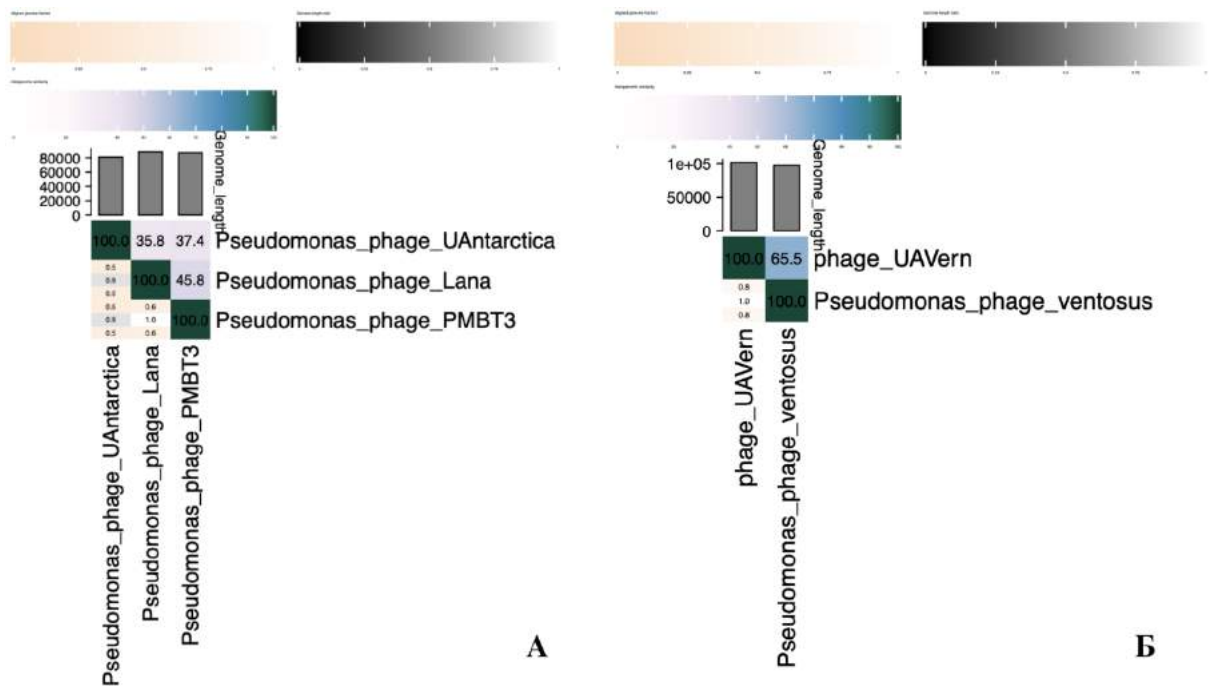


Рис. 6.3. Загальногеномна подібність фагів, визначена за допомогою програмного забезпечення VIRIDIC: А – відсоток ідентичності *Pseudomonas phage UAntarctica* у порівнянні з *Pseudomonas phage Lana* та *Pseudomonas phage PMBT3*, відповідно; Б – відсоток ідентичності *Pseudomonas phage UAVern* у порівнянні з *Pseudomonas phage ventosus*

Функціональні кластери, а саме модулі пакування ДНК, морфогенезу віріону, реплікації ДНК, модулі рекомбінації, модифікації, метаболізму та гени, що кодують тРНК. Далі функціональні модулі будуть описані в контексті подібності та відмінності між представниками, які виявляли хоч і не високий, але достатній для певних висновків відсоток подібності, для фагу *UAntarctica* в порівнянні з

Pseudomonas phage Lana та *Pseudomonas* phage PMBT3, для UAVern у порівнянні з *Pseudomonas* phage ventosus.

Геноми UAntarctica порівнювали з геномами *Pseudomonas* phage Lana та *Pseudomonas* phage PMBT3 за допомогою інструмента візуалізації Easyfig (рис.6.4).

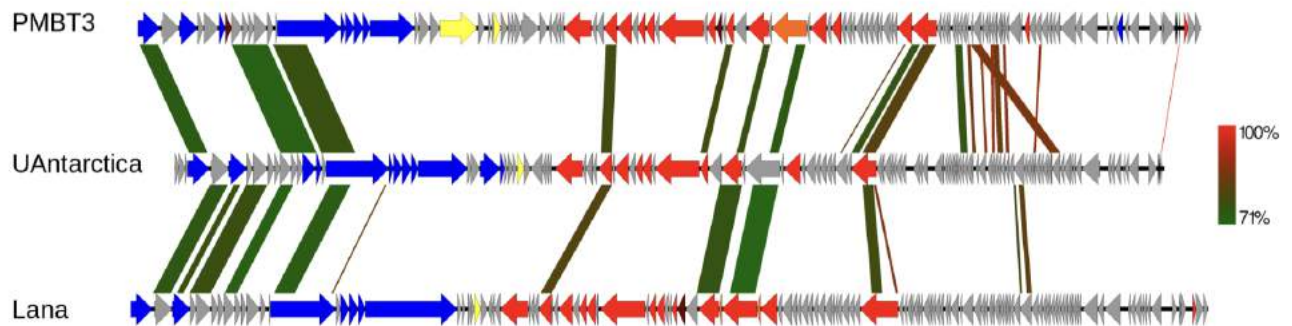


Рис.6.4. Порівняння геному UAntarctica та вибраних представників (Lana і PMBT3), з використанням інструменту візуалізації геному Easyfig. Подібність нуклеотидів у різних областях між геномами наведена у відсотках (шкала справа)

При анотуванні фагових геномів було виокремлено деякі функціональні кластери, а саме модулі ДНК, які відповідають за морфогенез віріону та пакування ДНК (сині стрілки), лізису (жовті стрілки), реплікації (червоні стрілки) та транскрипції і трансляції (помаранчеві стрілки). Перелік виявлених генів, передбачені функції білків та консервативні домени наведені у додатку Б.

При аналізі модуля ДНК пакування та структурного морфогенезу за допомогою пошуку в BLAST вдалося встановити функції деяких білків. Продукт гену 50 – гомологічний до великої субодиниці термінази (TerL) фага Lana (ID 64%) та PMBT3 (ID 62%). Терміназа має консервативний домен – Terminase_GpA (cl21617).

Серед генів, що відповідають за морфогенез капсиду, ідентифіковано протеазу дозрівання капсиду (head maturation protease), її подібність складає 99% з протеазою фагів Lana та PMBT3. Для генів хвостового відростка ймовірні білкові

продукти вдалось визначити для 10 білків. Так, для гену *60* визначено функцію основного білка хостового відростка, доказом цього є консервативний домен Phage_tube_2 (pfam18906). Наступний ген ймовірно кодує білок шаперон. Ген *63* кодує білок-рулетку хвостового відростка з консервативними доменами PhageMin_Tail (cl29167) та PTZ00121 (cl31754), ген *63* є найбільшим геном в геномі фагу UAntarctica (5,148 т.п.н.). Білок-рулетка хвостового відростка виявляє більшу гомологію до білка фагу PMBT3 ніж до – Lana. Після білка-рулетки геном фага UAntarctica має ген *64*, що кодує мінорний хвостовий білок (CD: Phage_min_tail (pfam05939)). Ген *65* також кодує білок-рулетку (CD: (COG4672) та phage_tail_L (TIGR01600, pfam05100), тому можна припустити, що даний білок представлений димером. Ген *66* (CD: MPN_NLPC_P60 (cd08073), Spr (COG0791), Rri1(COG1310), NLPC_P60(pfam00877), Prok-JAB(pfam14464)) та *67* (CD: COG4723) кодують білки, що відповідають за збірку хвостового відростка. Продукт гену *67* виконує функцію прикріплення (CD: COG4733, Phage-tail_3(pfam13550), DUF1983 (pfam09327)). Продукти генів *71* та *72* є фібрилами хвостового відростка.

Серед генів, що кодують білки лізису, ідентифіковано лише ендолізін, що містить консервативні домени – COG3179, chitinase_GH19 (cd00325), Glyco_hydro_19 (pfam00182). Білок не має схожості з білками відомих фагів.

Визначено ймовірні функції 10 білків, що відповідають за реплікацію ДНК. Гени *82* та *86* ймовірно кодують білок, що відповідає за ДНК-репарацію, продукт гену *86* на 99% схожий до білку DNA repair exonuclease фагів PMBT3 та Lana. Білкові продукти містять консервативні домени SbcC super family (cl34857) та SbcD super family (cl33866), відповідно. Ген *86* кодує ДНК – лігазу (CD: Adenylation_DNA_ligase_like super family (cl12015), ген *90* - дезоксинуклеотид монофосфат кіназу, ген *uan091* - екзонуклеазу. Полімераза фага UAntarctica має розмір 3,657 т.п.н. та містить консервативний домен DNA_pol_A (pfam00476). Полімераза подібна на 68,17% та 66,86% до полімераз фагів PMBT3 та Lana, відповідно. Після полімерази розташований ген, що кодує нуклеотид

пірофосфогідролазу, гомологічну до поліпептиду фагів PMBT3 та Lana. Гени 96 та 10 кодують хеліказу (консервативні домени SF2_C_SNF (cd18793) та DEAD-like_helicase_N super family (cl28899), відповідно. ДНК цитозин метилтрансфераза продукт гену 109 має подібність 74,2% та 69,5% до відповідних білків фагів PMBT3 та Lana.

Проаналізувавши амінокислотні послідовності та визначивши гомологію з білками, які мають відому функцію, із 119 генів UAntarctica функції були встановлені лише для 23 ВРЗ. Біоінформатичний аналіз виявив 10 генів, пов'язаних з реплікацією ДНК, рекомбінацією, репарацією, модифікацією та метаболізмом, зокрема екзонуклеази репарації ДНК, кілька компонентів реплісоми, а саме ДНК-лігазу, ДНК-полімеразу I і ДНК-геліказу. Два гени, білкові продукти яких мають відношення до нуклеотидного метаболізму: дезоксинуклеотидмонофосфаткіназа і нуклеотидпірофосфогідролаза. Структурна область геному містить 12 генів із передбаченими функціями для упаковки ДНК, збірку головки та хвостового відростка. Серед генів, пов'язаних з упаковкою ДНК, можна було ідентифікувати лише велику субодиницю термінази (TerL). У кластері генів, що відповідають за збірку головки було анотовано протеазу, що відіграє важливу роль у морфогенезі капсиду [234]. У структурній області геному UAntarctica визначено кластер генів хвостового відростка, зокрема основний білком хвостової трубки, малий хвостовий білок, а також білки-рулетки, білки, що відповідають за збірку хвостового відростку, білки прикріплення фібрил, а також білки, що кодують фібрили хвостового відростку. Крім того, аналіз геному дозволив ідентифікувати ген, який бере участь у взаємодії фаг-хазяїн-ендолізину. Ці білки руйнують пептидоглікан клітинної стінки бактерій та сприяють виходу потомства фага. Гени, що кодують 3 тРНК, розташовані між генами 57 і 86 (додаток Б). Гени UAntarctica, кодують тРНК які є широко використовуваними фагами для забезпечення трансляції і майже, або зовсім відсутні у геномі хазяїна. Це дозволяє посилити (або почати) синтез фагових білків [122].

При аналізі бактеріофага UAVern та пошуку споріднених вірусів виявлено, що єдиним близькоспорідненим представником є фаг *Pseudomonas phage ventosus* (номер Genbank MG018930, 65% coverage, ~ 85,6% sequence identity) (рис. 6.3 Б). *Pseudomonas phage ventosus* виділений зі стічних вод та віднесений до некласифікованих представників *Myoviridae*.

Функціональні кластери, які вдалося виявити під час анотації геному, будуть описані в контексті порівняння з UAVern з Ventosus (рис.6.5).

При анотуванні геному спостерігалася очевидна асиметрія в розподілі генів між двома ланцюгами ДНК фага. 117 ВРЗ транскрибуються з мінус ланцюга ДНК в той час, як інші 59 ВРЗ – з «+» ланцюга ДНК. Біоінформаційний аналіз показав, що гени фага UAVern кодують унікальні білки, які не мають значної ідентичності (значення $E > 0,001$) у порівнянні з відомими білками бази NCBI. Всього вдалося виявити подібність та описати функції 33 білків, більшість з яких мали схожість з білками фагу Ventosus, але деякі були унікальними та мали свої особливості.

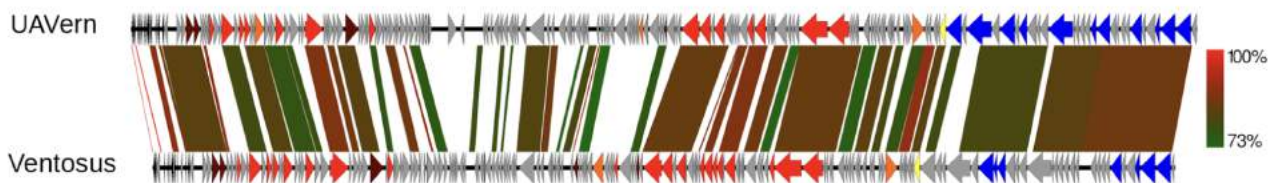


Рис 6.5. Порівняння геному UAVern та Ventosus, використовуючи інструмент візуалізації геному Easyfig. Подібність нуклеотидів у різних областях між геномами наведена у відсотках (шкала справа).

Біоінформатично було встановлено, що геном фага UAVern має 15 генів, пов'язаних з реплікацією ДНК, рекомбінацією, репарацією, модифікацією та метаболізмом. Ген 40 кодує білок, який має домен GrxC (COG0695) глутаредоксину і бере участь у біосинтезі дезоксирибонуклеотидів. Гени 44 і 45

кодують альфа- та бета-субодиниці рибонуклеозид дифосфатредуктази, які беруть участь у синтезі дезоксирибонуклеозидтрифосфатів [235]. Іншими білками, які беруть участь у метаболізмі ДНК, є тимідилатсинтаза (gp47), дезоксицитидилатдеаміназа (gp128), фосфогідролаза (gp133), фосфоестераза (gp134), рибозофосфат пірофосфокіназа (gp141) і фосфогідролаза (gp146). Тимідилатсинтаза (CD: Thy1 super family (c140487)) кодована геном 47 має гомологію до ідентичних білків фагів родини *Myoviridae*, а продукт гену 49 - гіпотетичний білок має консервативний домен (DUF5664 domain-containing protein), який характерний для фагів родини *Siphoviridae*. Гени, що відповідають за реплікацію ДНК, включають ендонуклеазу HNH (ген 54), екзонуклеазу (ген 56) і ДНК-полімеразу А (ген 65). За цими генами розташований ген 66 - ДНК-праймаза. Білки gp131 і gp154 анотовані, як ДНК-лігаза та ДНК процесінг протеїн А, відповідно.

