

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри професор, доктор біологічних наук  
Ірина Будзанівська

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри  
від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ВІРУСИ РОСЛИН ЯК ІНДИКАТОРИ ЗАБРУДНЕННЯ ВОДИ В  
МІСТІ КИЇВ**

Випускна кваліфікаційна робота  
студента денної форми навчання  
за спеціальністю 091 “Біологія та  
біохімія”

Філоненко Олександрі Олегівни  
Науковий керівник від кафедри  
Професор, доктор біологічних наук  
Будзанівська І.Г.

Робота виконана на базі кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та  
медицини»  
під керівництвом доктора філософії зав. навчальної лабораторії  
Пожилів І.М.

Оцінка захисту роботи  
\_\_\_\_\_

**Київ – 2025 р.**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП .....	4
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури .....	6
1.1 Рід <i>Tobamovirus</i> .....	6
1.2 Біологічні методи оцінки якості води .....	10
1.3 <i>Tobamovirus</i> як індикатор якості води.....	12
1.4 Ідентифікація та кількісне визначення <i>Tobamovirus</i> .....	17
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	19
2.1 Матеріали досліджень .....	19
2.2 Методи досліджень .....	25
2.2.1 Підготовка проб до дослідження.....	27
2.2.2 Концентрування зразків .....	27
2.2.3 Виділення нуклеїнових кислот .....	30
2.2.4 Зворотна транскрипція .....	32
2.2.5 Полімеразна ланцюгова реакція .....	33
2.2.6 Електрофорез.....	34
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення .....	37
3.1 Відбір зразків та підготовка проб.....	37
3.2 Результати виділення нуклеїнових кислот.....	38
3.3 Результати ПЛР .....	41
3.4 Кореляція з відомими дослідженнями та моделювання інноваційних підходів до моніторингу якості водних ресурсів .....	50
3.4.1 РММoV для моніторингу якості водних ресурсів.....	51
3.4.2 ToMV для моніторингу якості водних ресурсів .....	54
3.4.3 ToBRFV для моніторингу якості водних ресурсів .....	56
ВИСНОВКИ.....	61
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	62

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ВТМ	– вірусу тютюнової мозаїки;
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція;
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота;
РНК	– рибонуклеїнова кислота;
CGMMV	– Cucumber green mottle mosaic virus (Вірус зеленої плямистості огірків);
РММoV	– Pepper mild mottle virus (Вірус м'якої крапчастості перцю);
RT-PCR	– зворотна транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція;
ToBRFV	– Tomato brown rugose fruit virus (Вірус коричневої зморшкуватості плодів томатів);
ToMV	– Tomato mosaic virus (Вірус мозаїки томатів)

## ВСТУП

Віруси, кількість яких оцінюється приблизно в  $10^{31}$ , є найпоширенішою формою життя на планеті, випереджаючи бактерії (приблизно  $10^{28}$ ), що займають друге місце [1].

Всюдисущі в природі, віруси живуть у всіх природних джерелах води на Землі. Хоча більшість з них нешкідливі для багатоклітинних організмів, деякі віруси можуть інфікувати і завдавати серйозної шкоди тваринам, рослинам і людям.

Вода слугує середовищем передачі, через яке багато патогенних мікроорганізмів можуть поширюватися і підтримувати свою життєздатність. Відомо, що віруси людини, такі як аденовірус, норовірус, поліовірус та деякі інші, залишаються інфекційними у воді протягом декількох місяців. Відсутність належної санітарії води та належної гігієни призводить до випадків гострого гастроентериту, здебільшого спричиненого патогенними вірусами, такими як норовірус, гепатит Е, гепатит А та ротавірус [2].

В свою чергу віруси рослин є відомими факторами ризику в рослинництві і щорічно спричиняють втрати врожаю. Присутність вірусів рослин у водному середовищі відома вже близько 40 років. Вони були виявлені в різних водних об'єктах, включаючи річки, озера, крижану воду, водопровідну воду та стічні води..

Для деяких з них була продемонстрована стабільність у воді протягом тривалого часу і подальша здатність інфікувати рослини. Хоча дослідження вірусів рослин у водах навколишнього середовища поступово розвиваються, все ще існує відносно мало досліджень, присвячених цій темі. Ще менше досліджень присвячено зрошувальній воді та/або поверхневим водам [3].

Забруднення водних екосистем є однією з найактуальніших екологічних проблем сьогодення. Як важливий компонент біосфери, вода є основою життя на Землі, але її якість поступово погіршується через

антропогенний вплив. В умовах інтенсивної міської забудови та промислового тиску міста потребують ефективних способів моніторингу стану водного середовища.

Віруси становлять серйозну загрозу для сільського господарства та екосистем у всьому світі. Вони можуть пригнічувати ріст, розвиток і продуктивність рослин, спричиняти значні втрати врожаю. Однак в останні роки віруси привертають увагу не тільки як патогени, але і як потенційні індикатори забруднення води. Аналіз поширення вірусу у водоймах Києва допоможе розробити нові стратегії для забезпечення екологічної безпеки та збереження водних ресурсів.

Саме тому метою даної роботи є ідентифікація модельних вірусів у водоймах та стічних водах міста Київ, та моделювання інноваційних підходів до моніторингу стану водних ресурсів.

Для досягнення поставленої мети необхідно виконати такі завдання:

- здійснити ідентифікацію вірусів-поліфагів у пробах води з різних водойм міста Києва;
- провести діагностику класичного індикатора якості води — CrAssphage — з метою порівняння з діагностикою вірусів рослин у водному середовищі;
- оцінити ефективність виявлених вірусів рослин як потенційних маркерів забруднення водного середовища.

## РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

### 1.1 Рід *Tobamovirus*

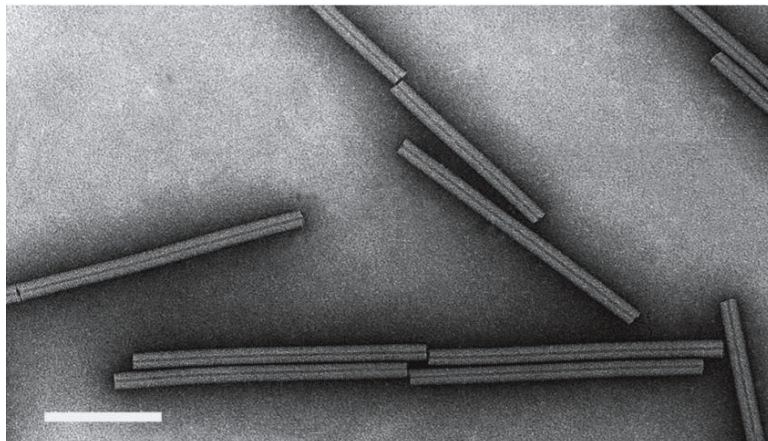
Тобамовіруси є одними з найбільш вивчених вірусів рослин. Перший тобамовірус був виявлений на рослинах тютюну у вигляді мозаїчної зміни кольору. *Tobamovirus* — рід позитивно-ланцюгових РНК-вірусів родини *Virgaviridae*. Багато рослин, у тому числі перець, огірок і помідор, чутливі до цих вірусів. Одним із критеріїв розрізнення представників окремих видів тобамовірусів є різниця нуклеотидної послідовності щонайменше на 10% [4].

Деякі приклади вірусів рослин, що належать до роду *Tobamovirus* родини *Virgaviridae* наведено в табл. 1.1 .

Таблиця 1.1 – Віруси рослин, що належать до роду *Tobamovirus* родини *Virgaviridae* [5].

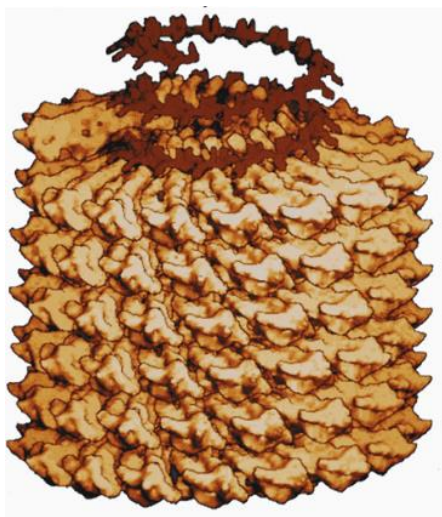
Назва вірусу	Скорочена назва	Загальна назва господаря	Таксономічна назва господаря
Вірус м'якої крапчастості перцю	РММoV	Паприка	<i>Capsicum annuum</i>
Вірус мозаїки томатів	ToMV	Томат	<i>Solanum</i> spp.
Вірус тютюнової мозаїки	TMV	Тютюн	<i>Nicotiana</i> spp.
Вірус крапчастої мозаїки томатів	ToMoMV	Томат	<i>Solanum lycopersicum</i>
Вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка	CFMMV	Огірок	<i>Cucumis sativus</i>
Вірус зеленої крапчастої мозаїки цукіні	ZGMoV	Цукіні	<i>Cucurbita pepo</i> L. <i>zucchini</i>
Вірус мозаїки ріпаку	YMoV	Ріпак	<i>Brassica napus</i>

Віріони тобамовірусу - це прямі трубки розміром приблизно  $18 \times 300$  нм<sup>2</sup> з центральним порожнистим ядром діаметром 4 нм (рис.1.1).