Гени, що кодують білки, пов'язані з транскрипцією та трансляцією, не мають чіткої зони розташування, а знаходяться по всьому геному. Ймовірно, це пов'язано з процесом перемикання білок-синтезуючого апарату бактерії на синтез фагових білків. Так білок anti-sigma factor, що виконує функцію молекулярного перемикача, який одночасно інгібує транскрипцію з бактеріальних промоторів і ранніх промоторів фагів та сприяє транскрипції фагових середніх промоторів, знаходиться перед модулем, що відповідає за реплікацію ДНК. Продукти генів 84 і 137 є гомологами РНК-лігази. Відомо, що цей білок бере участь у сплайсингу та редагування РНК [236]. Білки, що відповідають за лізис, кодуються геном 89. Продукт цього гену на 92% подібний до лізоциму *Pseudomonas phage ventosus* і має консервативний домен, подібний до ендолізину_R21 (cd16900). Також було виявлено кілька генів, що відповідають за метаболізм: phosphate starvation-inducible protein PhoH (gp122) та glutathionylspermidine синтаза (gp152). А також ген 123, який кодує АТФ-залежну серинову протеазу ClpP.

Для фагу UAVern було анотовано 11 білків, що відповідають за функції пакування ДНК та морфогенезу. Модуль генів, який відповідає за морфогенез та

пакування, був ідентичним до відповідного модуля у фага Ventosus, відсоток подібності складав 73-95%. Організація генів модуля морфогенезу починається з гену, що кодує білки хвостової фібрили (ген 90). Наступний білок хвостової фібрили (продукт гену 092 – 2427 т.п.н.) є аномально великим та містить декілька консервативних доменів, зокрема tail fiber protein PNA00430 super family (cl28018) та ruocin_knob (cd19958) – домен піоцинів R1 та R2. Піоцини-бактеріоцини – це білки, які синтезують бактерії роду *Pseudomonas*, основна функція яких знищувати або гальмувати ріст бактерій спорідного виду і штаму *Pseudomonas*. Ген 094 кодує білок базальної пластинки, білок містить консервативний домен Baseplate_J super family (cl01294) та має гомологію 99% до білка базальної пластинки фагів псевдомонад. Наступний білок (продукт гену 095) - гіпотетичний протеїн, але вирівнюється до білка хвостового лізоциму. Цей білок необхідний під час інфекції. Білок фагу gp96 має 2 консервативних домени Phage protein Gp138 N-terminal domain (cl39697), що є адаптером хвостового відростку та Phage_base_V super family (cl17812), яка виконує роль інжектора фагової базальної пластинки. В морфогенезі також бере участь білок gp100, який має домени tape measure domain (cl31236) та HI1514 super family (cl34696). Білок виконує функцію рулетки та контролює довжину хвостового відростка. Наступний блок генів 105 та 106 кодує структурні білки та мають консервативні домени DUF3277 super family (cl1318) та DUF3383 super family (cl20432) відповідно. Білок gp106 вирівнюється та має 99% ідентичність з білком оболонки хвостового відростка (*Pseudomonas* phage phiK7A1, *Pseudomonas* phage PaZq-1, *Pseudomonas* phage Zigelbrucke та інших фагів *Pseudomonas*). Основний компонент скоротливого хвостового відростку – це білок оболонки (gp106), яка під час інфікування скорочується. Оболонка оточує центральну нескоротливу хвостову трубку. Скорочення оболонки допомагає хвостовій трубці проходити через зовнішню мембрану, створюючи канал для вприскування вірусного генетичного матеріалу. Особливістю білка чохла хвостового відростка є те, що він за відсутності білка базальної пластинки або хвостової трубки може самостійно

збиратися як *in vivo*, так й *in vitro* у трубчасті структури різної довжини, які називаються поліоболонками та мають такі спіральні параметри, що і скорочена хвостова трубка. Такі структури беруть участь в утворенні бактеріоцинів. На одній з електронних мікрофотографій вдалось зафіксувати бактеріоцини (рис. 6.6).

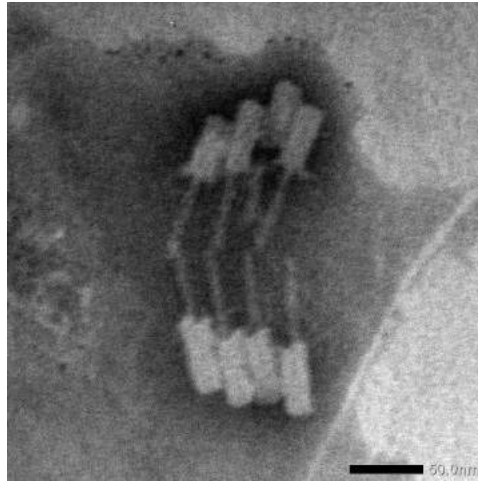


Рис 6.6. Електронно мікроскопічне зображення бактеріоцинів *Pseudomonas* phage UAVern

Після блоку генів хвостового відростка, знаходяться гени капсидних білків: головний капсидний білок (CD: Phage_cap_E (pfam03864)), гіпотетичний білок (CD: HDPD super family (cl03784) Bacteriophage lambda head decoration protein D) та інші структурні білки. Продукт гену *114* – структурний білок (CD: Peptidase_S78_2 super family (cl24270)), який ймовірно виконує функцію протеази та відповідає за дозрівання прокапсиду. За протеазою розмішений ген порталного білка та термінази (CD: Terminase_6C super family (cl02216)). Пакувальна машина хвостатих бактеріофагів складається з двох основних компонентів: порталного білка і терміназного комплексу [237–239]. На основі встановлення подібності з білками інших фагів, білки UAVern gp115 і gp116 були анотовані як порталний білок і велика субодиниця термінази (TerL) відповідно. UAVern TerL містить два консервативних домени, а саме Terminase_6 (pfam03237) присутній на кінці N, та домен COG5362, який можна виявити на кінці C.

Геном UAVern містить кластер із 20 генів, що кодують тРНК, довжина якого становить близько 3 т.п.о (додаток В).

Отже, в результаті дослідження нами вперше анотовано повні геноми двох нових фагів, виділених з ґрунтових біотопів Антарктиди.

6.3. Філогенетичний аналіз

Для фага UAntarctica філогенетичне дерево було побудовано на основі вирівнювання великої субодиниці термінази *terL* з гомологічними білками, отриманими за допомогою BLASTp.

Як показано на рисунку 6.7, UAntarctica являє собою окрему гілку в групі проаналізованих фагів і займає проміжне положення між сифовірусами, що належать до родів *Maxrubnervirus* і *Lanavirus*.

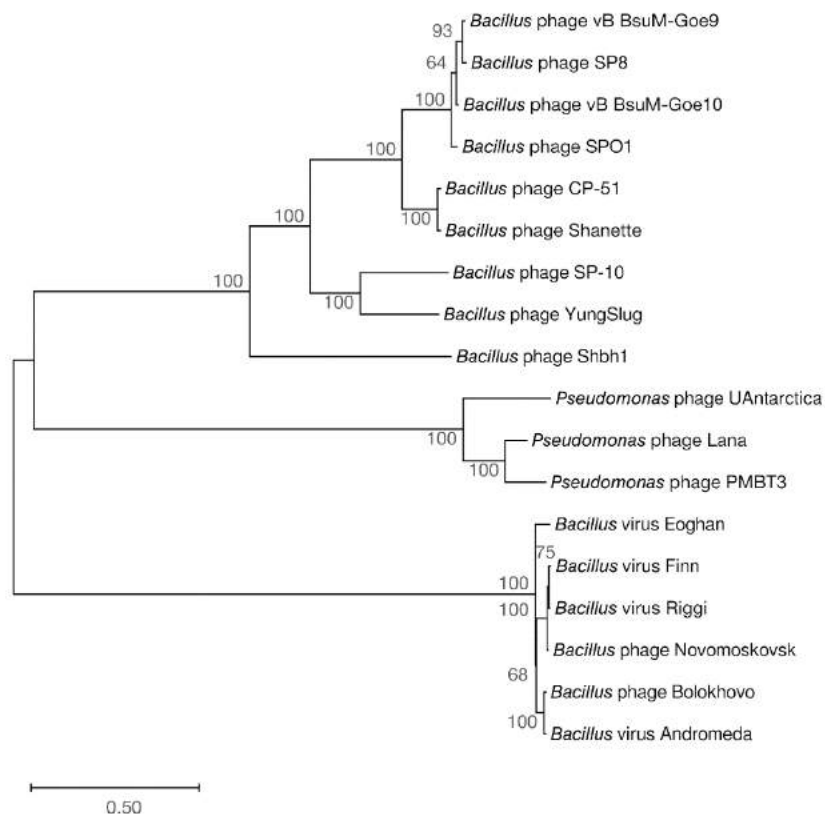


Рис 6.7. Дендрограма побудована на основі амінокислотних послідовностей великої субодиниці термінази фагу UAntarctica та її найближчих гомологів, які уражують бактерії роду *Pseudomonas* та *Bacillus*.

Щоб визначити еволюційний зв'язок фага UAVern, було проведено філогенетичний аналіз на основі об'єднаних (конкатинованих) амінокислотних послідовностей, що кодують основні білки капсиду та базової пластини (рис. 6.8). Отримана дендрограма показує, що UAVern не має близьких родичів серед досліджуваних фагів, крім *Pseudomonas phage ventosus*. Разом вони становлять окрему філогенетичну групу.

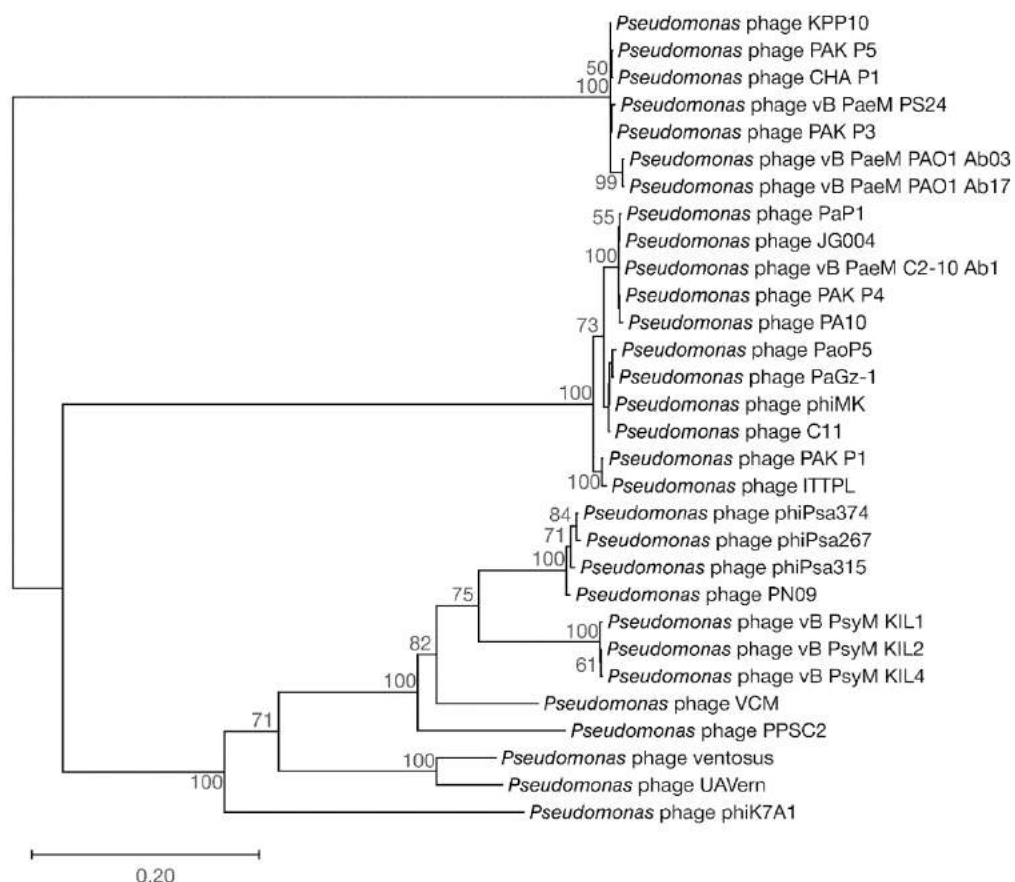


Рис. 6.8. Філогенетичне дерево побудоване на основі об'єднаних амінокислотних послідовностей білка базальної пластинки та основного білка

капсиду. Фаги для побудови дерева були відібрані на основі об'єднаної вибірки бласт-хітів обидвох білків.

Дотримуючись критеріїв виокремлення роду, запропонованих Тернером та співавторами [1], результати порівняльного аналізу геному, проведеного під час цього дослідження, показують, що UAntarctica, а також UAVern, не можуть бути віднесені до жодного роду, визнаного на сьогоднішній день Міжнародним комітетом з питань Таксономії вірусів, а значить представляють нові віруси в родинях *Siphoviridae* та *Myoviridae*, відповідно.

Як відомо з літературних джерел, це перше дослідження по виділенню та секвенуванню геному літичних бактеріофагів, специфічних для антарктичного наземного мікробіому.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Бактеріофаги поширені в усіх екосистемах, де присутні бактерії. Але залишаються частини Земної кулі, де вивчення фагів майже не відбувається. Одним з таких регіонів є Антарктида. Раніше було показано, що антарктичні екосистеми, особливо їх наземні біотопи, мають високий рівень біорізноманіття мікроорганізмів [18,73]. Віруси є потужними факторами, що зумовлюють різноманітність їх хазяїв та еволюцію екосистем в цілому [21,240].

Ґрунтові біотопи Антарктиди є вивченими з точки зору мікробіології. Показано, що питома кількість та різноманіття бактерій в ґрунті можуть бути доволі значними та залежать від місця відбору зразків та властивостей ґрунту [4]. В умовах холодного клімату найчастіше виявляють бактерії, що належать до грамнегативних мікроорганізмів α , β та γ -протеобактерій (*Pseudomonas spp.* та *Vibrio spp.*) та філи *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. Серед грампозитивних бактерій найбільш поширені *Arthrobacter* та *Micrococcus sp.* Серед *Cyanobacteria*, що були ідентифіковані в Антарктиці, найбільш поширеними є представники родів *Oscillatoria*, *Phormidium* та *Nostoc*. Зі зразків ґрунту також були виділені психрофільні дріжджі *Cryptococcus spp.* Дослідження, присвячені визначенню щільності та видовому різноманіттю бактерій Сухих долин (Dry Valleys), показали, що ці локації можуть містити близько 10^6 до 10^8 клітин прокариот у розрахунку на грам субстрату [241].

Відповідно до результатів отриманих за допомогою тест-системи Mikro-La-Test ідентифіковано бактеріальні культури: *Pseudomonas sp.* FCKU 539, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 533, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 534, *Pseudomonas putida* FCKU 538, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 542, *Pseudomonas fluorescens* FCKU 540 та *Micricoccus sp.* FCKU 543. Отримані дані підтверджують домінантність бактерій *Pseudomonas* серед поширених мікроорганізмів у ґрунтах Антарктичного регіону. Відмінною особливістю виділених ізолятів *Pseudomonas* була здатність до певних метаболічних активностей, а саме утилізація ксилози,

арабінози та деяких вуглеводів. Таким чином отримані результати корелюють з попередніми даними щодо різноманіття і не узгоджуються з особливостями біохімічних властивостей мікроорганізмів Антарктичного регіону [115,210].

Віруси – найпоширеніші та найбільш генетично-різноманітні неклітинні форми життя. На кількість та різноманіття вірусів безпосередньо впливає активність та життєдіяльність бактерій [2]. Наявність життєздатної мікрофлори в антарктичних екосистемах передбачає можливість збереження/виживання фагів, а також говорить про те, що більшість вірусів, виявлених у такому середовищі, переважно є фагами. Загальновідомо, що бактеріофаги – це найчисленніша група організмів на Землі, які відіграють важливу екологічну роль у водних та наземних екосистемах. Вони визнані важливим чинником регулювання структури та популяції мікроорганізмів [225,226,242].

Сучасні дослідження проводять за допомогою молекулярних методів, зокрема сиквенсу вірому, але такі дослідження не дають уявлення про особливості функціонування у системі фаг-хазяїн. Складність культивування та втрата інфекційності фагів є найголовнішою проблемою для вивчення їх біологічних властивостей. Використавши у роботі пряме виділення фагів із зразків ґрунту (без використання хімічних речовин) за допомогою диференційного ультрацентрифугування, вдалося досягти виділення вірусних часток та збереження їх інфекційності. Як результат під час виконання дисертаційної роботи з 140 зразків вдалось виділити 32 фагові ізоляти. Зокрема, фаги з довгим скоротливим хвостовим відростком родини *Myoviridae*, фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком - *Siphoviridae* та фаги з коротким хвостовим відростком - родини *Podoviridae*, порядку *Caudovirales*. Морфологію віріонів було встановлено за допомогою електронної мікроскопії. За даними одного з небагатьох досліджень, присвячених вірусам поширених у ґрунтах Антарктиди [11], представники порядку *Caudovirales* домінують за чисельністю. Таким чином отримані результати узгоджуються з попередніми дослідженнями та демонструють високе різноманіття бактеріофагів у ґрунтових біотопах

Антарктиди.

Чимало статей описують біологічні характеристики вірусів, їх ізоляції з полярних областей, але всі вони присвячені дослідженням водних середовищ. Дослідження водного середовища Антарктики показали, що віруси численні та різноманітні, вони здатні змінювати спосіб життя, підлаштовуючись під бактеріальних хазяїв, від псевдолізогенних до літичних, коли кліматичні умови сприяють зростанню бактерій [224,242]. Наскільки нам відомо, на сьогоднішній день існує обмежена кількість робіт, присвячених системам фаг-хазяїн (три дослідження проведені у водних середовищах Арктики й сім – з льоду Балтійського моря [231,243–247]. І лише кілька повідомлень про віруси в антарктичних ґрунтах. В одному з досліджень повідомляється про вдале виділення помірної бактеріофага Psumv2 з бактеріального ізоляту *Psychrobacter sp.* MV2 (ґрунти Сухої Антарктиди). Друге дослідження — це звіт про бактеріофаги, які ймовірно у своєму геномі містять геном іншого фага — так званих «Russian doll viruses», також виділених із сухих долин [132]. У цій роботі була ідентифікована послідовність бактеріофага MZTP02 в геномі бактеріофага SpaA1, виділеного з бактерії *Staphylococcus pastueri*, та в геномі бактеріофага ВсеA1, індукованого з бактерії, що належить до групи *Bacillus thuringiensis*. Обидва дослідження показували наявність профагів у бактеріальних хазяях, але жодних даних щодо наявності літичних фагів в ґрунтах Антарктичного регіону немає. Відсутність даних про літичні фаги, в першу чергу пов'язана зі складністю підбору чутливого бактеріального хазяїна. Виходячи з цих міркувань, дисертаційна робота була зосереджена на виділенні фагів із зразків ґрунту, їх культивуванні, дослідженні системи фаг-бактерія. Використовуючи традиційні методи культивування бактеріофагів, а саме метод подвійних агарових шарів, нами отримано літичні бактеріофаги. Проаналізувавши літературні дані можна стверджувати, що це перші літичні бактеріофаги ґрунтових біотопів Антарктиди. Раніше повідомлялось про наявність лише помірних бактеріофагів. У роботі описано особливості взаємодій 8 пар фаг-хазяїн. Усі результати є унікальними, що

не дає змоги провести паралель з іншими дослідженнями. Нами вперше охарактеризовано літичні фаги ґрунтових біотопів Антарктичного регіону.

Антарктида – найбільш холодне і сухе місце на Землі (Oerlemans). Ґрунти, які не вкриті льодом становлять приблизно 0,4% поверхні континенту та розташовані переважно в прибережних районах, зокрема в місті розташування УАС на Аргентинських островах. Ґрунти піддаються впливу ряду абіотичних факторів, включаючи дуже низьку температуру, високу засоленість, низький рівень вологи, високий рівень УФ-випромінювання, сильні холодні вітри, тощо. Ґрунтові середовища досить бідні, з обмеженою кількістю макро- і мікроелементів, особливо важко доступним елементом є Нітроген. Джерелом отримання бактеріями поживних речовин є продукти фагового лізису.

Відсутні дослідження пов'язані з особливостями геному, базу метавірому антарктичних ґрунтів досі не створено. Наявне лише обмежене число антарктичних метагеномних досліджень, присвячених водним екосистемам [225,242,246]. На сьогоднішній день усі відомі метагеномні дослідження та характеристика фагових геномів поводитись лише для фагів, які були індуковані з культивованих видів бактерій, тобто для помірних фагів [22,130,132]. Наше дослідження спрямоване на характеристику літичних фагів, виділених із біотопів ґрунту антарктичного регіону. Тому із 8 вдало культивованих та біологічно описаних пар фаг-хазяїн було обрано два зразки для проведення секвенування. Секвеновані геноми бактеріофагів були проаналізовані з точки зору біоінформатики. Особливістю геномів фагів UAntarctica та UAVern є те, що вони не виявляють значної подібності до відомих фагових послідовностей, що містяться у відкритих базах даних.

Геном фага UAntarctica представлений дволанцюговою лінійною молекулою ДНК, яка має розмір 81,1 т.п.о, кодує 119 ВРЗ та містить гени, що кодують 3 тРНК: tRNA-Gln, tRNA-His, tRNA-Met. Геном фага UAVern також містить дволанцюгову лінійною молекулою ДНК, яка має розмір 101.6 т.п.о, 176 ВРЗ та містить гени, що кодують 20 тРНК. Роль тРНК для фагів ще досі залишається не зрозумілою.

Існують припущення, що інформація про тРНК в геномі фага дає йому можливість експресувати свої гени, навіть коли генетичний апарат бактеріальних клітин зазнає перебудови (Bailly-Bechet 2007). Наявність великої кількості (20 тРНК) в геномі UAVern може бути пов'язана з адаптаційними особливостями, а також сумісною коеволюцією зі своїм бактеріальним хазяїном.

Серед секвенованих раніше геномів вірусів прокариот UAntarctica та UAVern мають дуже низьку подібність в порівнянні із представниками своїх родин. Для фагу UAntarctica пошук подібних послідовностей виявляє лише 2 бактеріофаги: *Pseudomonas* phage Lana та *Pseudomonas* phage з подібністю 35,8% та 37,4%, відповідно. При аналізі бактеріофага UAVern та пошуку споріднених вірусів єдиним близькоспорідненим представником є фаг *Pseudomonas* phage ventosus, відсоток подібності складає 65,5%

Дотримуючись критеріїв виокремлення роду, запропонованих Тернером та співавторами [1]. А саме, належність фагів до вже відомих родів, або створення нового роду – потрібно, щоб той виявляв не менше 70% нуклеотидної ідентичності повної довжини генома. Результати порівняльного аналізу геному, проведеного під час цього дослідження, показують, що UAntarctica, а також UAVern, не можуть бути віднесені до жодного роду, оскільки не мають відповідної подібності з відомими на сьогоднішній день фагами. А також не можуть утворювати новий рід, оскільки для цього потрібно як мінімум два представника, а значить представляють нові віруси в родинах *Siphoviridae* та *Myoviridae*, відповідно.

В цілому, антарктичні ізоляти бактеріофагів генетично унікальні та не мають подібних собі вірусів бактерій ні на Антарктичному континенті ні за його межами. Встановлена нами біологічна та молекулярно-генетична характеристика ізолятів бактеріофагів має важливе фундаментальне і прикладне значення.

ВИСНОВКИ

Вперше проведено комплексне дослідження ґрунтових біотопів Антарктичного регіону на наявність вірусів бактерій та їх природних хазяїв, вивчено їх біорізноманіття, біологічні та генетичні характеристики.

1. Морфологічно та біохімічно охарактеризовано сім антарктичних культур бактерій та один бактеріальний консорціум. Встановлено, що ідентифіковані бактерії є психротолерантними, однак в експериментальних умовах відзначаються більш ефективним ростом за підвищеної температури +25°C.

2. Зі 140 зразків ґрунту, відібраних під час п'яти Українських антарктичних експедицій (2015–2020 рр.) на станції «Академік Вернадський», були вперше виділені та описані 32 ізоляти фагів. Морфологічний аналіз виділених ізолятів фагів з використанням трансмісійної електронної мікроскопії підтвердив наявність фагів з довгим скоротливим хвостовим відростком, фагів з довгим нескоротливим хвостовим відростком та фагів з коротким нескоротливим хвостовим відростком, які є, відповідно, представниками родин *Myo-*, *Sipho-* та *Podoviridae* порядку *Caudovirales*. Інші морфотипи бактеріофагів в антарктичних зразках під час досліджень виявлені не були, що є підтвердженням їх відносно низького біорізноманіття.

3. Вперше вивчені біологічні властивості 8 антарктичних ізолятів бактеріофагів, особливості їх взаємодії у системі фаг-бактерія (стосовно 18 бактеріальних культур помірного та антарктичного кліматичного регіону). Доведено, що на аналізованих бактеріях досліджувані ізоляти бактеріофагів характеризуються вузьким колом хазяїв та літичним шляхом розвитку, що підтверджується генетичними характеристиками описаних вірусів.

4. В геномі *Pseudomonas* phage UAntarctica ідентифіковано ген ендолізину, продукт якого не має аналогів серед раніше досліджених білків бактеріофагів і може бути перспективним кандидатом для розробки бактеріофагових препаратів у майбутньому. В геномі *Pseudomonas* phage UAVern ідентифіковані унікальні генетичні послідовності, зокрема піоциновий домен, що свідчить про здатність даного бактеріофагу до утворення бактеріоцинів. Аналіз геному фагу UAVern корелює з його здатністю до утворення негативних колоній різного діаметру на газоні чутливої бактеріальної культури.

5. Аналіз геномних послідовностей бактеріофагів *Pseudomonas* phage UAntarctica та *Pseudomonas* phage UAVern підтвердив наявність в них генів, які кодують 3 та 20 тРНК, відповідно. Інформація про тРНК в геномах фагів може бути свідченням адаптаційних особливостей, а також результатом спільної коеволюції зі своїми бактеріальними хазяїнами.

6. За прийнятими критеріями таксономії вірусів та результатами порівняльного генетичного аналізу бактеріофаги *Pseudomonas* phage UAntarctica та *Pseudomonas* phage UAVern є представниками нових родів вірусів мікроорганізмів в межах родин *Siphoviridae* та *Myoviridae*, відповідно.

7. Комплексні результати проведених досліджень ґрунтових біотопів Антарктичних островів свідчать про наявність значної кількості вірусів мікроорганізмів, які відзначаються високою морфологічною гомогенністю, низьким біорізноманіттям у поєднанні зі значними генетичними відмінностями у порівнянні з відомими бактеріофагами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Turner, Dann et al. "A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy." *Viruses* vol. 13,3 506. 18 Mar. 2021.
2. Weinbauer, Markus G. "Ecology of prokaryotic viruses." *FEMS microbiology reviews* 28.2 (2004): 127-181.
3. Clokie, Martha RJ, and Andrew Kropinski, eds. Bacteriophages: methods and protocols, volume 2: molecular and applied aspects. Vol. 502. Humana, 2008.
4. Abedon, S. T., S. Duffy, and P. E. Turner. "Bacteriophage ecology." *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Inc., 2009. 42-57.
5. Wommack, K. Eric. "Viral ecology: old questions, new challenges." *Microbiology Today* (2010): 96-99.
6. Fuhrman, J A. "Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects." *Nature* vol. 399,6736 (1999): 541-8.
7. Bettarel, Yvan, et al. "Viral activity in two contrasting lake ecosystems." *Applied and Environmental Microbiology* 70.5 (2004): 2941-2951.
8. Winget, Danielle M., et al. "Tangential flow diafiltration: an improved technique for estimation of virioplankton production." *Aquatic Microbial Ecology* 41.3 (2005): 221-232.
9. Suttle, Curtis A. "Viruses in the sea." *Nature* vol. 437,7057 (2005): 356-61.
10. Breitbart, Mya. "Marine viruses: truth or dare." *Annual review of marine science* 4 (2012): 425-448.
11. Zablocki, Olivier, Evelien M. Adriaenssens, and Don Cowan. "Diversity and ecology of viruses in hyperarid desert soils." *Applied and environmental microbiology* 82.3 (2016): 770-777.
12. Casas, Veronica, and Forest Rohwer. "Phage metagenomics." *Methods in enzymology* vol. 421 (2007): 259-68.
13. Edwards, Robert A, and Forest Rohwer. "Viral metagenomics." *Nature reviews. Microbiology* vol. 3,6 (2005): 504-10.