**Рис. 1.1.** Негативна контрастна електронна мікрофотографія частинки ВТМ, забарвленої ураніацетатом (смуга відповідає 100 нм) [6]

Віріон складається приблизно на 95% з білка і на 5% з РНК. У вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) приблизно 2100 субодиниць одного білка оболонки розташовані у вигляді правої спіралі навколо однієї молекули геномної РНК, причому кожна субодиниця асоційована з трьома сусідніми нуклеотидами (рис.1.2).



**Рис. 1.2.** Модель частинки вірусу тютюнової мозаїки [6]

Асоціація білок-білок є важливою першою подією збірки віріона. Субодиниці білка оболонки збираються в кілька типів агрегатів. Мономери білків оболонки та невеликі гетерогенні агрегати з декількох субодиниць разом називаються "А-білок". Рівновага між А-протеїном і більшими

агрегатами в першу чергу залежить від рН та іонної сили. Очищений білок оболонки та вірусна РНК можуть збиратися в інфекційні частинки *in vitro*. Більші агрегати - це диски, що складаються з двох окремих складених кілець субодиниць білка оболонки, і протоспіралей. Протоспіралі містять приблизно 40 субодиниць білка оболонки, розташованих по спіралі навколо центрального порожнистого ядра, подібно до того, як вони розташовані всередині віріона. Специфічна для послідовності структура стеблової петлі в РНК, що лежить в основі збірки, ініціює інкапсуляцію і запобігає дефектному пакуванню, яке може виникнути в результаті декількох незалежних подій ініціації на одній молекулі РНК. Збірка віріона починається, коли первинна петля, з якої починається збірка, протягується через диск або протоспіраль білка оболонки з обома кінцями РНК, що відходять з одного боку. Конформація протоспіралі білка оболонки змінюється, коли РНК вбудовується в канавку між двома шарами субодиниць. Подовження є двонаправленим, швидко просуваючись до кінця РНК, оскільки петля РНК видавлюється через віріон, що подовжується, і додаються додаткові диски білків оболонки.

Існують розбіжності щодо механізму елонгації до 3'-го кінця РНК, але схоже, що цей повільніший процес пов'язаний з додаванням менших білкових агрегатів. Субгеномні мРНК, що містять початок збірки, інкапсулюються в коротші віріони, які не є необхідними для інфекційності. Початок збірки знаходиться в межах відкритої рамки зчитування для білка руху більшості тобамовірусів. Рівень накопичення певної субгеномної мРНК, що містить початок збірки, визначає відносну частку певного виду віріонів. Таким чином, всі популяції віріонів тобамовірусів містять невеликий відсоток субгеномних мРНК білків руху. У деяких тобамовірусів, включаючи вірус зеленої крапчастої мозаїки огірків, латентний сінгапурський вірус гібіскуса, вірус зеленої крапчастої мозаїки кюрі, вірус мозаїки маракуї, вірус мозаїки коноплі, вірус зеленої крапчастої мозаїки цукіні і вірус помірної крапчастості кактусів, початок збірки розташований

у відкритій рамці зчитування білка оболонки. Таким чином, ці так звані тобамовіруси підгрупи 2 продукують значну частку малих віріонів, які містять субгеномну мРНК білка оболонки. Гібридні невірусні РНК, що містять початок збірки, також збираються з білком оболонки у вірусоподібні частинки довжиною, пропорційною довжині РНК.

Геном тобамовірусів складається з однієї одноланцюгової позитивно спрямованої РНК довжиною приблизно 6300-6800 нуклеотидів. На 5'-му кінці знаходиться метилгуанозиновий кеп, за яким слідує багатий на АУ лідер довжиною 55-75 нуклеотидів. Нетрансльований кінець РНК довжиною 30 нуклеотидів, складається з послідовностей, які можуть бути згорнуті в серію псевдовузлів, за якими слідує тРНК-подібний кінець. Тобамовіруси, що інфікують гібіскус, і латентний вірус Форт Пірса гібіскуса містять ділянку поліА між 3' кінцем відкритої рамки зчитування білка оболонки і тРНК-подібною структурою. ТРНК-подібний кінець може бути аміноацильований *in vitro* і в більшості випадків специфічно приймає гістидин. Винятком є 3' кінцева ділянка вірусу мозаїки конопель Сунна, яка приймає валін і, як видається, виникла в результаті рекомбінації між тобамовірусом і тимовірусом. Чотири відкриті рамки зчитування, які містяться в усіх геномах тобамовірусів, відповідають білкам, знайденим в інфікованій тканині. Дві відкриті рамки зчитування, що перекриваються, починаються з 5'-го проксимального стартового кодону. Термінація на першому стоп-кодоні всередині рамки призводить до утворення білка масою 125-130 кДа. Білок вагою 180-190 кДа утворюється при зчитуванні цього термінаційного кодону приблизно в 5-10% випадків. Решта білків експресуються з окремих 3' ко-термінальних субгеномних мРНК, з яких експресується лише 5' проксимальних відкритих рамок зчитування. Наступна відкрита рамка зчитування кодує білок руху 28-34 кДа, який має РНК-зв'язуючу активність і необхідний для руху від клітини до клітини. Проксимальна відкрита рамка зчитування 3' кодує білок оболонки 17-18 кДа. Субгеномна мРНК, що містить відкриту рамку зчитування для білка

розміром 54 кДа, яка охоплює наскрізний домен відкритої рамки зчитування розміром 180-190 кДа, була виділена з інфікованої тканини, хоча білок не був виявлений. У межах білок-кодуєчих ділянок геному є нуклеотидні послідовності, які також функціонують як цис-елементи для синтезу субгеномної мРНК, збірки віріонів і реплікації. Експресія генів із субгеномних мРНК регулюється як у часі, так і кількісно. Білок руху виробляється рано і накопичується до низьких рівнів, тоді як білок оболонки виробляється пізно і накопичується до високих рівнів. Регуляторні елементи для синтезу субгеномної мРНК розташовані на комплементарній РНК довжиною в геном, що перекриває відкриту рамку зчитування. Існує обмежена (40%) ідентичність послідовностей між субгеномними промоторами білка руху вірусу тютюнової мозаїки та білка оболонки. Субгеномний промотор білка руху ВТМ розташований перед відкритою рамкою зчитування білка руху, фланкуючи сайт ініціації транскрипції. На відміну від субгеномного промотора білка руху, для повної активності субгеномного промотора білка оболонки потрібні послідовності в межах відкритої рамки зчитування білка оболонки [5,6,7,8,9].

## **1.2 Біологічні методи оцінки якості води**

Глобалізація, урбанізація, зміна клімату та відсутність належного очищення стічних вод призводять до постійного зменшення доступності чистої води в багатьох регіонах світу.

Вірусні збудники є основною причиною захворювань, що передаються водою, включаючи шлунково-кишкові та респіраторні захворювання. Їх виявлення та ізоляція в навколишньому середовищі історично була важкою через низку захворювань, які вони можуть викликати, обмеження методів та їх низьку концентрацію у воді. Повідомлялося про захворювання, що передаються через воду вірусними збудниками, для всіх типів води;

більшість рекреаційних спалахів, пов'язаних із водою, також були пов'язані з вірусними патогенами.

Мікробні індикатори фекального забруднення впроваджуються в моніторинг якості води протягом кількох років у всьому світі. Незважаючи на докази наявності вірусних патогенів у воді, поточні стандарти рекреаційної та питної води в більшості країн значною мірою залежать від фекальних індикаторних бактерій, таких як *Escherichia coli*, коліформи та ентерококи.

Численні проблеми пов'язані з використанням фекальних індикаторних бактерій для оцінки якості води. Одна з них полягає в тому, що між концентрацією ентерального вірусу та концентрацією фекальних індикаторних бактерій у воді незначна або відсутня кореляція, в основному через різний вплив умов навколишнього середовища на два типи організмів. Крім того, фекальні індикаторні бактерії можуть передаватися та ідентифікуватися у вторинних резервуарах за межами кишкового тракту ссавців і, отже, не є прямим показником фекального забруднення людини. фекальні індикаторні бактерії зазвичай більш чутливі до традиційної обробки стічних вод і хлорування, ніж багато кишкових вірусних збудників [10].