14. Breitbart, Mya, and Forest Rohwer. "Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?." *Trends in microbiology* vol. 13,6 (2005): 278-84.
15. Fierer, Noah et al. "Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil." *Applied and environmental microbiology* vol. 73,21 (2007): 7059-66.
16. Angly, Florent E et al. "The marine viromes of four oceanic regions." *PLoS biology* vol. 4,11 (2006): e368.
17. Dinsdale, Elizabeth A et al. "Functional metagenomic profiling of nine biomes." *Nature* vol. 452,7187 (2008): 629-32.
18. Fierer, Noah, and Robert B. Jackson. "The diversity and biogeography of soil bacterial communities." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.3 (2006): 626-631.
19. Kristensen, David M et al. "New dimensions of the virus world discovered through metagenomics." *Trends in microbiology* vol. 18,1 (2010): 11-9.
20. Srinivasiah, Sharath et al. "Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments." *Research in microbiology* vol. 159,5 (2008): 349-57.
21. Suttle, Curtis A. "Marine viruses—major players in the global ecosystem." *Nature reviews microbiology* 5.10 (2007): 801-812.
22. Williamson, Kurt E et al. "Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils." *Applied and environmental microbiology* vol. 71,6 (2005): 3119-25.
23. Williamson, Kurt E et al. "Incidence of lysogeny within temperate and extreme soil environments." *Environmental microbiology* vol. 9,10 (2007): 2563-74.
24. Prestel, Eric, et al. "The bacteria and bacteriophages from a Mesquite Flats site of the Death Valley desert." *Antonie Van Leeuwenhoek* 103.6 (2013): 1329-1341.
25. Wall, Diana H., and Ross A. Virginia. "Controls on soil biodiversity: insights from extreme environments." *Applied Soil Ecology* 13.2 (1999): 137-150.
26. Breitbart, Mya et al. "Phage puppet masters of the marine microbial realm." *Nature microbiology* vol. 3,7 (2018): 754-766.

27. Guixa-Boixereu, Núria, et al. "Viral distribution and activity in Antarctic waters." *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 49.4-5 (2002): 827-845.
28. Suttle, Curtis A., Amy M. Chan, and Matthew T. Cottrell. "Virus ecology." *Nature* 351.6328 (1991): 612-613.
29. Sime-Ngando, Téléphore. "Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems." *Frontiers in microbiology* 5 (2014): 355.
30. Bérard, Sèverine, et al. "Aligning the unalignable: bacteriophage whole genome alignments." *BMC bioinformatics* 17.1 (2016): 1-13.
31. King, Andrew MQ, et al. "Virus taxonomy." *Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* 9 (2012).
32. Ackermann, H-W. "5500 Phages examined in the electron microscope." *Archives of virology* vol. 152,2 (2007): 227-43.
33. Ackermann, Hans-W. "Classification of bacteriophages." *The bacteriophages* 2 (2006): 8-16.
34. Lavigne, Rob et al. "Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools." *Research in microbiology* vol. 159,5 (2008): 406-14.
35. Lavigne, Rob, et al. "Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity." *BMC microbiology* 9.1 (2009): 1-16.
36. Krupovic, Mart, et al. "Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee." *Archives of virology* 161.4 (2016): 1095-1099.
37. Adriaenssens, Evelien M et al. "Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee." *Archives of virology* vol. 163,4 (2018): 1125-1129.
38. Adriaenssens, Evelien M et al. "Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee." *Archives of virology* vol. 165,5 (2020): 1253-1260.

39. Barylski, Jakub et al. "Analysis of Spounaviruses as a Case Study for the Overdue Reclassification of Tailed Phages." *Systematic biology* vol. 69,1 (2020): 110-123.
40. Barylski, Jakub et al. "ICTV Virus Taxonomy Profile: *Herelleviridae*." *The Journal of general virology* vol. 101,4 (2020): 362-363.
41. Barbosa, Andrés, and María José Palacios. "Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases." *Polar biology* vol. 32,8 (2009): 1095.
42. Gauthier-Clerc, Michel, et al. "Serological survey of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*, in Crozet Archipelago for antibodies to infectious bursal disease, influenza A and Newcastle disease viruses." *Polar Biology* 25.4 (2002): 316-319.
43. Miller, Patti J., et al. "Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands." *Journal of virology* 84.21 (2010): 11496-11504.
44. Morgan, I R et al. "A survey of virus infection in sub-antarctic penguins on Macquarie Island, Southern Ocean." *Australian veterinary journal* vol. 57,7 (1981): 333-5.
45. Thomazelli, Luciano M et al. "Newcastle disease virus in penguins from King George Island on the Antarctic region." *Veterinary microbiology* vol. 146,1-2 (2010): 155-60.
46. Wallensten, Anders, et al. "Mounting evidence for the presence of influenza A virus in the avifauna of the Antarctic region." *Antarctic Science* 18.3 (2006): 353-356.
47. Briggs, L C et al. "Development of a highly sensitive screen for influenza A in guano and its application in the search for ancient RNA preserved under Antarctic Adelie penguin colonies." *Avian diseases* vol. 47,3 Suppl (2003): 1200-2.
48. Bengtson, John L., et al. "Antibodies to canine distemper virus in Antarctic seals." *Marine Mammal Science* 7.1 (1991): 85-87.

49. Harder, T. C., Joachim Plötz, and B. Liess. "Antibodies against European phocine herpesvirus isolates detected in sera of Antarctic seals." *Polar Biology* 11.7 (1991): 509-512.
50. Nelson, Anna E., et al. "Age, geographical distribution and taphonomy of an unusual occurrence of mummified crabeater seals on James Ross Island, Antarctic Peninsula." *Antarctic Science* 20.5 (2008): 485-493.
51. Tryland, Morten, et al. "Serum chemistry and antibodies against pathogens in antarctic fur seals, Weddell seals, crabeater seals, and Ross seals." *Journal of Wildlife Diseases* 48.3 (2012): 632-645.
52. Kennedy, Judith M et al. "Canine and Phocine Distemper Viruses: Global Spread and Genetic Basis of Jumping Species Barriers." *Viruses* vol. 11,10 944. 14 Oct. 2019.
53. Barbosa, Andrés, and María José Palacios. "Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases." *Polar biology* vol. 32,8 (2009): 1095.
54. Grimaldi, Wray, Julia Jabour, and Eric J. Woehler. "Considerations for minimising the spread of infectious disease in Antarctic seabirds and seals." *Polar Record* 47.1 (2011): 56-66.
55. Cowan, Don A., et al. "Non-indigenous microorganisms in the Antarctic: assessing the risks." *Trends in microbiology* 19.11 (2011): 540-548.
56. Pearce, David A., and William H. Wilson. "Viruses in Antarctic ecosystems." *Antarctic Science* 15.3 (2003): 319-331.
57. Kerry, Knowles R., and Martin J. Riddle, eds. *Health of Antarctic wildlife: a challenge for science and policy*. Vol. 2009. New York: Springer, 2009.
58. Долгорукова, С. В., et al. "Скринінг вірусних антигенів у рослинах *Deschampsia antarctica* та *Colobanthus quitensis*." *Український антарктичний журнал* (2010).
59. Skotnicki, Mary, et al. "The first subantarctic plant virus report: Stilbocarpa mosaic bacilliform badnavirus (SMBV) from Macquarie Island." *Polar Biology* 26.1 (2003): 1-7.

60. Polischuk, Valery et al. "Evidence for plant viruses in the region of Argentina Islands, Antarctica." *FEMS microbiology ecology* vol. 59,2 (2007): 409-17
61. Поліщук, В. П., et al. "Комплексне вивчення антарктичної біоти." *Український антарктичний журнал* (2009).
62. Parnikoza, I. Yu, et al. "Habitat and leaf cytogenetic characteristics of *Deschampsia antarctica* Desv. in the Maritime Antarctica." *Polar Science* 1.2-4 (2007): 121-128.
63. Abraham, Shalin, Michael J. Somers, and Steven L. Chown. "Seasonal, altitudinal and host plant-related variation in the abundance of aphids (Insecta, Hemiptera) on sub-Antarctic Marion Island." *Polar biology* 34.4 (2011): 513-520.
64. Bale, J. S., W. Block, and M. R. Worland. "Thermal tolerance and acclimation response of larvae of the sub-Antarctic beetle *Hydromedion sparsutum* (Coleoptera: Perimylopidae)." *Polar Biology* 23.2 (2000): 77-84.
65. Hulle, Maurice, et al. "Aphids of sub-Antarctic Iles Crozet and Kerguelen: species diversity, host range and spatial distribution." *Antarctic Science* 15.2 (2003): 203-209.
66. Lavysh, Daria, et al. "The genome of AR9, a giant transducing *Bacillus* phage encoding two multisubunit RNA polymerases." *Virology* 495 (2016): 185-196.
67. Chong, Chun Wie, et al. "High levels of spatial heterogeneity in the biodiversity of soil prokaryotes on Signy Island, Antarctica." *Soil Biology and Biochemistry* 42.4 (2010): 601-610.
68. Lee, Charles K., et al. "The inter-valley soil comparative survey: the ecology of Dry Valley edaphic microbial communities." *The ISME journal* 6.5 (2012): 1046-1057.
69. Smith, Julie L., et al. "Resolving environmental drivers of microbial community structure in Antarctic soils." *Antarctic Science* 22.6 (2010): 673-680.
70. Yergeau, Etienne, et al. "Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats." *Environmental microbiology* 9.11 (2007): 2670-2682.

71. Aislabie, J. M., S. Jordan, and G. M. Barker. "Relation between soil classification and bacterial diversity in soils of the Ross Sea region, Antarctica." *Geoderma* 144.1-2 (2008): 9-20.
72. Niederberger, Thomas D., et al. "Microbial community composition of transiently wetted Antarctic Dry Valley soils." *Frontiers in Microbiology* 6 (2015): 9.
73. Niederberger, Thomas D., et al. "Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica." *Environmental microbiology* 10.7 (2008): 1713-1724.
74. Lawley, Blair, et al. "Molecular analysis of geographic patterns of eukaryotic diversity in Antarctic soils." *Applied and Environmental Microbiology* 70.10 (2004): 5963-5972.
75. Fell, Jack W., et al. "Biodiversity of micro-eukaryotes in Antarctic Dry Valley soils with < 5% soil moisture." *Soil Biology and Biochemistry* 38.10 (2006): 3107-3119
76. Czechowski, Paul, et al. "Antarctic eukaryotic soil diversity of the Prince Charles Mountains revealed by high-throughput sequencing." *Soil Biology and Biochemistry* 95 (2016): 112-121.
77. Zablocki, Olivier, et al. "High-level diversity of tailed phages, eukaryote-associated viruses, and virophage-like elements in the metaviromes of antarctic soils." *Applied and environmental microbiology* 80.22 (2014): 6888-6897.
78. Cai, Lanlan, et al. "Metagenomic analysis of virioplankton of the subtropical Jiulong River estuary, China." *Viruses* 8.2 (2016): 35.
79. Gong, Zheng, et al. "Viral diversity and its relationship with environmental factors at the surface and deep sea of Prydz Bay, Antarctica." *Frontiers in microbiology* 9 (2018): 2981.
80. Bezuidt, Oliver KI, et al. "Phages actively challenge niche communities in Antarctic soils." *Msystems* 5.3 (2020): e00234-20.
81. Wei, Sean TS, et al. "Genetic signatures indicate widespread antibiotic resistance and phage infection in microbial communities of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica." *Polar Biology* 38.6 (2015): 919-925.

82. Hopkins, David William, M. M. Swanson, and M. E. Taliany. "What do we know about viruses in terrestrial Antarctica?." *Antarctic Terrestrial Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. 79-90
83. Fauquet, C. M., et al. "Sequence analysis and classification of apparent recombinant begomoviruses infecting tomato in the Nile and Mediterranean basins." *Phytopathology* 95.5 (2005): 549-555
84. Ackermann, Hans-W. "Bacteriophage classification." *Bacteriophages: biology and applications* (2005): 67-89.
85. Abedon, Stephen T., ed. *Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*. Vol. 15. Cambridge University Press, 2008.
86. Ackermann, H-W. "Bacteriophage observations and evolution." *Research in Microbiology* 154.4 (2003): 245-251.
87. Krupovic, Mart, et al. "Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75.4 (2011): 610-635.
88. Bondy-Denomy, Joseph, and Alan R. Davidson. "When a virus is not a parasite: the beneficial effects of prophages on bacterial fitness." *Journal of microbiology* 52.3 (2014): 235-242.
89. Rohwer, F., et al. "Life in Our Phage World: A Centennial Field Guide to the Earth's Most Diverse Inhabitants (Wholon, San Diego)." (2014).
90. Kutter, Elizabeth, and Alexander Sulakvelidze, eds. *Bacteriophages: biology and applications*. Crc press, 2004.
91. Paul, John H. "Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas?." *The ISME journal* 2.6 (2008): 579-589.
92. Erez, Zohar, et al. "Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions." *Nature* 541.7638 (2017): 488-493.
93. Dou, Chao, et al. "Structural and functional insights into the regulation of the lysis–lysogeny decision in viral communities." *Nature microbiology* 3.11 (2018): 1285-1294.

94. Jiang, S. C., and John H. Paul. "Significance of lysogeny in the marine environment: studies with isolates and a model of lysogenic phage production." *Microbial ecology* 35.3 (1998): 235-243.
95. McDaniel, Lauren D., and John H. Paul. "Temperate and lytic cyanophages from the Gulf of Mexico." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86.3 (2006): 517-527.
96. Williams, Kelly P. "Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies." *Nucleic acids research* 30.4 (2002): 866-875.
97. Ortiz, Max, et al. "Microbial nitrogen cycling in Antarctic soils." *Microorganisms* 8.9 (2020): 1442.
98. Sanger, Frederick, et al. "Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA." *nature* 265.5596 (1977): 687-695.
99. Sanger, F., et al. "Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA." *Journal of molecular biology* 162.4 (1982): 729-773.
100. Dunn, John J., F. William Studier, and M. Gottesman. "Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements." *Journal of molecular biology* 166.4 (1983): 477-535.
101. Hatfull, Graham F., and Gary J. Sarkis. "DNA sequence, structure and gene expression of mycobacteriophage L5: a phage system for mycobacterial genetics." *Molecular microbiology* 7.3 (1993): 395-405.
102. Hatfull, Graham F., et al. "Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform." *PLoS genetics* 2.6 (2006): e92.
103. Kwan, Tony, et al. "The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.14 (2005): 5174-5179.
104. Kwan, Tony, et al. "Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages." *Journal of bacteriology* 188.3 (2006): 1184-1187.

105. Casjens, Sherwood R. "Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages." *Current opinion in microbiology* 8.4 (2005): 451-458.
106. Pedulla, Marisa L., et al. "Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes." *Cell* 113.2 (2003): 171-182.
107. Aziz, Ramy K., et al. "The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology." *BMC genomics* 9.1 (2008): 1-15.
108. Brettin, Thomas, et al. "RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes." *Scientific reports* 5.1 (2015): 1-6.
109. Barrett, J. E., et al. "Terrestrial ecosystem processes of Victoria land, Antarctica." *Soil Biology and Biochemistry* 38.10 (2006): 3019-3034.
110. Borodovsky, Mark, et al. "Detection of new genes in a bacterial genome using Markov models for three gene classes." *Nucleic acids research* 23.17 (1995): 3554-3562.
111. Lukashin, Alexander V., and Mark Borodovsky. "GeneMark. hmm: new solutions for gene finding." *Nucleic acids research* 26.4 (1998): 1107-1115.
112. Krause, Lutz, et al. "GISMO—gene identification using a support vector machine for ORF classification." *Nucleic acids research* 35.2 (2007): 540-549.
113. Delcher, Arthur L., et al. "Improved microbial gene identification with GLIMMER." *Nucleic acids research* 27.23 (1999): 4636-4641.
114. Kelley, David R., et al. "Gene prediction with Glimmer for metagenomic sequences augmented by classification and clustering." *Nucleic acids research* 40.1 (2012): e9-e9.
115. Noguchi, Hideki, Takeaki Taniguchi, and Takehiko Itoh. "MetaGeneAnnotator: detecting species-specific patterns of ribosomal binding site for precise gene prediction in anonymous prokaryotic and phage genomes." *DNA research* 15.6 (2008): 387-396.
116. Hyatt, Doug, et al. "Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification." *BMC bioinformatics* 11.1 (2010): 1-11.

117. Summer, Elizabeth J., et al. "Rz/Rz1 lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts." *Journal of molecular biology* 373.5 (2007): 1098-1112.
118. Walker, Peter J., et al. "Evolution of genome size and complexity in the Rhabdoviridae." *PLoS pathogens* 11.2 (2015): e1004664.
119. McNair, Katelyn, et al. "Phage genome annotation using the RAST pipeline." *Bacteriophages*. Humana Press, New York, NY, 2018. 231-238.
120. Lowe, Todd M., and Sean R. Eddy. "tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence." *Nucleic acids research* 25.5 (1997): 955-964.
121. Nawrocki, Eric P. "Annotating functional RNAs in genomes using Infernal." *RNA sequence, structure, and function: computational and bioinformatic methods*. Humana Press, Totowa, NJ, 2014. 163-197.
122. Bailly-Bechet, Marc, Massimo Vergassola, and Eduardo Rocha. "Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages." *Genome research* 17.10 (2007): 1486-1495.
123. Williamson, S. J., et al. "Seasonal variation in lysogeny as depicted by prophage induction in Tampa Bay, Florida." *Applied and environmental microbiology* 68.9 (2002): 4307-4314.
124. Cassman, Noriko, et al. "Oxygen minimum zones harbour novel viral communities with low diversity." *Environmental microbiology* 14.11 (2012): 3043-3065.
125. Desnues, Christelle, et al. "Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites." *Nature* 452.7185 (2008): 340-343.
126. Makhalanyane, Thulani P., et al. "Evidence for successional development in Antarctic hypolithic bacterial communities." *The ISME journal* 7.11 (2013): 2080-2090.
127. Gaia, Morgan, et al. "Zamilon, a novel virophage with Mimiviridae host specificity." *PLoS One* 9.4 (2014): e94923.
128. Srinivasiah, Sharath, et al. "Direct assessment of viral diversity in soils by random PCR amplification of polymorphic DNA." *Applied and environmental microbiology* 79.18 (2013): 5450-5457.

129. Swanson, M. M., et al. "Viruses in soils: morphological diversity and abundance in the rhizosphere." *Annals of Applied Biology* 155.1 (2009): 51-60.
130. Meiring, Tracy L., et al. "Genome sequence of temperate bacteriophage Psymv2 from Antarctic Dry Valley soil isolate Psychrobacter sp. MV2." *Extremophiles* 16.5 (2012): 715-726.
131. Pearce, David Anthony, et al. "Metagenomic analysis of a southern maritime Antarctic soil." *Frontiers in Microbiology* 3 (2012): 403.
132. Swanson, Maud M., et al. "Novel bacteriophages containing a genome of another bacteriophage within their genomes." *PloS one* 7.7 (2012): e40683.
133. Adriaenssens, Evelien M., et al. "Metagenomic analysis of the viral community in Namib Desert hypoliths." *Environmental microbiology* 17.2 (2015): 480-495.
134. Srinivasiah, Sharath, et al. "Direct assessment of viral diversity in soils by random PCR amplification of polymorphic DNA." *Applied and environmental microbiology* 79.18 (2013): 5450-5457.
135. Hopkins, D. W., et al. "Controls on the distribution of productivity and organic resources in Antarctic Dry Valley soils." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273.1602 (2006): 2687-2695.
136. Cary, S. Craig, et al. "On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils." *Nature Reviews Microbiology* 8.2 (2010): 129-138.
137. Darling, Chester A., and Paul A. Siple. "Bacteria of Antarctica." *Journal of bacteriology* 42.1 (1941): 83-98.
138. Johnson, Roy M., and JOHNSON RM. "taxonomy of antarctic bacteria from soils and air primarily of the mc murdo station and victoria land dry valleys region." (1978).
139. Smith, Jacques J., et al. "Bacterial diversity in three different Antarctic cold desert mineral soils." *Microbial Ecology* 51.4 (2006): 413-421.
140. Cowan, Don A., et al. "Antarctic Dry Valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass." *Extremophiles* 6.5 (2002): 431-436.
141. Tindall, B. J. "Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg." *Microbial ecology* 47.3 (2004): 271-283.

142. Terauds, Aleks, et al. "Conservation biogeography of the Antarctic." *Diversity and distributions* 18.7 (2012): 726-741.
143. Bottos, Eric M., et al. "Airborne bacterial populations above desert soils of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica." *Microbial ecology* 67.1 (2014): 120-128.
144. Bottos, Eric M., et al. "Bacterial community structures of Antarctic soils." *Antarctic terrestrial microbiology* (2014): 9-33.
145. Jenny, Hans. *Factors of soil formation: a system of quantitative pedology*. Courier Corporation, 1994.
146. Campbell, Iain Bruce, and G. G. C. Claridge. *Antarctica: soils, weathering processes and environment*. Elsevier, 1987.
147. Saul, David J., et al. "Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica." *FEMS Microbiology Ecology* 53.1 (2005): 141-155.
148. Aislabie, Jackie M., et al. "Dominant bacteria in soils of Marble point and Wright valley, Victoria land, Antarctica." *Soil Biology and Biochemistry* 38.10 (2006): 3041-3056.
149. Aislabie, J., et al. "Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica." *Canadian journal of microbiology* 55.1 (2009): 21-36.
150. Balks, Megan R., et al. "Windows on Antarctic soil–landscape relationships: comparison across selected regions of Antarctica." *Geological Society, London, Special Publications* 381.1 (2013): 397-410.
151. Chown, Steven L., and Peter Convey. "Spatial and temporal variability across life's hierarchies in the terrestrial Antarctic." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362.1488 (2007): 2307-2331.
152. Yergeau, Etienne, et al. "Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities." *The ISME journal* 3.3 (2009): 340-351.
153. Connon, Stephanie A., and Stephen J. Giovannoni. "High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates." *Applied and environmental microbiology* 68.8 (2002): 3878-3885.

154. Antibus, Doug E., et al. "Cultivable bacteria from ancient algal mats from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica." *Extremophiles* 16.1 (2012): 105-114.
155. Orellana-Saez, Matias, et al. "In-depth genomic and phenotypic characterization of the antarctic psychrotolerant strain *Pseudomonas* sp. MPC6 reveals unique metabolic features, plasticity, and biotechnological potential." *Frontiers in microbiology* 10 (2019): 1154.
156. Cho, Jang-Cheon, and Stephen J. Giovannoni. "Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 70.1 (2004): 432-440.
157. Pulschen, Andre A., et al. "Isolation of uncultured bacteria from Antarctica using long incubation periods and low nutritional media." *Frontiers in microbiology* 8 (2017): 1346.
158. Rojas, Jose Luis, et al. "Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites." *Marine Genomics* 2.1 (2009): 33-41.
159. Gregersen, T. "Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria." *European journal of applied microbiology and biotechnology* 5.2 (1978): 123-127.
160. Silhavy, Thomas J., Daniel Kahne, and Suzanne Walker. "The bacterial cell envelope." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2.5 (2010): a000414.
161. Bauman, Robert W., and Todd P. Primm. *Microbiology with diseases by body system*. Pearson, 2018.
162. Spanu, Teresa, et al. "Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of staphylococci from bloodstream infections." *Journal of clinical microbiology* 41.9 (2003): 4259-4263.
163. Cowan, ST. Identification of medical Bacteria. In: Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, Barrow, G.I. (Ed.) *Cambridge University Press*. Cambridge. 1973.

164. HEMRAJ, V., S. Diksha, and G. AVNEET. "A REVIEW ON COMMONLY USED BIOCHEMICAL TEST FOR BACTERIA". *Innovare Journal of Life Sciences*, vol. 1, no. 1, Apr. 2013, pp. 1-7.
165. Cook, G. T. "A plate test for nitrate reduction." *Journal of Clinical Pathology* 3.4 (1950): 359.
166. Leijh, P. C., et al. "Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages." *Infection and immunity* 46.2 (1984): 448-452.
167. Taylor, Welton I., and David Achanzar. "Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae." *Applied microbiology* 24.1 (1972): 58-61.
168. Schau, H P. "J. F. MacFaddin, Media for Isolation - Cultivation - Identification - Maintenance of Medical Bacteria, Volume I. XI + 929 S., 163 Abb., 94 Tab. Baltimore, London 1985. Williams and Wilkins. \$ 90.00. ISBN: 0-683-05316-7." *Journal of Basic Microbiology* 26 (1986): 240-240.
169. Edwards, Philip R., and William Howell Ewing. "Identification of enterobacteriaceae." *Identification of Enterobacteriaceae*. Third edition (1972).
170. Wasserman, Aaron E. "Absorption and fluorescence of water-soluble pigments produced by four species of Pseudomonas." *Applied microbiology* 13.2 (1965): 175-180.
171. Miller, Jeffrey H. "Experiments in molecular genetics." (1972).
172. Kushkevych, Ivan, et al. "Microscopic Methods for Identification of Sulfate-Reducing Bacteria from Various Habitats." *International Journal of Molecular Sciences* 22.8 (2021): 4007.
173. Zhang, Zhen-yu, et al. "Cultivable anaerobic and aerobic bacterial communities in the fermentation chambers of *Holotrichia parallela* (coleoptera: scarabaeidae) larvae." *Plos one* 13.1 (2018): e0190663.
174. Адамс, М. Бактериофаги. М.: Мир, (1961).
175. Товкач, Ф. И., Т. В. Иваница, and А. И. Кушкина. "Характеристика дефектных частиц вирусной природы у бактерий рода *Erwinia*." (2008).

176. Sambrook, J., and D. W. Russell. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn 2001 Cold Spring Harbor."
177. Hansen, Martin Christian, et al. "Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region." *FEMS Microbiology Ecology* 26.2 (1998): 141-149.
178. Spencer, R. "Indigenous marine bacteriophages." *Journal of Bacteriology* 79.4 (1960): 614-614.
179. Brum, Jennifer R., and Matthew B. Sullivan. "Rising to the challenge: accelerated pace of discovery transforms marine virology." *Nature Reviews Microbiology* 13.3 (2015): 147-159.
180. Moebus, K. "Lytic and inhibition responses to bacteriophages among marine bacteria, with special reference to the origin of phage-host systems." *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 36.4 (1983): 375-391.
181. Kutter, Elizabeth. "Phage host range and efficiency of plating." *Bacteriophages*. Humana Press, 2009. 141-149.
182. Ackerman, H. W., and M. S. DuBow. "Viruses of prokaryotes." *General properties of bacteriophages* 1 (1987): 49-85.
183. Ackermann, Hans-W. "Phage classification and characterization." *Bacteriophages*. Humana press, 2009. 127-140.
184. Айала, Ф., and Дж Кайгер. *Современная генетика*. Рипол Классик, 1988.
185. Pickard, Derek John Juan. "Preparation of bacteriophage lysates and pure DNA." *Bacteriophages*. Humana Press, 2009. 3-9.
186. Brüssow, Harald, and Roger W. Hendrix. "Phage genomics: small is beautiful." *Cell* 108.1 (2002): 13-16.
187. Mikheyev, Alexander S., and Mandy MY Tin. "A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer." *Molecular ecology resources* 14.6 (2014): 1097-1102.
188. Ip, Camilla LC, et al. "MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 data release and analysis." *F1000Research* 4 (2015).