Перспективною альтернативою у виявленні фекального забруднення є CrAssphage. Цей бактеріофаг, що зустрічається у великій кількості в кишечнику людини, має декілька переваг над традиційними фекальними індикаторними бактеріями. Він високоспецифічний до людських фекалій, що робить його надійним маркером забруднення стічними водами. Його висока концентрація в стічних водах сприяє легкому виявленню, навіть у розбавлених зразках. Більш того, CrAssphage є більш стабільним у воді, ніж фекальні індикаторні бактерії, що дозволяє проводити довгострокове оцінювання забруднення. Оскільки це вірус, його присутність може також краще корелювати з кишковими вірусами людини, покращуючи оцінку ризиків для здоров'я населення [11].

Зважаючи на це, багато дослідників запропонували альтернативні фекальні індикаторні організми, включаючи віруси роду *Tobamovirus*. Тому було прийнято рішення проаналізувати наявність CrAssphage та вірусів роду *Tobamovirus* на території Києва з подальшою метою виявлення кореляції між ними.

### **1.3 *Tobamovirus* як індикатор якості води**

Віруси, що передаються через воду, дуже стійкі, і багато з них можуть тривалий час виживати у водному середовищі, зрештою досягаючи джерел питної води, води для зрошення. Вони можуть слугувати шляхами зараження для людей, тварин і рослин, що робить віруси, які передаються через воду, все більш актуальною проблемою. Дослідження виявили наявність багатого вірусного різноманіття у зразках вод, де серед найбільш поширених вірусів були, відповідно, кишкові віруси людини та віруси рослин роду *Tobamovirus* [12, 13].

Тобамовіруси передаються механічним шляхом і можуть інфікувати різноманітні економічно важливі культурні рослини, такі як томат, перець, огірок, диня та кавун, завдаючи величезних збитків.

Вірус коричневої зморшкватості плодів томатів (ToBRFV) наразі є одним з найважливіших представників цього роду, і він є зростаючою глобальною загрозою для культур томатів у всьому світі через появу штамів, що руйнують резистентність [14]. Для томатів також дуже небезпечним є вірус мозаїки томатів (ToMV), він зустрічається по всьому світу і вражає велику кількість інших рослин.

Інший тобамовірус, вірус зеленої плямистості огірків (CGMMV), також з'являється знову і спричиняє значні втрати врожаю огірків. Повідомлення про виявлення інфекційних тобамовірусів в очищених стічних водах або водах навколишнього середовища та їх виживання протягом 6 місяців свідчать про те, що вода може відігравати важливу роль в епідеміології та

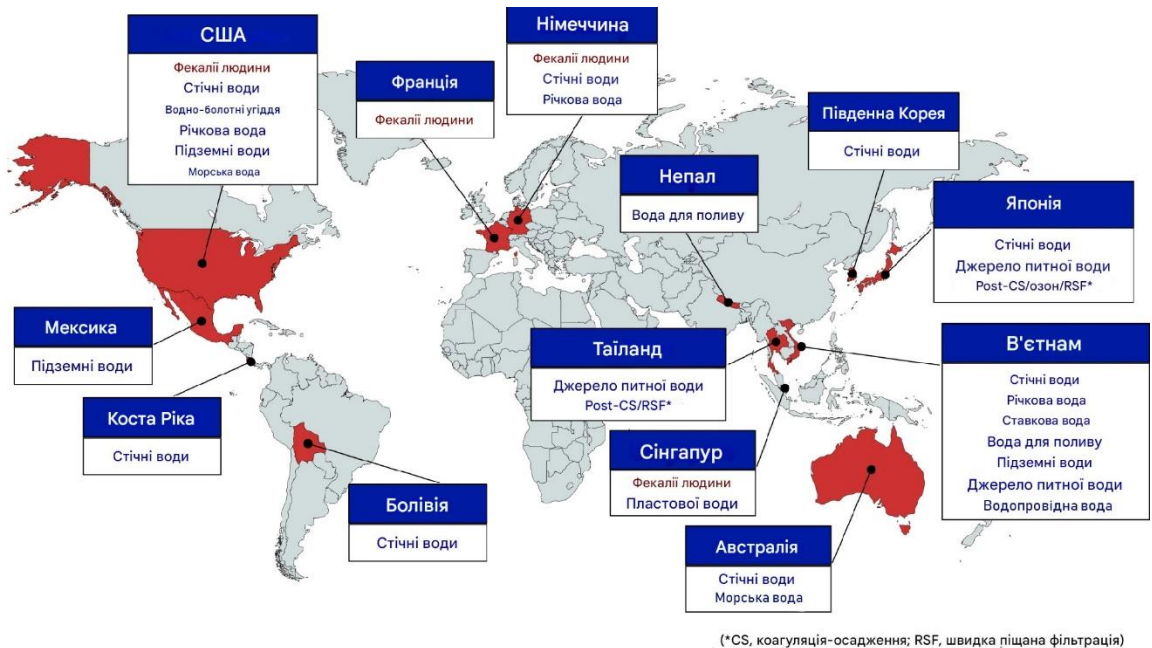
передачі цих вірусів. Це було підтверджено дослідженнями, в яких повідомлялося про опосередковану водою передачу CGMMV та інших тобамовірусів, і це стає особливо актуальним для культур, вирощених за допомогою гідропоніки [15].

Вірус м'якої плямистості перцю (PMMoV) - тобамовірус, дуже близький до вищезгаданих ToBRFV та CGMMV. PMMoV спричиняє захворювання рослин перцю, і, як і для інших тобамовірусів, нещодавно було підтверджено, що він залишається інфекційним після очищення стічних вод на водоочисних спорудах. Це становить ризик для регіонів, де для зрошення використовується регенерована вода.

Крім того, PMMoV є настільки стійким вірусом, що може вижити в суворих умовах шлунково-кишкового тракту людини, і він залишається інфекційним навіть після виведення з фекаліями, де, як було доведено, він є найбільш домінуючим вірусом, залежно від харчових звичок.

Ідентифікація PMMoV у фекаліях була вперше досягнута за допомогою вірусної метагеноміки та повідомлена в 2006 році. Дослідники повідомили, що найпоширенішим РНК-вірусом у трьох зразках фекалій здорових дорослих у Сполучених Штатах був PMMoV, що містить 75,7–99,4% усіх послідовностей, ідентифікованих у фекальній РНК-вірусній спільноті. Філогенетичний аналіз штамів PMMoV, виявлених у зразках фекалій, показав, що штами PMMoV були дуже різними навіть у двох зразках фекалій, зібраних від однієї особи, що означає, що циркуляція PMMoV в популяціях людей є динамічною. PMMoV згодом було виявлено у фекаліях за допомогою звичайної RT-PCR або RT-qPCR у шести (67%) із дев'яти зразків у Сполучених Штатах, 11, шести (67%) із дев'яти зразків у Сінгапурі, 1119 (95%) із 20 зразки в Німеччині, 28 і в зразках одного (0,48%) з 208 госпіталізованих дітей і 22 (7,2%) з 304 дорослих пацієнтів у Франції. Хоча рівень виявлення змінюється в різних дослідженнях, ймовірно, через відмінності в методах виявлення або впливу PMMoV, ці дослідження

продемонстрували, що присутність РММoV у калі є географічно широкою (рис.1.3) [16, 17].



**Рис. 1.3.** Країни та типи зразків повідомленого виявлення РММoV у фекаліях людини та водному середовищі [18].

Концентрація РММoV у фекаліях висока, коливається від  $10^5$  до  $10^{10}$  копій/г фекалій (суха маса).

Штами, виділені в людських фекаліях, генетично різноманітні з динамічними фекальними популяціями в організмі особи і, зокрема, залишаються життєздатними та інфекційними для рослин-господарів.

РММoV не було виявлено у зразках фекалій або кишкових гомогенатах більшості тварин, таких як індики, коні, койоти, єноти, вівці, качки, свині та собаки.

Було виявлено, що РММoV зберігається не тільки в умовах ферми, але й у багатьох протоколах обробки їжі. Після початкової ізоляції було виявлено, що він виживає при  $90\text{ }^\circ\text{C}$  до 10 хвилин у рослинному соку. Дослідники виявили РММoV у трьох продуктах із переробленого перцю з Сан-Дієго, включаючи соус чилі та мелений чилі, а також чотири зразки соусу чилі з Сінгапуру. Дослідження, проведене у Франції, також показало, що послідовності РНК РММoV були ідентифіковані в 12 (57%) з 21

комерційних харчових продуктів, що містять перець, таких як соуси та порошки. Це дослідження показало, що соус Tabasco містив найвищу за оцінками концентрацію РММoV-РНК майже  $10^7$  копій/мл, а наявність вірусних частинок підтверджено електронною мікроскопією. Крім того, було продемонстровано, що РНК-позитивні оброблені продукти РММoV містили життєздатні частинки РММoV, здатні інфікувати рослину-господаря. Ці висновки в сукупності продемонстрували, що непошкоджені частинки РММoV можуть зберігатися під час стандартної обробки їжі, яка включає високу температуру та низьку кількість води, і що їжа може бути потенційним джерелом РММoV у фекаліях людини через ковтання [19, 20].

Найвидатнішою перевагою РММoV як організму-індикатора є те, що його можна більш послідовно спостерігати у кількісно визначених і вищих концентраціях, ніж будь-який людський вірус, без істотних сезонних коливань у середовищі. Іншими словами, РММoV може бути присутнім завжди, коли присутні кишкові віруси людини, а сигнали РММoV qPCR служать чутливим біологічним маркером, що вказує на присутність вірусних патогенів у даному зразку води навколишнього середовища. Зазвичай це стосується всіх типів води, включаючи стічні води, річкову воду, підземну воду, морську воду та питну воду.

Контрольовані лабораторні експерименти також продемонстрували, що РММoV демонструє більшу стабільність, ніж інші кишкові віруси людини, у воді навколишнього середовища, зокрема річковій воді, морській воді, та воді водно-болотних угідь. Ця унікальна особливість РММoV з точки зору стабільності навколишнього середовища підтверджує його корисність як індикатор продуктивності очисних споруд для води та стічних вод для оцінки ефективності очищення.

Порівняно з хімічними маркерами, можна вважати, що РММoV має більше переваг як вірусний маркер фекального забруднення. Частково це пояснюється тим, що РММoV повинен поводитися більше подібно до ентєральних вірусів, ніж до хімічних маркерів. Дослідники повідомили, що

корисність РММoV як індикатора забруднення стічних вод у поверхневих водах була порівнянна з корисністю кофеїну, який є широко використовуваним хімічним маркером фекального забруднення людини у водоймах. Зокрема, кількість РММoV у неочищених стічних водах, динамічний діапазон концентрації, стійкість і всюдисущість у поверхневих водах можна порівняти з кофеїном

Незважаючи на те, що виявлення ДНК-вірусів, таких як HAdV або HРyV, простіше, ніж РНК-вірусів (оскільки не вимагає етапу ЗТ), РММoV можна легко протестувати разом з іншими кишковими вірусами, що представляють інтерес, за допомогою молекулярно-біологічних методів (наприклад, RT-qPCR), оскільки РММoV має РНК-геном, як і у багатьох кишкових вірусів людини. Це особливо корисно для досліджень, пов'язаних з оцінкою та управлінням вірусною якістю води [21, 22, 23].

РММoV було визнано непатогенним для людини, що є ще однією важливою перевагою в якості індикатора. Працювати з РММoV простіше та безпечніше, ніж з потенційно патогенними індикаторами як при виявленні в навколишньому середовищі, так і в лабораторних експериментах.

До недоліків, що постали при використанні даного вірусу як індикатору якості води можна віднести відмінності в морфології та поверхневому заряді порівняно з вірусами людини. Морфологія РММoV (паличкоподібна) не схожа на кишкові віруси людини (ікосаедральна форма), а ізоелектрична точка між ними помітно відрізняється. За певних обставин це може призвести до відмінностей у поведінці в навколишньому середовищі та швидкості видалення/зниження під час процесів очищення води. Крім того, це може вплинути на ефективність методів концентрації вірусів. Необхідні подальші дослідження, щоб визначити, якою мірою кожен з цих факторів впливає на значні відмінності в поведінці між РММoV та кишковими вірусами, що представляють інтерес.

Також у кількох доповідях вказується на обмеженість РММoV як вірусного індикатора через непослідовну появу та поведінку порівняно з

людськими вірусами. Дослідники дійшли висновку, що РММoV не підходить як фекальний індикатор або маркер у ґрунтових водах, та бутильованій воді, оскільки частота виявлення та концентрація РММoV у цих водах були дуже низькими, тому потрібно ще доволі багато досліджень та тестів [24, 25, 26].

#### 1.4 Ідентифікація та кількісне визначення *Tobamovirus*

Виділення нуклеїнової кислоти є першим кроком в ідентифікації тобамовірусів, і вибір методики залежить від типу зразка. У сільськогосподарському виробництві РНК РММoV зазвичай виділяють із насіння або листя інфікованих рослин роду *Capsicum* шляхом механічного подрібнення. У перероблених продуктах харчування, стічних водах і фекаліях РНК РММoV зазвичай присутня у високих концентраціях, що дозволяє проводити пряме виявлення вірусу [27, 28].

Однак низькі концентрації РММoV, характерні для аналізу фекального забруднення, вимагають використання методів концентрування вірусу перед його виявленням. Стандартні методи, розроблені для кишкових вірусів, були адаптовані для ізоляції та концентрування РММoV із різних матриць, включаючи салат та молюски.

Вибір методу для водних зразків залежить від об'єму і типу води. Для невеликих об'ємів зразків (< 2 л) РММoV виділяють за допомогою адсорбції-елюювання на електронегативних мембранних фільтрах. Подальше концентрування елюата здійснюється шляхом осадження поліетиленгліколем або використанням відцентрових фільтр-концентраторів [29, 30].

Для великих об'ємів зразків (>30 літрів), таких як ґрунтові води або питна вода, використовуються нанокерамічні фільтри, фільтри зі скловолокна, целюлозно-ефірні картриджні фільтри і порожнисті волоконні ультрафільтри [31, 32, 33, 34, 35].

Деякі методи можуть безпосередньо відокремлювати вірусні нуклеїнові кислоти від мембранного фільтра, що використовується для адсорбції-елюювання. Крім того, відцентрові фільтри-концентратори використовуються для невеликих об'ємів стічних вод, де очікується висока концентрація вірусів.

Розроблені для кишкових вірусів, можуть не зовсім відповідати структурним особливостям РММoV, і для оптимізації таких процедур необхідні подальші дослідження. Для моніторингу ефективності концентрації вірусу використовують референтні віруси з подібними до РММoV властивостями. Наприклад, вірус зеленої крапчастої мозаїки огірків, також представник роду *Tobamovirus*, був використаний як контроль для досліджень у концентрації РММoV [36].

Хоча РММoV-подібні частинки можна візуалізувати за допомогою електронної мікроскопії, РММoV найчастіше виявляють за допомогою молекулярних або імунологічних методів.

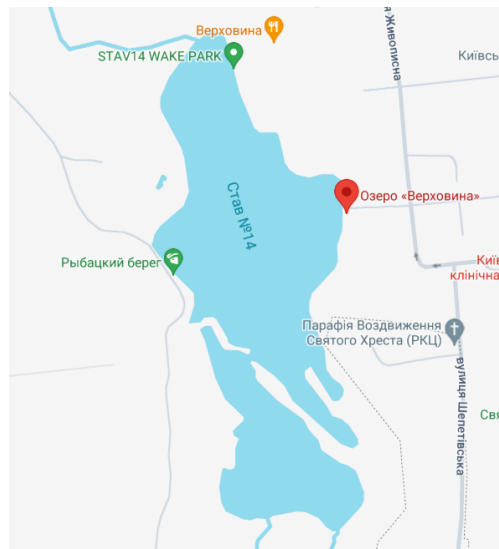
Для оцінки мікробіологічної якості води та харчових продуктів найчастіше застосовують молекулярні методи, включно з RT-PCR та RT-qPCR, які дозволяють розрізняти інфекційні та неінфекційні частинки. Ефективність цих тестів залежить від вибору набору для очищення РНК і типу зразка. Зворотна транскрипція зазвичай виконується в два етапи з використанням специфічних праймерів.

Кількісні методи, такі як RT-qPCR, забезпечують високу точність і чутливість, і можуть виявляти мінімальні концентрації вірусів. Для підвищення точності аналізу використовують модифіковані праймери та зонди, які знижують межу виявлення до 10 мішеней. Сучасні методи також були адаптовані для тестування різноманітних матриць, включаючи стічні води, харчові продукти та зразки рослин [37].

## РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень

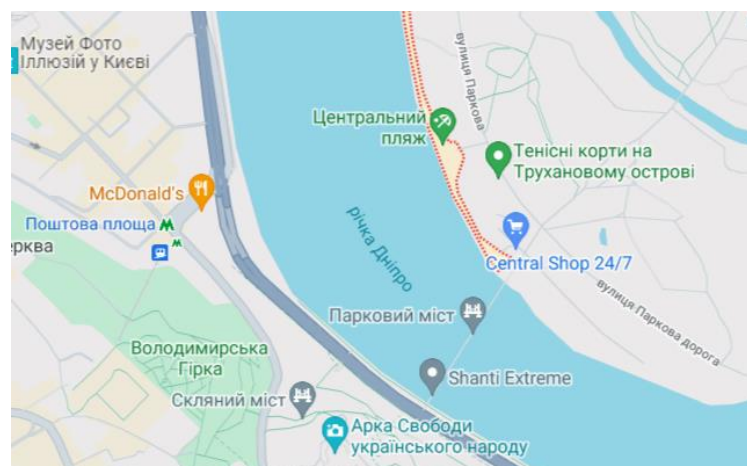
### 2.1 Матеріали досліджень

Зразки води були зібрані з різних місць міста Києва. Перший зразок містив прісну воду з озера Верховина, місце відбору проби зображено на рис 2.1.