189. Besemer, John, Alexandre Lomsadze, and Mark Borodovsky. "GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions." *Nucleic acids research* 29.12 (2001): 2607-2618.
190. Gasteiger, Elisabeth, et al. "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server." *The proteomics protocols handbook* (2005): 571-607.
191. Moraru, Cristina, Arvind Varsani, and Andrew M. Kropinski. "VIRIDIC—A novel tool to calculate the intergenomic similarities of prokaryote-infecting viruses." *Viruses* 12.11 (2020): 1268.
192. Marchler-Bauer, A., et al. "Der-p2 (Dermatophagoides pteronyssinus) allergen-like protein from the hard tick Ixodes ricinus—a novel member of ML (MD-2-related lipid-recognition) domain protein family." *Nucleic Acids Research* 32 (2004): W327-W331.
193. Chan, P. P., and T. M. Lowe. "Gene prediction, methods and protocols." *Methods in Molecular Biology* 1962 (2019): 1-14.
194. Laslett, Dean, and Bjorn Canback. "ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences." *Nucleic acids research* 32.1 (2004): 11-16.
195. Naville, Magali, et al. "ARNold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators." *RNA biology* 8.1 (2011): 11-13.
196. Okonechnikov, Konstantin, et al. "Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit." *Bioinformatics* 28.8 (2012): 1166-1167.
197. Kumar, Sudhir, et al. "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms." *Molecular biology and evolution* 35.6 (2018): 1547.
198. Tolstoy, Igor, Andrew M. Kropinski, and J. Rodney Brister. "Bacteriophage taxonomy: an evolving discipline." *Bacteriophage Therapy*. Humana Press, New York, NY, 2018. 57-71.
199. Alavandi, S. V., and M. Poornima. "Viral metagenomics: a tool for virus discovery and diversity in aquaculture." *Indian Journal of Virology* 23.2 (2012): 88-98.

200. Sullivan, Mitchell J., Nicola K. Petty, and Scott A. Beatson. "Easyfig: a genome comparison visualizer." *Bioinformatics* 27.7 (2011): 1009-1010.
201. Kondratiuk, T. O., T. V. Beregova, and L. I. Ostapchenko. "Diversity of Antarctic microorganisms—potential producers of biologically active substances." *Український антарктичний журнал* (2016).
202. Tashyrev, O. B. "The complex researches of structure and functions of Antarctic terrestrial microbial communities." *Український антарктичний журнал* (2009).
203. Straka, Robert P., and J. L. Stokes. "Psychrophilic bacteria from Antarctica." *Journal of bacteriology* 80.5 (1960): 622-625.
204. Margesin, R., A. Zimmerbauer, and F. Schinner. "Monitoring of bioremediation by soil biological activities." *Chemosphere* 40.4 (2000): 339-346.
205. Cavicchioli, R., et al. "Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles." *Microbial biotechnology* 4.4 (2011): 449-460.
206. Junge, Karen, Hajo Eicken, and Jody W. Deming. "Bacterial activity at – 2 to – 20 C in Arctic wintertime sea ice." *Applied and Environmental Microbiology* 70.1 (2004): 550-557.
207. Poblete-Castro, Ignacio, et al. "Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species." *Applied microbiology and biotechnology* 93.6 (2012): 2279-2290.
208. Pacheco, Nicolas, et al. "Exploiting the natural poly (3-hydroxyalkanoates) production capacity of Antarctic *Pseudomonas* strains: from unique phenotypes to novel biopolymers." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 46.8 (2019): 1139-1153.
209. Goodfellow, Michael, et al., eds. *Bergey's manual® of systematic bacteriology: Volume five the actinobacteria, part a*. Springer New York, 2012.
210. Lee, Jaejin, et al. "Complete genome sequence of *Pseudomonas antarctica* PAMC 27494, a bacteriocin-producing psychrophile isolated from Antarctica." *Journal of biotechnology* 259 (2017): 15-18.

211. Miteva, Vanya, et al. "Comparison of the microbial diversity at different depths of the GISP2 Greenland ice core in relationship to deposition climates." *Environmental Microbiology* 11.3 (2009): 640-656.
212. Christner, Brent C., Brian H. Kvitko, and John N. Reeve. "Molecular identification of bacteria and eukarya inhabiting an Antarctic cryoconite hole." *Extremophiles* 7.3 (2003): 177-183.
213. Bowman, John P. "Genomics of psychrophilic bacteria and archaea." *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology* (2017): 345-387.
214. Pointing, Stephen B., et al. "Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.47 (2009): 19964-19969.
215. Van Horn, David J., et al. "Factors controlling soil microbial biomass and bacterial diversity and community composition in a cold desert ecosystem: role of geographic scale." *PLoS One* 8.6 (2013): e66103.
216. Teixeira, Lia CRS, et al. "Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica." *The ISME journal* 4.8 (2010): 989-1001.
217. Bakermans, Corien, et al. "Molecular characterization of bacteria from permafrost of the Taylor Valley, Antarctica." *FEMS microbiology ecology* 89.2 (2014): 331-346.
218. Bottos, Eric M., et al. "Airborne bacterial populations above desert soils of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica." *Microbial ecology* 67.1 (2014): 120-128.
219. Romaniuk, Krzysztof, et al. "Diversity and horizontal transfer of antarctic pseudomonas spp. plasmids." *Genes* 10.11 (2019): 850.
220. González-Rocha, Gerardo, et al. "Diversity structure of culturable bacteria isolated from the Fildes Peninsula (King George Island, Antarctica): a phylogenetic analysis perspective." *PLoS One* 12.6 (2017): e0179390.
221. Chauhan, Abhishek, et al. "Psychrophilic pseudomonas in antarctic freshwater lake at stornes peninsula, larsemann hills over east Antarctica." *SpringerPlus* 4.1 (2015): 1-6.

222. Özen, Asli I., and David W. Ussery. "Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*?" *Microbial ecology* 63.2 (2012): 239-248.
223. Säwström, Christin, et al. "Influence of environmental conditions, bacterial activity and viability on the viral component in 10 Antarctic lakes." *FEMS microbiology ecology* 63.1 (2008): 12-22.
224. Anesio, Alexandre M, and Christopher M Bellas. "Are low temperature habitats hot spots of microbial evolution driven by viruses?" *Trends in microbiology* vol. 19,2 (2011): 52-7.
225. López-Bueno, Alberto, et al. "High diversity of the viral community from an Antarctic lake." *Science* 326.5954 (2009): 858-861.
226. Yau, Sheree, et al. "Virophage control of antarctic algal host–virus dynamics." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.15 (2011): 6163-6168.
227. Tschitschko, Bernhard, et al. "Antarctic archaea–virus interactions: metaproteome-led analysis of invasion, evasion and adaptation." *The ISME journal* 9.9 (2015): 2094-2107.
228. Rastrojo, Alberto, and Antonio Alcamí. "Viruses in polar lake and soil ecosystems." *Advances in virus research* 101 (2018): 39-54.
229. Miranda, Ricardo J., et al. "New records of the alien cup-corals (*Tubastraea* spp.) within estuarine and reef systems in Todos os Santos Bay, Southwestern Atlantic." *Marine Biodiversity Records* 9.1 (2016): 1-6.
230. Wei, Sean TS, et al. "Taxonomic and functional diversity of soil and hypolithic microbial communities in Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica." *Frontiers in microbiology* 7 (2016): 1642.
231. Adriaenssens, Evelien M et al. "Taxonomy of prokaryotic viruses: 2016 update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee." *Archives of virology* vol. 162,4 (2017): 1153-1157.
232. Breitbart, Mya. "Marine viruses: truth or dare." *Annual review of marine science* vol. 4 (2012): 425-48.

233. Koskella, Britt, and Michael A. Brockhurst. "Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities." *FEMS microbiology reviews* 38.5 (2014): 916-931.
234. Thomas, Julie A., and Lindsay W. Black. "Mutational analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* myovirus ϕ KZ morphogenetic protease gp175." *Journal of virology* 87.15 (2013): 8713-8725.
235. Tseng, M. J., et al. "Bacteriophage T4 nrdA and nrdB genes, encoding ribonucleotide reductase, are expressed both separately and coordinately: characterization of the nrdB promoter." *Journal of bacteriology* 172.11 (1990): 6323-6332.
236. Ho, C. Kiong, and Stewart Shuman. "Bacteriophage T4 RNA ligase 2 (gp24. 1) exemplifies a family of RNA ligases found in all phylogenetic domains." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.20 (2002): 12709-12714.
237. Fokine, Andrei, and Michael G. Rossmann. "Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages." *Bacteriophage* 4.2 (2014): e28281.
238. Casjens, Sherwood. "Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?." *Molecular microbiology* 49.2 (2003): 277-300.
239. Merrill, Bryan D., et al. "Software-based analysis of bacteriophage genomes, physical ends, and packaging strategies." *BMC genomics* 17.1 (2016): 1-16.
240. Jensen, Ellen C., et al. "Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*." *Applied and environmental microbiology* 64.2 (1998): 575-580.
241. Barrientos-Díaz, Leticia, Manuel Gidekel, and Ana Gutiérrez-Moraga. "Characterization of rhizospheric bacteria isolated from *Deschampsia antarctica* Desv." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24.10 (2008): 2289-2296.
242. Sawstrom, C., et al. "Bacteriophage in inland polar waters." *Extremophiles* 12 (2008): 167-175.
243. Borriss, Michael, et al. "Isolation and characterization of marine psychrophilic phage-host systems from Arctic sea ice." *Extremophiles* 7.5 (2003): 377-384.

244. Luhtanen, Anne-Mari, et al. "Isolation and characterization of phage–host systems from the Baltic Sea ice." *Extremophiles* 18.1 (2014): 121-130.
245. Yu, Zi-Chao, et al. "Filamentous phages prevalent in *Pseudoalteromonas* spp. confer properties advantageous to host survival in Arctic sea ice." *The ISME journal* 9.4 (2015): 871-881.
246. Yau, Sheree, and Mansha Seth-Pasricha. "Viruses of polar aquatic environments." *Viruses* 11.2 (2019): 189.
247. Luhtanen, Anne-Mari, et al. "The first known virus isolates from Antarctic sea ice have complex infection patterns." *FEMS microbiology ecology* 94.4 (2018): fiy028.

Додаток А

Таблиця А1

Місце відбору зразків, які були використані для виділення бактеріофагів

Код зразка	Біотоп	Дата відбору зразка	Опис зразка	Хто відбирав зразок	Довгота точки	Широта точки	Назва острова
1	2	3	4	5	6	7	8
П29	грунт	12/13/2015	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.022	64.09.718	Ялур
П30	грунт	12/19/2015	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.340	64.08.270	Пітерман
П31	грунт	12/19/2015	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.698	64.08.439	Пітерман
П32	грунт	12/19/2015	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.354	64.08.082	Пітерман
П33	грунт	12/25/2015	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.15.068	64.14.557	Галіндез
П34	грунт	12/25/2015	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.798	64.14.930	Галіндез
П35	грунт	12/25/2015	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.744	64.15.388	Галіндез
П36	грунт	1/15/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.698	64.08.439	Пітерман
П37	грунт	1/15/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.340	64.08.270	Пітерман
П38	грунт	1/15/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.354	64.08.082	Пітерман

1	2	3	4	5	6	7	8
П39	грунт	1/20/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.115	64.09.503	Ялур
П40	грунт	1/20/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.022	64.09.718	Ялур
П41	грунт	1/20/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.072	64.09.798	Ялур
П42	грунт	1/31/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.15.068	64.14.557	Галіндез
П43	грунт	1/31/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.798	64.14.930	Галіндез
П44	грунт	1/31/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.744	64.15.388	Галіндез
П45	грунт	2/11/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.698	64.08.439	Пітерман
П46	грунт	2/11/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.354	64.08.082	Пітерман
П47	грунт	2/11/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.340	64.08.270	Пітерман
П48	грунт	2/24/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.744	64.15.388	Галіндез
П49	грунт	2/24/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.798	64.14.930	Галіндез
П50	грунт	2/24/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.15.068	64.14.557	Галіндез
П51	грунт	2/26/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.115	64.09.503	Ялур
П52	грунт	2/26/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.022	64.09.718	Ялур

1	2	3	4	5	6	7	8
П53	грунт	2/26/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.072	64.09.798	Ялур
П54	грунт	3/15/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.744	64.15.388	Галіндез
П55	грунт	3/17/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.15.068	64.14.557	Галіндез
П56	грунт	3/17/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.798	64.14.930	Галіндез
П57	грунт	3/19/2016	Суша проба	Хоєський, Весельський	65.10.354	64.08.082	Пітерман
П58	грунт	3/19/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.698	64.08.439	Пітерман
П59	грунт	3/19/2016	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.340	64.08.270	Пітерман
П1	грунт	4/10/2018	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.698	64.08.439	Пітерман
П2	грунт	4/10/2018	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.10.340	64.08.270	Пітерман
П3	грунт	4/10/2018	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.115	64.09.503	Ялур
П4	грунт	4/10/2018	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.072	64.09.798	Ялур
П5	грунт	4/10/2018	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.022	64.09.718	Ялур
П6	грунт	4/16/2018	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.14.744	64.15.388	Галіндез
П7	грунт	4/16/2018	Суша проба	Хоєцький, Весельський	65.15.068	64.14.557	Галіндез

1	2	3	4	5	6	7	8
П8	грунт	4/16/2018	Суха проба	Хоєцький, Весельський	65.14.798	64.14.930	Галіндез
П9	грунт	12/20/2018	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.15.068	64.14.557	Галіндез
П10	грунт	1/23/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.15.068	64.14.557	Галіндез
П11	грунт	1/23/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.15.068	64.14.557	Галіндез
П12	грунт	1/26/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.022	64.09.718	Ялури
П13	грунт	1/27/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.072	64.09.798	Ялури
П14	грунт	1/27/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.115	64.09.503	Ялури
П15	грунт	1/30/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.44	64.15.24	Галіндез
П16	грунт	2/9/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.10.340	64.08.270	Пітерман
П17	грунт	2/13/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.115	64.09.503	Ялури
П18	грунт	2/13/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.072	64.09.798	Ялури
П19	грунт	2/13/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.022	64.09.718	Ялури
П20	грунт	2/15/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.068	64.14.557	Галіндез
П21	грунт	2/25/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.44	64.15.24	Галіндез
П22	грунт	2/28/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.798	64.14.930	Галіндез
П23	грунт	3/7/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.15.068	64.14.557	Галіндез