**Рис. 2.1.** Місце відбору зразка досліджуваної води озеро Верховина [38]

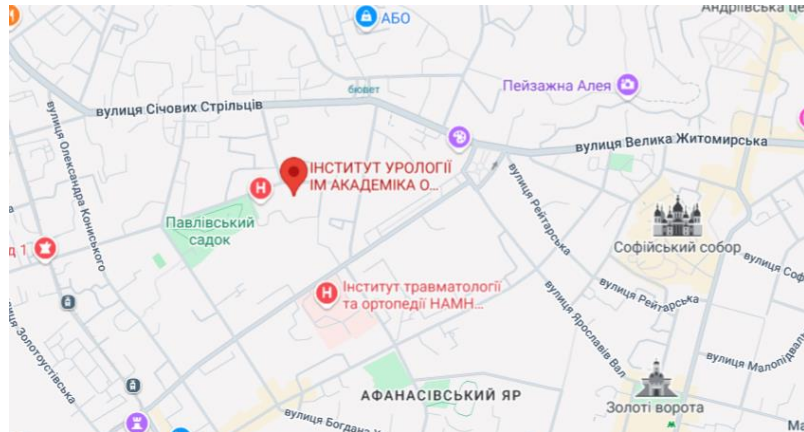
Другий зразок було отримано з річки Дніпро поблизу центрального пляжу місце відбору проби зображено на рис 2.2.



**Рис. 2.2.** Місце відбору зразка досліджуваної води річка Дніпро [39]

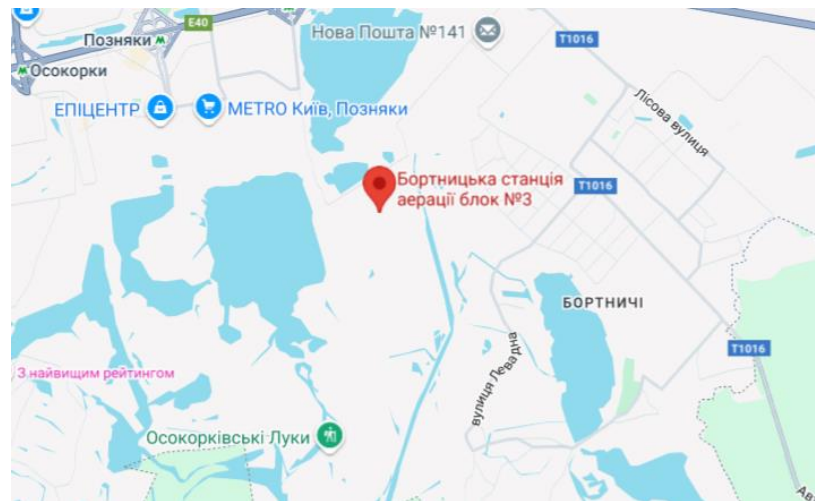
Третій зразок містив стічні води з Інституту урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН України, що можуть містити специфічні мікроорганізми та

забрудники медичного походження. Місце відбору проби зображено на рис. 2.3.



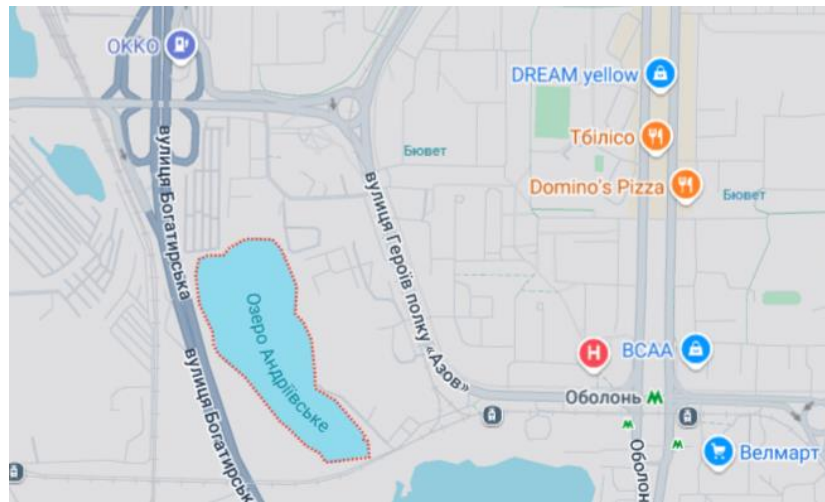
**Рис. 2.3.** Місце відбору зразка стічних вод Інститут урології [40]

Четвертий зразок включав стічні води, отримані з Бортницьких водоочисних споруд, місце відбору проби зображено на рис. 2.4.



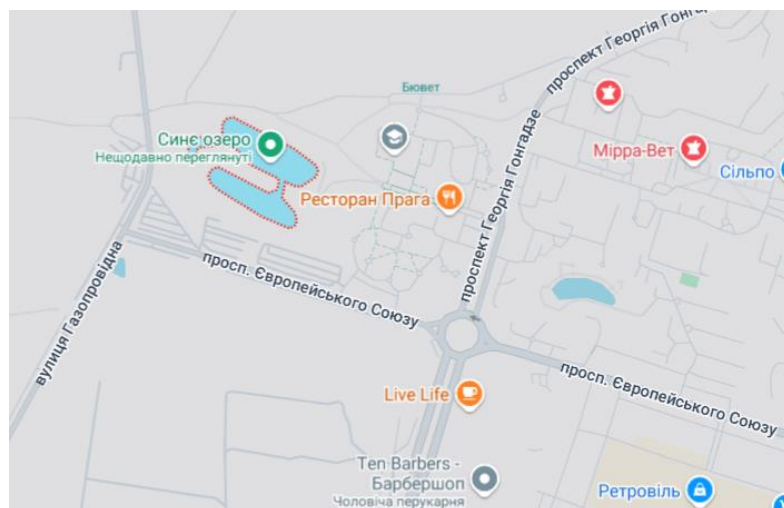
**Рис. 2.4.** Місце відбору зразка стічних вод Бортницькі водоочисні споруди [41]

П'ятий зразок був відібраний з озера Андріївське, що є частиною екосистеми міста, місце відбору проби зображено на рис. 2.5.



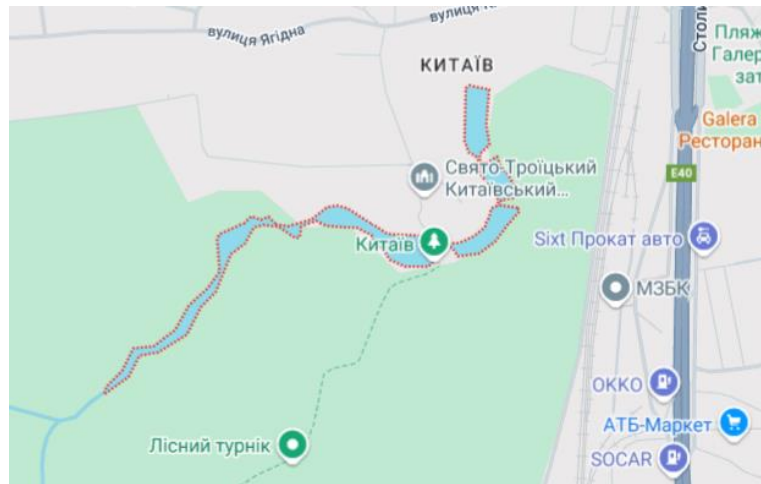
**Рис. 2.5.** Місце відбору зразка досліджуваної води озеро Андріївське [42]

Шостий зразок був отриманий з озера Синє, місце відбору проби зображено на рис. 2.6.



**Рис. 2.6.** Місце відбору зразка досліджуваної води озеро Синє [43]

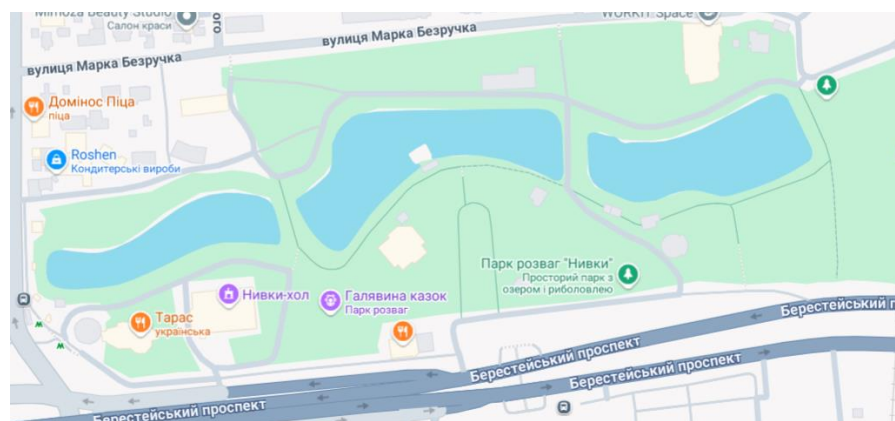
Сьомий зразок було відібрано з Китаївських ставків, місце відбору проби зображено на рис. 2.7.



**Рис. 2.7.** Місце відбору зразка досліджуваної води Китаївські ставки

[44]

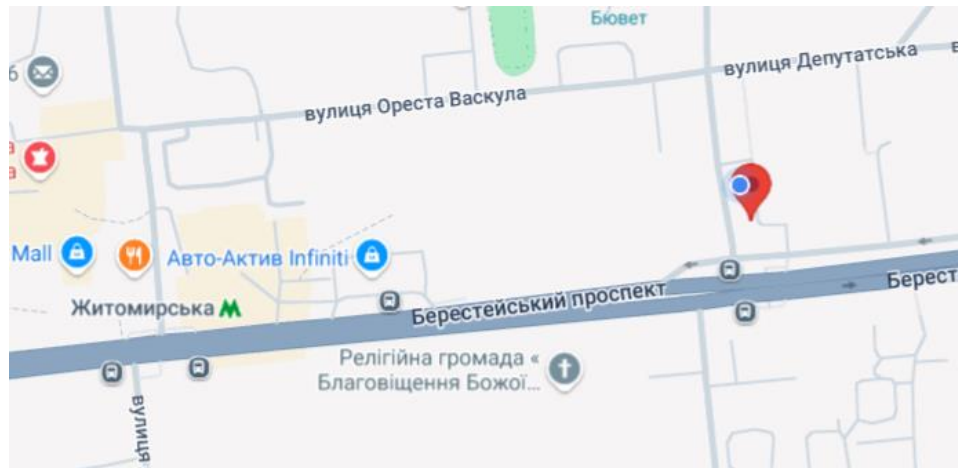
Восьмий зразок був отриманий з озера в парку Нивки, місце відбору проби зображено на рис. 2.8.



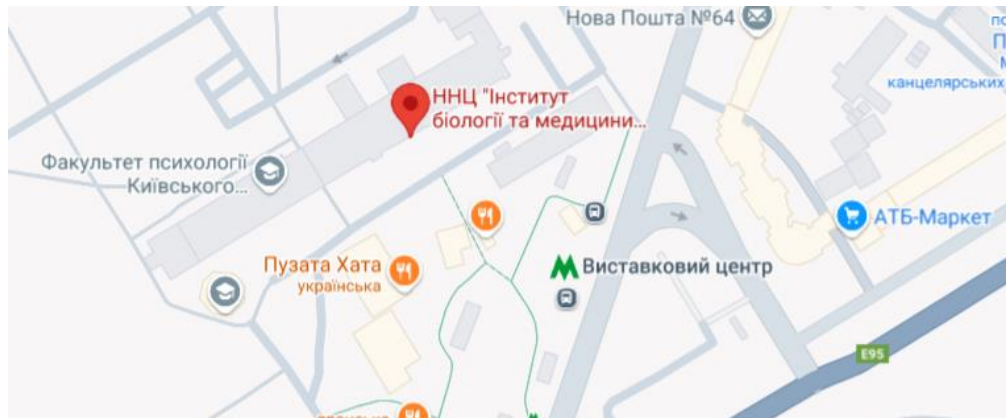
**Рис. 2.8.** Місце відбору зразка досліджуваної води озеро в парку Нивки

[45]

Дев'ятий та десятий зразки включали водопровідну воду, отриману зі Святошинського та Голосіївського районів відповідно, місця відбору проб зображено на рис. 2.9 та 2.10.

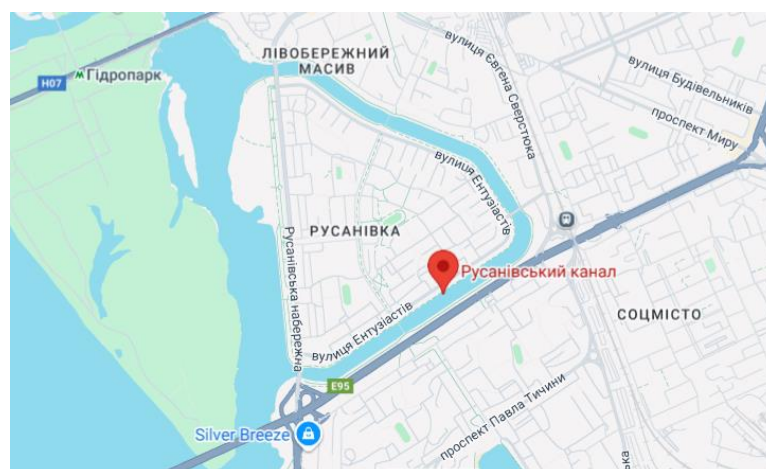


**Рис. 2.9.** Місце відбору зразка водопровідної води Святошинський район [46]



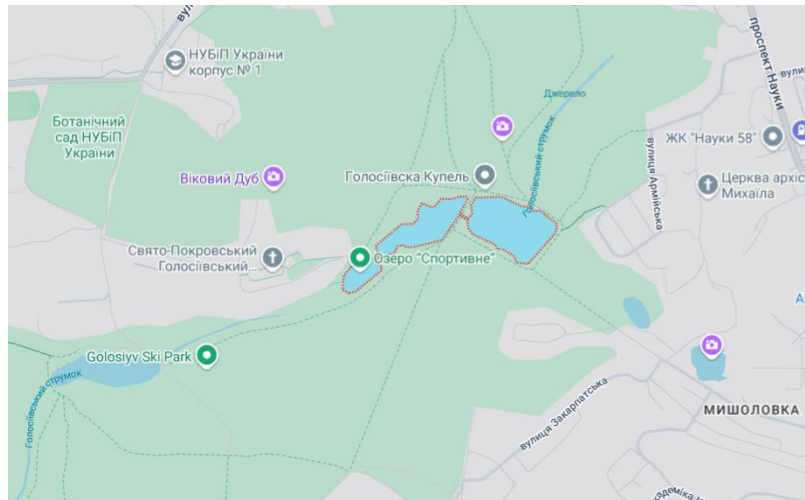
**Рис. 2.10.** Місце відбору зразка водопровідної води Голосіївський район [47]

Одинадцятий зразок було отримано з Русанівського каналу, місце відбору проби зображено на рис. 2.11.



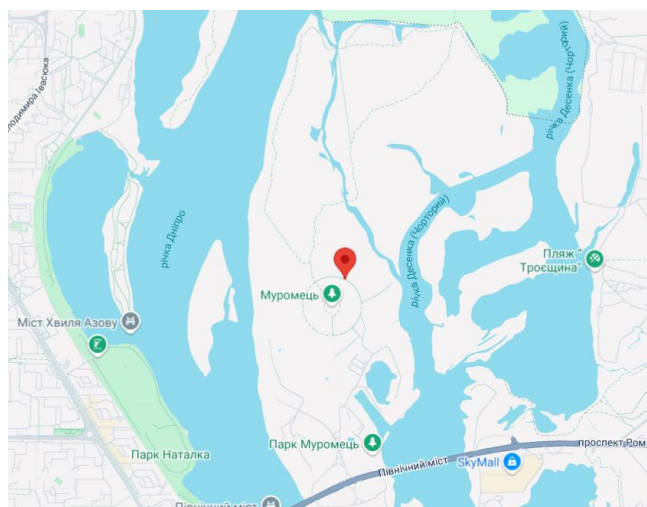
**Рис. 2.11.** Місце відбору зразка досліджуваної води Русанівський канал [48]

Дванадцятий зразок було відібрано з Голосіївських озер, місце відбору проби зображено на рис. 2.12.



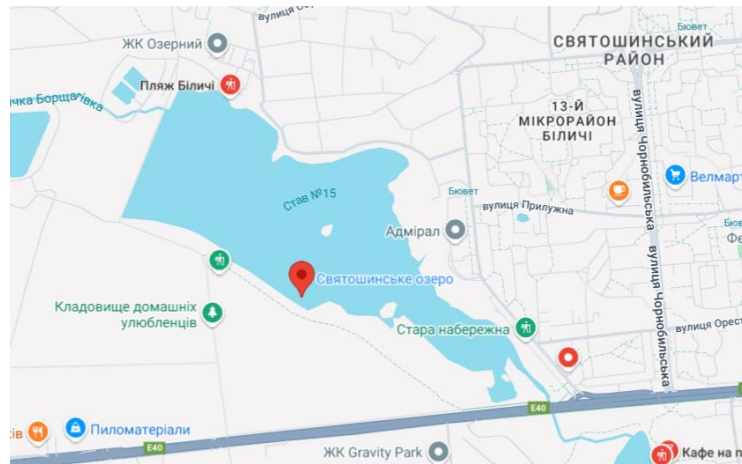
**Рис. 2.12.** Місце відбору зразка досліджуваної води Голосіївські озера [49]

Тринадцятий зразок був отриманий з водойми на острові Муромець, місце відбору проби зображено на рис. 2.13.