1	2	3	4	5	6	7	8
П24	грунт	3/9/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.798	64.14.930	Галіндез
П25	грунт	3/12/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.10.340	64.08.270	Пітерман
П26	грунт	3/19/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.44	64.15.24	Галіндез
П27	грунт	3/20/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.072	64.09.798	Ялури
П28	грунт	3/20/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.022	64.09.718	Ялури
П29	грунт	3/20/2019	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.115	64.09.503	Ялури
П60	грунт	23/02/2017	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.15.000	64.14.321	Барселот
П61	грунт	02/2017	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.950	64.14.374	Туксен
П62	грунт	1/01/2017	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.405	64.14.576	Галіндез
П63	грунт	02/2017	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.005	64.14.371	Туксен
П64	грунт	4/02/2017	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.416	64.18.923	Бархани
П65	грунт	03/2017	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.15.058	64.14.567	Барселот
П66	грунт	1/01/2017	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.14.902	64.14.364	Галіндез
П67	грунт	1/03/2017	Суха проба	Хоєцький П.Б.	65.15.061	64.14.533	Барселот
П68	грунт	23/02/2017	Суха проба	Хоєцький П.Б.	56.49.599	63.40.001	Грін

Додаток Б

Таблиця Б1

Список ідентифікованих генів та їх білкових продуктів фага UAntarctica

Номери генів/ланцюг	Розміщення	Генбанк код білка (protein id), передбачена функція, (розмвр білка, а.к.)	Консервативні домени	E-value
1	2	3	4	5
1(-)	587..1177	QYW06413, hypothetical protein (197)		
2(-)	1222..1323	QYW06414, hypothetical protein (34)		
3(-)	1399..1629	QYW06415, hypothetical protein (77)		
4(-)	1626..1844	QYW06416, hypothetical protein (73)		
5(-)	1846..2052	QYW06417, hypothetical protein (69)		
6(-)	2052..2219	QYW06418, hypothetical protein (56)		
7(-)	2212..2400	QYW06419, hypothetical protein (63)		
8(-)	2397..2507	QYW06420, hypothetical protein (37)		
9(-)	2504..2698	QYW06421, hypothetical protein (65)		
10(-)	2701..2985	QYW06422, hypothetical protein (95)		
11(-)	2972..3265	QYW06423, hypothetical protein (98)		
12(-)	3262..3582	QYW06424, hypothetical protein (107)		
13(-)	3592..3786	QYW06425, hypothetical protein (65)		

1	2	3	4	5
14(-)	3944..4189	QYW06426, hypothetical protein (82)		
15(-)	4186..4770	QYW06427, hypothetical protein (195)		
16(-)	4936..5286	QYW06428, hypothetical protein (117)		
17(-)	5273..5515	QYW06429, hypothetical protein (81)		
18(-)	5518..5745	QYW06430, hypothetical protein (76)		
19(-)	5742..6029	QYW06431, hypothetical protein (96)		
20(-)	6029..6382	QYW06432, hypothetical protein (118)		
21(-)	6440..6679	QYW06433, hypothetical protein (80)		
22(-)	6676..7044	QYW06434, hypothetical protein (123)		
23(-)	7034..7909	QYW06435, hypothetical protein (292)		
24(-)	7921..8178	QYW06436, hypothetical protein (86)		
25(-)	8175..8486	QYW06437, hypothetical protein (104)		
26(-)	8483..8704	QYW06438, hypothetical protein (74)		
27(-)	8701.8865.	QYW06439, hypothetical protein (55)		
28(-)	8865..9224	QYW06440, hypothetical protein (120)		
29(-)	9224..9514	QYW06441, hypothetical protein (97)		
30(-)	9511..9822	QYW06442, hypothetical protein (104)		
31(-)	9819..10028	QYW06443, hypothetical protein (70)		
32(-)	10025..10213	QYW06444, hypothetical protein (63)		

1	2	3	4	5
33(-)	10210..10881	QYW06445, hypothetical protein (224)		
34(-)	10923..11204	QYW06446, hypothetical protein (94)		
35(-)	11212..11739	QYW06447, hypothetical protein (176)		
36(-)	11742..11897	QYW06449, hypothetical protein (52)		
37(-)	11927..12148	QYW06448, hypothetical protein (74)		
38(-)	12196..12621	QYW06450, hypothetical protein (142)		
39(-)	12682..14133	QYW06451, hypothetical protein (484)		
40(-)	14804..15034	QYW06451, hypothetical protein (77)		
41(-)	15019..15366	QYW06453, hypothetical protein (116)		
42(-)	15384..15863	QYW06454, hypothetical protein (160)		
43(-)	16083..16184	QYW06455, hypothetical protein (34)		
44(-)	16228..16500	QYW06456, hypothetical protein (91)		
45(-)	16497..17282	QYW06457, hypothetical protein (262)		
46(+)	18124..18786	QYW06458, hypothetical protein (221)		
47(+)	19421..19702	QYW06459, hypothetical protein (94)	Bac_DNA_binding (pfam00216)	1.01e-14
48(+)	19702..20247	QYW06460, hypothetical protein (182)		
49(+)	20247..20435	QYW06461, hypothetical protein (63)		
50(+)	20432..22216	QYW06462, putative terminase, large subunit (595)	Terminase_GpA (cl21617)	4.63e-21

1	2	3	4	5
51(+)	22353..23816	QYW06463, hypothetical protein (488)		
52(+)	23828..25300	QYW06464, head maturation protease (491)	Crotonase-like (cl23717)	2.53e-42
53(+)	25313..25765	QYW06465, hypothetical protein (151)		
54(+)	25807..26982	QYW06466, hypothetical protein (392)		
55(+)	27046..27549	QYW06467, hypothetical protein (168)		
56(+)	27554..28027	QYW06468, hypothetical protein (158)		
57(+)	28017..28928	QYW06469, hypothetical protein (304)		
58(+)	28928..29434	QYW06470, hypothetical protein (169)		
59(+)	29431..29880	QYW06471, hypothetical protein (150)		
60(+)	29880..30929	QYW06472, putative major tail protein (350)	Phage_tube_2 (pfam18906)	1.77e-09
61(+)	31009..31428	QYW06473, putative pre-tape measure chaperone protein (140)		
62(+)	31467..31802	QYW06474, hypothetical protein (112)		
63(+)	31806..36953	QYW06475, putative tail tape measure protein (1716)	PhageMin_Tail (cl29167)	1.81e-50
64(+)	36953..37315	QYW06476, putative minor tail protein (121)	Phage_min_tail (cl01940)	7.65e-14
65(+)	37324..38037	QYW06477, putative tail protein (238)	Phage_tail_L (cl01908)	5.49e-53
66(+)	38055..38807	QYW06478, putative tail assembly protein (251)	MPN (cl13996)	2.06e-15

1	2	3	4	5
67(+)	38804..39370	QYW06479, putative tail assembly protein I (189)	Lambda_tail_I (cl01945)	2.16e-27
68(+)	39370..43416	QYW06480, putative tip attachment protein (1349)	DUF1983 (pfam09327)	1.01e-13
69(+)	43416..43703	QYW06481, hypothetical protein (96)		
70(+)	43703..44413	QYW06482, hypothetical protein (237)		
71(+)	44447..46108	QYW06483, putative tail fiber protein (554)		
72(+)	46105..46461	QYW06484, putative tail fiber protein (119)		
73(+)	46454..46645	QYW06485, hypothetical protein (64)		
74(+)	46717..47130	QYW06486, hypothetical protein (138)		
75(+)	47120..47437	QYW06487, hypothetical protein (106)		
76(+)	47481..48053	QYW06488, putative endolysin (191)	COG3179 (cl00222)	8.56e-67
77(+)	48050..48535	QYW06489, hypothetical protein (162)		
78(-)	48595..49548	QYW06490, hypothetical protein (318)		
79(-)	49550..49834	QYW06491, hypothetical protein (95)	DUF4326 (pfam14216)	1.79e-26
80(-)	49828..50067	QYW06492, hypothetical protein (80)		
81(-)	50070..50291	QYW06493, hypothetical protein (74)		
82(-)	50592..52844	QYW06494, putative DNA repair exonuclease (751)	SbcC (cl33865)	2.54e-16
83(-)	52878..53144	QYW06495, hypothetical protein (89)		

1	2	3	4	5
84(-)	53141..53671	QYW06496, hypothetical protein (177)		
85(-)	53673..54002	QYW06497, hypothetical protein (110)		
86(-)	54168..55268	QYW06498, putative DNA repair exonuclease (367)	SbcD C (cl33866)	2.48e-05
87(-)	55315..55449	QYW06499, hypothetical protein (45)		
88(-)	55449..56621	QYW06500, putative DNA ligase (391)	Adenylation_DNA_ligase_like (cl12015)	1.89e-15
89(-)	56652..57173	QYW06501, hypothetical protein (174)		
90(-)	57176..57754	QYW06502, putative deoxynucleotide monophosphate kinase (193)	NK (cl17190)	7.22e-27
91(-)	57745..58473	QYW06503, putative exonuclease (243)	DEDDh (cl10012)	2.17e-21
92(-)	58473..58799	QYW06504, hypothetical protein (109)		
93(-)	58786..62442	QYW06505, putative DNA polymerase I (1219)	DNA_pol_A (pfam00476)	1.48e-50
94(-)	62516..63136	QYW06506, putative nucleotide pyrophosphohydrolase (207)	NTP-PPase (cl16941)	2.97e-11
95(-)	63211..64257	QYW06507, hypothetical protein (349)		
96(-)	64254..65909	QYW06508, putative helicase (552)	SF2_C_SNF (cd18793)	2.90e-21
97(-)	65937..66167	QYW06509, hypothetical protein (77)		
98(-)	66169..69057	QYW06510, hypothetical protein (963)		
99(-)	69061..69312	QYW06511, hypothetical protein (84)		

1	2	3	4	5
100(-)	69394..70722	QYW06512, putative helicase (443)	DEAD-like_helicase_N (cl28899)	1.15e-16
101(-)	70794..71102	QYW06513, hypothetical protein (103)		
102(-)	71114..71932	QYW06514, hypothetical protein (273)		
103(-)	71934..72335	QYW06515, hypothetical protein (134)		
104(-)	72338..72859	QYW06516, hypothetical protein (174)		
105(-)	72856..73266	QYW06517, hypothetical protein (137)		
106(-)	73268..73570	QYW06518, hypothetical protein (101)		
107(-)	73567..74538	QYW06519, hypothetical protein (324)		
108(-)	74535..74891	QYW06520, hypothetical protein (119)		
109(-)	74888..76963	QYW06521, putative DNA cytosine methyltransferase (692)	Cyt_C5_DNA_methylase (cl30459)	1.91e-15
110(-)	77033..77401	QYW06522, hypothetical protein (123)		
111(-)	77398..77565	QYW06523, hypothetical protein (56)		
112(-)	77568..78137	QYW06524, hypothetical protein (190)		
113(-)	78115..78360	QYW06525, hypothetical protein (82)		
114(-)	78357..78590	QYW06526, hypothetical protein (78)		
115(-)	78587..79018	QYW06527, hypothetical protein (144)		
116(-)	79015..79338	QYW06528, hypothetical protein (108)		
117(-)	80019..80504	QYW06529, hypothetical protein (162)		

1	2	3	4	5
118(-)	80506..80712	QYW06530, hypothetical protein (69)		
119(-)	80712..81143	QYW06531, hypothetical protein (144)		

Таблиця Б2

Список ідентифікованих генів та їх білкових продуктів фага UAVern

Номери генів/ланцюг	Розміщення	Генбанк код білка (protein id), передбачена функція, (розмвр білка, а.к.)	Консервативні домени	E-value
1	2	3	4	5
1(-)	1036..1308	QYW06532, hypothetical protein (91)		
2(-)	1305..1562	QYW06533, hypothetical protein (86)		
3(-)	1701..1946	QYW06534, hypothetical protein (82)		
4(-)	2018..2557	QYW06535, hypothetical protein (180)		
5(-)	2606..2743	QYW06536, hypothetical protein (46)		
6(-)	2749..2973	QYW06537, hypothetical protein (75)		
7(-)	2973..3431	QYW06538, hypothetical protein (153)		
8(-)	3447..3959	QYW06539, hypothetical protein (171)		
9(-)	3980..4180	QYW06540, hypothetical protein (67)		
10(-)	4182..4448	QYW06541, hypothetical protein (89)		
11(-)	4522..5184	QYW06543, hypothetical protein (221)		
12(-)	5449..6912	QYW06542, hypothetical protein (488)	ParB_N_Srx (cl28891)	2.17e-23
13(-)	7102..7395	QYW06544, hypothetical protein (98)		
14(-)	7529..7855	QYW06545, hypothetical protein (109)		
15(-)	8239..8937	QYW06546, hypothetical protein (233)		
16(-)	9003..9404	QYW06547, hypothetical protein (134)		

1	2	3	4	5
17(-)	9404..9538	QYW06548, hypothetical protein (45)		
18(-)	9634..9795	QYW06549, hypothetical protein (54)		
19(-)	9833..10375	QYW06551, hypothetical protein (181)		
20(-)	10404..10700	QYW06552, hypothetical protein (99)		
21(-)	10704..10850	QYW06553, hypothetical protein (49)		
22(-)	10850..11134	QYW06554, hypothetical protein (95)		
23(-)	11902..12114	QYW06555, hypothetical protein (71)		
24(-)	12280..12456	QYW06556, hypothetical protein (59)		
25(-)	12530..12685	QYW06557, hypothetical protein (52)		
26(-)	12712..12915	QYW06558, hypothetical protein (68)		
27(-)	12917..13102	QYW06559, hypothetical protein (62)		
28(-)	13117..13530	QYW06560, hypothetical protein (138)		
29(-)	13581..14612	QYW06561, hypothetical protein (344)		
30(-)	14679..15113	QYW06562, hypothetical protein (145)		
31(-)	15077..15313	QYW06567, hypothetical protein (79)		
32(-)	15313..15525	QYW06566, hypothetical protein (71)		
33(-)	15522..15746	QYW06565, hypothetical protein (75)		
34(-)	15743..15952	QYW06564, hypothetical protein (70)		
35(-)	15952..16323	QYW06563, putative anti-sigma factor (124)		