**Рис. 2.13.** Місце відбору зразка досліджуваної води острова Муромець [50]

Чотирнадцятий зразок було взято з Святошинського озера, місце відбору проби зображено на рис. 2.14.



**Рис. 2.14.** Місце відбору зразка досліджуваної води Святошинське озеро [51]

З кожного місця було зібрано 1 л зразка води. Проби відбирались з глибини 10-15 см від поверхні води. Одержаний матеріал було підписано та поміщено в термопакети з холодowymi елементами з дотриманням правил холододового ланцюга. До проведення аналізу проби зберігалися в холодильнику [52].

## 2.2 Методи досліджень

Для підготовки зразків води та ідентифікації вірусних індикаторів було застосовано комплекс різних методів.

Першим етапом є груба фільтрація для видалення великих механічних частинок і органічних домішок.

Наступним етапом є центрифугування, яке осаджує менші зважені частинки і підвищує ефективність концентрації вірусних частинок.

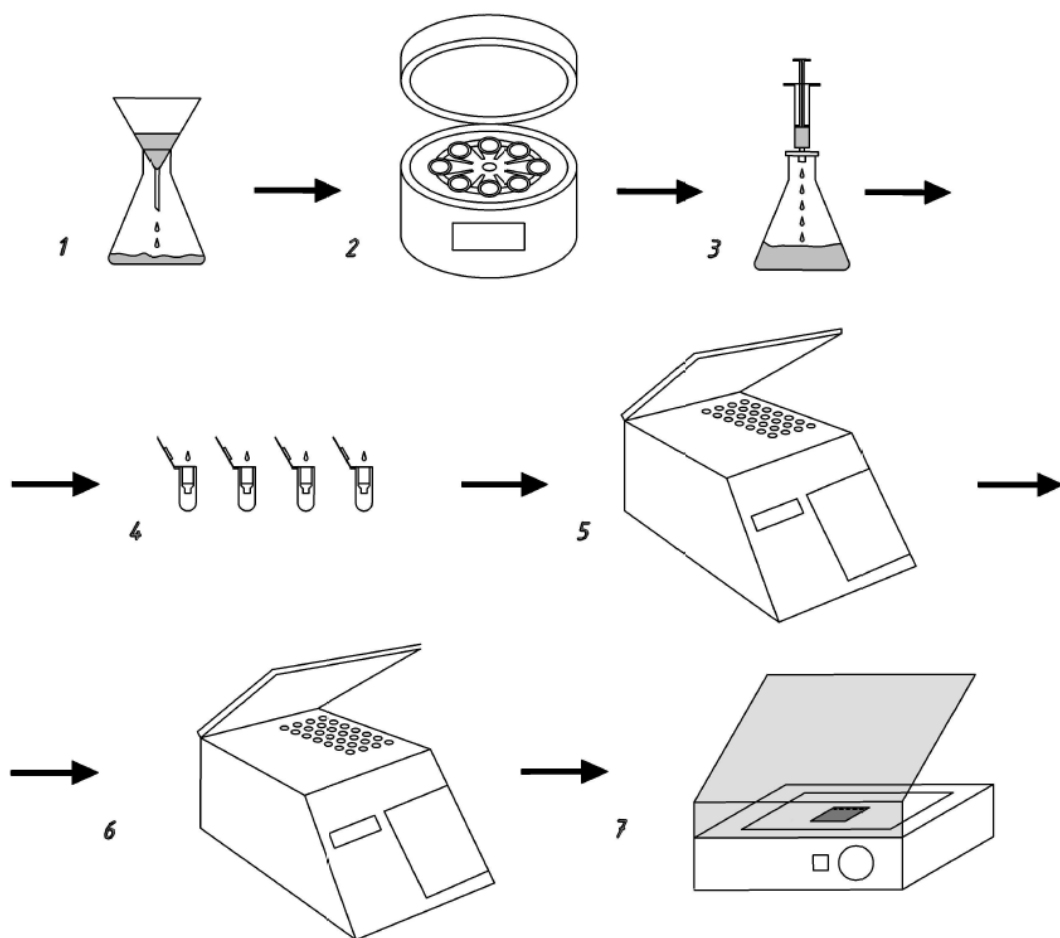
Зразки концентрували за допомогою шприцевих вірусних фільтрів, щоб сконцентрувати потенційні вірусні частинки в меншому об'ємі рідини і збільшити їх концентрацію для подальшого аналізу. Один зі зразків було концентровано методом ультрацентрифугування.

Виділення РНК проводилося за допомогою спеціальних реагентів і наборів для екстракції нуклеїнових кислот. Наступним етапом є зворотна

транскрипція, яка перетворює вірусну РНК на комплементарну ДНК (кДНК) для подальшого аналізу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

ПЛР дозволяє виявити та ідентифікувати віруси у зразках води шляхом ампліфікації специфічних фрагментів вірусної кДНК.

Завершальним етапом дослідження є електрофорез в агарозному гелі, який дозволяє візуалізувати продукти ПЛР-ампліфікації, оцінити їх розмір і підтвердити наявність цільових фрагментів нуклеїнових кислот. Основні етапи дослідження показані на рисунку 2.15.



**Рис. 2.15.** Схема проведення дослідження : 1 - грубе фільтрування; 2- центрифугування; 3 - концентрування зразків; 4 - виділення РНК; 5 - зворотна транскрипція; 6-полімеразна ланцюгова реакція; 7 – електрофорез

### **2.2.1 Підготовка проб до дослідження**

Першим етапом дослідження була підготовка зразків води, яка включала кілька послідовних кроків для видалення механічних домішок і отримання максимально чистого зразка для подальших аналізів.

По-перше, проба води відстоювалася протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, щоб дати можливість великим частинкам осісти природним чином.

Потім її пропустили через стерильний фільтр з фільтрувального паперу для грубого очищення. Цей процес видалив більшість зважених частинок, таких як пісок, мул, органічні залишки та інші механічні домішки, які можуть вплинути на результати дослідження. Очищена таким чином вода стікала в стерильні колби, щоб мінімізувати ризик перехресного забруднення.

Наступним кроком було повне очищення шляхом центрифугування. Відфільтрована вода була перенесена в попередньо простерилізовані центрифужні пробірки, щоб уникнути забруднення зразків.

Центрифугування проводили при 5000 об/хв протягом 15 хвилин, щоб осадити будь-які тверді частинки та бактерії, що залишилися. Цю процедуру повторювали кілька разів, поки весь об'єм води не був центрифугований. Після завершення кожного циклу надосадову рідину обережно відбирали і переносили в нову стерильну колбу для подальшого аналізу.

Таким чином, комплексна двоступенева система очищення значно зменшила кількість механічних домішок у зразку, підвищила точність подальших експериментів і мінімізувала вплив небажаних факторів на результати дослідження.

### **2.2.2 Концентрування зразків**

Зразки концентрували за допомогою спеціальних шприцевих фільтрів, призначених для видалення вірусів та інших мікроорганізмів. Мембранні фільтри, що використовуються в цьому процесі, є поверхневими фільтрами

з чітко вираженою мікропористою структурою для ефективного утримання частинок певного розміру. Вони широко використовуються в мікробіологічних і вірусологічних дослідженнях для розділення, відновлення і подальшого аналізу мікроорганізмів.

Розмір пор таких фільтрів становить 0,2 мкм і може ефективно затримувати більшість частинок вірусів, бактеріофагів і деяких бактерій [53].

Концентрування проводили шляхом пропускання всього об'єму відцентрифугованої води через фільтр за допомогою стерильного шприца.

Вода пропускалася через мембрану під тиском поршня шприца, що забезпечувало рівномірне осадження вірусних частинок на поверхні фільтра.

Важливим аспектом цієї процедури було уникнення контамінації зразка та дотримання стерильності на всіх етапах дослідження з метою отримання найбільш достовірних результатів.

Після того, як фільтрація була завершена і весь зразок води пройшов через фільтр, віруси, що містилися в зразку, залишилися на поверхні мембрани. Для подальшого використання фільтр обережно виймали з тримача і поміщали в стерильну чашку Петрі. Таким чином, вірусні частинки можна було зберігати в контрольованому середовищі до наступного етапу аналізу.

Для елюювання частинок вірусу з поверхні фільтра використовували 200 мкл буферного розчину, щоб ефективно екстрагувати вірус, не пошкоджуючи його структуру.

Цю процедуру виконували в зворотному напрямку до початкової фільтрації за допомогою стерильного шприца, тобто повільно втягуючи буферний розчин з фільтра в шприц.

Цей метод забезпечив максимально ефективне отримання суспензії вірусу для подальших досліджень і мінімізував втрату зразків. Стерильність і чітка послідовність етапів цього методу концентрування зробила збір

вірусів більш ефективним і дозволила провести подальший аналіз складу і концентрації вірусів у зразках води.