1	2	3	4	5
36(-)	16380..16805	QYW06550, hypothetical protein (142)		
37(-)	16878..17837	QYW06569, hypothetical protein (320)		
38(-)	17848..18075	QYW06570, hypothetical protein (76)	HTH_XRE (cl22854)	4.08e-07
39(-)	18075..18341	QYW06571, hypothetical protein (89)		
40(-)	18365..18589	QYW06572, putative glutaredoxin (75)	GrxC (COG0695)	1.59e-09
41(-)	18586..19323	QYW06568, hypothetical protein (246)		
42(-)	19387..19518	QYW06573, hypothetical protein (44)		
43(-)	19518..19907	QYW06574, hypothetical protein (130)		
44(-)	19973..21703	QYW06575, putative ribonucleoside-diphosphate reductase, subunit alpha (577)	PRK09102 (cl35765)	9.07e-10 7
45(-)	21700..22722	QYW06576, putative ribonucleoside-diphosphate reductase, subunit beta (341)	PRK12759 (cl27596)	2.98e-09
46(-)	22752..23114	QYW06577, hypothetical protein (121)		
47(-)	23118..24002	QYW06578, putative thymidylate synthase (272)	Thy1 (cl40487)	9.94e-09
48(-)	23999..24094	QYW06579, hypothetical protein (32)		
49(-)	24157..24759	QYW06580, hypothetical protein (201)	DUF5664 (pfam18909)	2.24e-18
50(-)	24756..24971	QYW06581, hypothetical protein (72)		
51(-)	24968..25201	QYW06582, hypothetical protein (78)		
52(-)	25212..25475	QYW06583, hypothetical protein (88)		
53(-)	25472..26254	QYW06584, hypothetical protein (261)		

1	2	3	4	5
54(-)	26251..26799	QYW06585, putative HNH endonuclease (183)		
55(-)	26796..26951	QYW06586, hypothetical protein (52)		
56(-)	26951..27991	QYW06587, putative small exonuclease (347)		
57(-)	28060..28353	QYW06588, hypothetical protein (98)		
58(-)	28350..28613	QYW06589, hypothetical protein (88)		
59(-)	28610..28744	QYW06590, hypothetical protein (45)		
60(-)	28741..28908	QYW06591, hypothetical protein (56)		
61(-)	28966..29979	QYW06592, hypothetical protein (338)		
62(-)	30051..30431	QYW06593, hypothetical protein (127)	MIB_HERC2 (cl05972)	4.11e-06
63(-)	30441..30713	QYW06594, hypothetical protein (91)		
64(-)	30762..31205	QYW06595, hypothetical protein (148)		
65(-)	31284..33896	QYW06596, putative DNA polymerase A (871)	DNA_pol_A (cl02626)	1.38e-35
66(-)	33963..35930	QYW06597, putative DNA primase/helicase (656)	RecA-like_Gp4D_helicase (d19483)	9.32e-78
67(-)	35940..36200	QYW06598, hypothetical protein (87)		
68(-)	36194..36415	QYW06599, hypothetical protein (74)		
69(-)	36431..36727	QYW06600, hypothetical protein (99)		
70(-)	36718..36897	QYW06601, hypothetical protein (60)		
71(-)	37276..37893	QYW06602, hypothetical protein (206)		
72(-)	37963..38193	QYW06603, hypothetical protein (77)		

1	2	3	4	5
73(-)	38204..38494	QYW06604, hypothetical protein (97)		
74(-)	38481..38840	QYW06605, hypothetical protein (120)		
75(-)	38855..39223	QYW06606, hypothetical protein (123)		
76(-)	39223..39414	QYW06607, hypothetical protein (64)		
77(-)	39526..39966	QYW06608, hypothetical protein (147)		
78(-)	39966..40100	QYW06609, hypothetical protein (45)		
79(-)	40097..40270	QYW06610, hypothetical protein (58)		
80(-)	40397..40738	QYW06611, hypothetical protein (114)	DUF4326 (pfam14216)	3.03e-21
81(+)	41128..41364	QYW06612, hypothetical protein (79)		
82(+)	41364..41555	QYW06613, hypothetical protein (64)		
83(+)	41566..41985	QYW06614, hypothetical protein (140)		
84(+)	41985..43118	QYW06615, putative RNA ligase (378)	PHA02142 (cl40757)	3.36e-84
85(-)	43157..43480	QYW06616, hypothetical protein (108)		
86(-)	43491..43781	QYW06617, hypothetical protein (97)		
87(-)	43935..44354	QYW06618, hypothetical protein (140)		
88(-)	44347..44598	QYW06619, hypothetical protein (84)		
89(-)	44595..45149	QYW06620, putative lysozyme (185)	Endolysin_R21-like (cd16900)	1.39e-64
90(-)	45162..46634	QYW06621, putative tail fiber protein (491)		
91(-)	46664..47092	QYW06622, hypothetical protein (143)		

1	2	3	4	5
92(-)	47105..49531	QYW06623, putative tail fiber protein (809)	Pyocin_knob (cd19958)	7.42e-05
93(-)	49548..50279	QYW06624, hypothetical protein (244)	DUF2612 (cl12607)	6.84e-26
94(-)	50292..51749	QYW06625, putative baseplate protein (486)	Baseplate_J (cl01294)	3.03e-15
95(-)	51751..52119	QYW06626, hypothetical protein (123)		
96(-)	52130..52888	QYW06627, putative baseplate protein (253)	Gp138_N (cl39697)	1.42e-19
97(-)	52888..53808	QYW06628, hypothetical protein (307)		
98(-)	53810..54154	QYW06629, hypothetical protein (115)		
99(-)	54151..54900	QYW06630, hypothetical protein (250)		
100(-)	54900..57242	QYW06631, putative tape measure protein (781)	tape_meas_nterm (cl31236)	2.84e-06
101(-)	57258..57455	QYW06632, hypothetical protein (66)		
102(-)	57497..57853	QYW06633, hypothetical protein (119)		
103(-)	57869..58396	QYW06634, hypothetical protein (176)		
104(-)	58407..58910	QYW06636, hypothetical protein (168)		
105(-)	58976..59503	QYW06637, putative structural protein (176)		
106(-)	59536..60822	QYW06638, putative structural protein (429)	DUF3383 (cl20432)	6.71e-47
107(-)	60837..61412	QYW06639, hypothetical protein (192)		
108(-)	61409..61642	QYW06640, hypothetical protein (78)		
109(-)	61788..62249	QYW06641, hypothetical protein (154)		
110(-)	62233..62688	QYW06642, hypothetical protein (152)		

1	2	3	4	5
111(-)	62739..63797	QYW06643, putative major capsid protein (353)	Phage_cap_E (pfam03864)	3.05e-54
112(-)	63813..64196	QYW06644, hypothetical protein (128)	HDPD (cl03784)	5.27e-05
113(-)	64215..65099	QYW06635, hypothetical protein (295)		
114(-)	65096..65563	QYW06645, putative structural protein (156)	Peptidase_S78_2 (cl24270)	1.70e-19
115(-)	65572..67014	QYW06646, putative portal protein (481)		
116(-)	67024..68499	QYW06647, putative terminase large subunit (492)	Terminase_6C (cl02216)	9.73e-27
117(-)	68610..69044	QYW06648, hypothetical protein (145)		
118(-)	70873..71001	QYW06649, hypothetical protein (43)		
119(-)	72292..72606	QYW06650, hypothetical protein (105)		
120(+)	73478..73900	QYW06651, hypothetical protein (141)		
121(+)	73897..74334	QYW06652, hypothetical protein (146)		
122(+)	74374..75132	QYW06653, putative phosphate starvation-inducible protein (253)	P-loop_NTPase (cl38936)	4.10e-51
123(+)	75129..75713	QYW06654, putative protease ClpP (195)	Crotonase-like (cl23717)	1.12e-23
124(+)	75782..75994	QYW06655, hypothetical protein (71)		
125(+)	75991..76263	QYW06656, hypothetical protein (91)		
126(+)	76260..76457	QYW06657, hypothetical protein (66)		
127(+)	76454..76618	QYW06658, hypothetical protein (55)		
128(+)	76615..77019	QYW06659, putative deoxycytidylate deaminase (135)	Cytidine_deaminase-like (cl00269)	2.35e-36

1	2	3	4	5
129(+)	77006..77527	QYW06660, hypothetical protein (174)		
130(+)	77524..77763	QYW06661, hypothetical protein (80)		
131(+)	77760..78965	QYW06662, putative DNA ligase (402)	Adenylation_DNA_ligase_1 ike (cl12015)	1.09e-17
132(+)	78975..79376	QYW06663, hypothetical protein (134)		
133(+)	79432..79920	QYW06664, putative phosphohydrolase (163)	SpoT (cl33835)	4.82e-09
134(+)	79917..80492	QYW06665, putative phosphoesterase (192)	MPP (cl13995)	3.88e-30
135(+)	80489..80731	QYW06666, hypothetical protein (81)		
136(+)	80724..80921	QYW06667, hypothetical protein (66)		
137(+)	80923..81834	QYW06668, putative RNA ligase (304)	Trl1 (cl34982)	4.09e-05
138(+)	81831..82226	QYW06669, hypothetical protein (132)	AAA_33 (pfam13671)	2.21e-13
139(+)	82227..82439	QYW06670, hypothetical protein (71)		
140(+)	82436..82834	QYW06671, hypothetical protein (133)		
141(+)	82891..83721	QYW06672, putative ribose-phosphate pyrophosphokinase (277)	RibP_PPkin (cl36854)	1.85e-25
142(+)	83732..84268	QYW06673, hypothetical protein (179)		
143(+)	84284..85117	QYW06674, hypothetical protein (278)		
144(+)	85114..85302	QYW06675, hypothetical protein (63)		
145(+)	85357..85644	QYW06676, hypothetical protein (96)		

1	2	3	4	5
146(+)	85677..87440	QYW06677, putative nicotinamide phosphoribosyltransferase (588)	PRK09198 (cl30369)	9.39e-15 7
147(+)	87494..87718	QYW06678, hypothetical protein (75)		
148(+)	87715..87894	QYW06679, hypothetical protein (60)		
149(+)	87891..88364	QYW06680, hypothetical protein (158)	Macro_SF (cl00019)	9.46e-26
150(+)	88375..88758	QYW06681, hypothetical protein (128)		
151(+)	88762..89337	QYW06682, hypothetical protein (192)		
152(+)	89537..90814	QYW06683, putative glutathionylspermidine synthase (426)	GSP_synth (cl23821)	2.16e-58
153(+)	90801..91040	QYW06684, hypothetical protein (80)		
154(+)	91040..91429	QYW06685, hypothetical protein (130)		
155(+)	91419..91571	QYW06686, hypothetical protein (51)		
156(+)	91568..91849	QYW06687, hypothetical protein (94)		
157(+)	91846..92418	QYW06688, putative DNA processing protein A (179)		
158(+)	92420..92605	QYW06689, hypothetical protein (62)		
159(+)	92605..93090	QYW06690, hypothetical protein (162)	PRK06599 (cl35498)	8.77e-05
160(+)	93087..93350	QYW06691, hypothetical protein (88)		
161(+)	93399..93701	QYW06692, hypothetical protein (101)		
162(+)	93701..94204	QYW06693, hypothetical protein (168)		

1	2	3	4	5
163(+)	94204..94401	QYW06694, hypothetical protein (66)		
164(+)	94398..94682	QYW06695, hypothetical protein (95)		
165(+)	94741..95271	QYW06696, hypothetical protein (177)		
166(+)	95271..95693	QYW06697, hypothetical protein (141)		
167(+)	95693..96163	QYW06698, hypothetical protein (157)		
168(+)	96221..96562	QYW06699, hypothetical protein (114)		
169(+)	96562..96831	QYW06700, hypothetical protein (90)		
170(+)	96860..96985	QYW06701, hypothetical protein (42)		
171(+)	96982..97224	QYW06702, hypothetical protein (81)		
172(+)	97221..97406	QYW06703, hypothetical protein (62)		
173(+)	97427..97522	QYW06704, hypothetical protein (32)		
174(+)	97519..97737	QYW06705, hypothetical protein (73)		
175(+)	99335..100132	QYW06706, hypothetical protein (266)		
176(-)	100480..100869	QYW06707, hypothetical protein (130)		

Додаток В

Таблиця В1

Місце розташування генів, що кодують tRNA фага UAntarctica

tRNA	tRNA початок розміщення	tRNA кінець розміщення	tRNA тип	Антикодон
1	18919	18995	Gln	TTG
2	19001	19078	His	GTG
3	19164	19239	Met	CAT

Таблиця В2

Місце розташування генів, що кодують tRNA фага UAVern

tRNA	tRNA початок розміщення	tRNA кінець розміщення	tRNA тип	Антикодон
1	72256	72180	Lys	TTT
2	72174	72085	Ser	GCT
3	71831	71743	Ser	TGA
4	71737	71653	Leu	CAA
5	71507	71432	Gln	TTG
7	71102	71025	Arg	ACG
8	70850	70774	Glu	TTC
9	70767	70692	Asp	GTC
10	70686	70613	Thr	TGT
11	70519	70444	Ile	GAT
12	70437	70359	Met	CAT
13	70188	70101	Asn	GTT
14	70019	69936	Tyr	GTA
15	69894	69819	Pro	TGG
16	69812	69733	Ala	TGC
17	69510	69426	Leu	TAG
18	69417	69344	Cys	GCA
19	69342	69266	Phe	GAA
20	69259	69183	Gly	TCC

Документ підписано у сервісі Вчасно (продовження)
Дисертація_Головань_2.05lowq.pdf

Документ відправлено: 19:38 28.06.2022

Власник документу

Електронний підпис

19:38 28.06.2022

Ідентифікаційний код: 3484711642

Головань Вікторія Валеріївна

Власник ключа: Головань Вікторія Валеріївна

Час перевірки КЕП/ЕЦП: 19:38 28.06.2022

Статус перевірки сертифікату: Сертифікат діє

Серійний номер: 3ED5083160DBC59B04000000EFD40F00035E8500