Один зі зразків води був сконцентрований методом ультрацентрифугування, щоб порівняти ефективність різних підходів до збагачення вірусних частинок.

Таке рішення було прийнято для оцінки потенціалу методів концентрування для ідентифікації модельних вірусів рослин у різних водних середовищах. Під час фільтрації частина вірусу може адсорбуватися на мембрані фільтра або втрачатися через низьку розчинність у водному середовищі. Ультрацентрифугування дозволяє частинкам вірусу осаджуватися, не проходячи через фільтр, таким чином зменшуючи потенційні втрати. Крім того, вірусні фільтри часто мають обмеження на розмір пор (наприклад, 0,22-0,45 мкм), що ускладнює затримання дуже малих вірусів або, навпаки, віруси можуть бути втрачені через засмічення фільтра. З іншого боку, метод ультрацентрифугування використовує відцентрову силу для концентрації вірусів незалежно від їх розміру, що підвищує ефективність цього методу. Крім того, вода може містити органічні та неорганічні домішки, які впливають на ефективність фільтрації, але ультрацентрифугування може відокремити вірус від інших компонентів зразка, особливо за допомогою градієнта щільності, що згодом підвищує рівень виявлення. Крім того, ультрацентрифугування прискорює концентрацію вірусу і знижує ризик його втрати, оскільки концентрований осад отримують за менший час та з меншою витратою сил. Тому ультрацентрифугування визнано придатним методом для концентрування зразків, оскільки воно зменшує втрати вірусів, не залежить від розміру вірусу, усуває вплив домішок і підвищує ефективність концентрування [54].

Ультрацентрифугування проводилося при умовах 100000g, 32000 об/хв протягом 4 годин при температурі 4°C (ультрацентрифуга Beckman Coulter). Після цього отриманий осад був ресуспендований в 1 мл 0,1M Tris-HCl (pH 8) буферу.

### 2.2.3 Виділення нуклеїнових кислот

Виділення нуклеїнових кислот відбувалося відповідно до протоколу, розробленого для набору GeneJET™ Viral DNA and RNA Purification Kit (Thermo Scientific, США) [55]. Ця процедура включала ключові етапи: підготовку колонки, лізис, зв'язування зразка, промивання та елюювання, що забезпечувало ефективне виділення вірусних нуклеїнових кислот з високою чистотою.

На першому етапі відбувалась підготовка спін-колонки, що була необхідною для забезпечення оптимальної ефективності зв'язування нуклеїнових кислот з мембраною. У центр мембрани спін-колонки додавали 50 мкл рідини для підготовки колонок, щоб повністю зволожити мембрану і покращити подальше зв'язування ДНК/РНК.

Етап лізису передбачав руйнування вірусної оболонки та вивільнення нуклеїнових кислот:

1. У порожню 1,5-мл пробірку вносили 200 мкл зразка.
2. Додавали 200 мкл лізуючого розчину та 50 мкл протеїнази К, потім ретельно перемішували для рівномірного розподілу реагентів.
3. Зразок інкубували протягом 15 хвилин при 56°C, що сприяло ефективному руйнуванню білкових компонентів та інактивації нуклеаз.
4. Після інкубації проводили коротке центрифугування (3-5 секунд при 6000 об/хв) для осадження можливих клітинних фрагментів.

Для ефективного зв'язування вірусної ДНК/РНК з мембраною спін-колонки виконували такі дії:

1. До зразка додавали 300 мкл етанолу (96-100%) та ретельно перемішували, забезпечуючи повну преципітацію нуклеїнових кислот.
2. Пробірку інкубували при кімнатній температурі протягом 3 хвилин, що сприяло покращенню взаємодії нуклеїнових кислот з сорбційною мембраною.

Промивання проводилось у кілька етапів для видалення забруднень та забезпечення чистоти кінцевого зразка:

1. Лізат переносили на підготовлену спін-колонку.
2. Центрифугували протягом 1 хвилини при 6000 об/хв, після чого супернатант зливали.
3. Колонку переносили в нову 2-мл пробірку.
4. Додавали 700 мкл промивного буфера 1 (з додаванням етанолу), що допомагало видалити залишкові білкові та ліпідні домішки.
5. Центрифугували колонку 1 хвилину при 6000 об/хв, після чого рідину зливали.
6. Колонку знову переносили в чисту 2-мл пробірку.
7. Додавали 500 мкл промивного буфера 2 (з додаванням етанолу) для подальшого очищення.
8. Центрифугували колонку 1 хвилину при 6000 об/хв, після чого рідину зливали.
9. Колонку переносили в нову пробірку та додатково центрифугували протягом 3 хвилин при 6000 об/хв для повного видалення залишкової рідини.

На фінальному етапі проводилось вилучення (елюювання) очищених вірусних нуклеїнових кислот:

1. Спін-колонку переносили в нову 1,5-мл пробірку для елюювання.
2. До центру мембрани колонки додавали 50 мкл елюенту, попередньо нагрітого до 56°C, що сприяло ефективному вивільненню зв'язаних молекул ДНК/РНК.
3. Інкубували колонку протягом 3 хвилин при кімнатній температурі для максимального вилучення нуклеїнових кислот.
4. Центрифугували протягом 3 хвилин при 6000 об/хв, щоб отримати кінцевий очищений зразок.

Отримана пробірка містила чисті вірусні нуклеїнові кислоти, придатні для подальшого використання в молекулярно-біологічних дослідженнях, таких як ПЛР-аналіз.

Ця методика забезпечує отримання високоякісних нуклеїнових кислот, які можуть бути проаналізовані без ризику контамінації або деградації.

#### **2.2.4 Зворотна транскрипція**

Оскільки дослідження включало РНК вірусів рослин, наступним кроком була зворотна транскрипція для отримання комплементарної ДНК (кДНК).

Цей процес є ключовим для подальшого аналізу, оскільки робить кДНК доступною для методів ампліфікації та секвенування.

Процедуру зворотної транскрипції проводили згідно з протоколом M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs (NEB), США). Цей фермент є РНК-залежною ДНК-полімеразою, яка каталізує синтез кДНК на матриці вірусної РНК [56].

Для проведення процедури було змішано наступні компоненти:

Виділена на попередньому етапі РНК – 3 мкл;

Random Primer Mix (60  $\mu$ M) – 2 мкл

Буфер 10X M-MuLV – 2 мкл

M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ l) – 1 мкл

10 mM dNTP – 1 мкл

Інгібітор РНКаз (40 U/ $\mu$ l) – 0,2 мкл

Безнуклеазна H<sub>2</sub>O – 11,5 мкл (до загального об'єму 20 мкл)

Спочатку реакційну суміш інкубували при 25°C протягом 5 хв для забезпечення ефективного зв'язування випадкових праймерів з РНК-матрицею. Потім інкубацію продовжували при 42°C протягом 60 хв, щоб

фермент міг ефективно синтезувати кДНК. Останнім етапом реакції була інактивація ферменту шляхом нагрівання при 70°C протягом 10 хвилин.

### 2.2.5 Полімеразна ланцюгова реакція

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції використовували набір OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (M0482) (New England Biolabs (NEB), США) [57].

Він містить необхідні компоненти для ефективної ампліфікації ДНК, включаючи ДНК-полімеразу OneTaq, dNTPs та буферну систему.

На цьому етапі було використано 4 пари праймерів до РММoV, ToMV та до ToBRFV (табл 2.1).

**Таблиця 2.1**

#### Використані праймери [58, 59, 60, 61]

Вірус	Орієнтація	Послідовність	Розмір амплікону, bp
РММoV	Forward	5'-TACTTCGGCGTTAGGCAATC-3'	387
	Reverse	5'-GGAGTTGTAGCCCAGGTGAG-3'	
ToMV	Forward	5'-CGGAAGGCCTAAACCAAAAAG-3'	700
	Reverse	5'-ATTTAAGTGGAGGGAAAAACACT-3'	
ToBRFV	Forward	5'-CACAATCGCAACTCCATCGC-3'	458
	Reverse	5'-CAGAGGACCATTGTAAACCGG-3'	
CrAssphage	Forward	5'-CAGCAGAAGTCCAATCTTTATCAAG-3'	348
	Reverse	5'-GATGATGCTGCTGCAATTAACG-3'	

Реакційні суміші готували на льоду, щоб запобігти неспецифічній ампліфікації та деградації реагентів. Для кожної проби води проводили окремі ПЛР-реакції в тонкостінних ПЛР-пробірках, що містили такі компоненти:

OneTaq 2X Master Mix with Standard Buffer – 12,5 мкл;

Forward Primer – 1 мкл;

Reverse Primer – 1 мкл;

кДНК – 3 мкл;

Безнуклеазна H<sub>2</sub>O – 7,5 мкл;

Після ретельного перемішування всіх компонентів пробірки переносили в термоцикл і проводили ампліфікацію ДНК відповідно до температурних умов, наведених у таблиці 2.2. Інкубація реакційної суміші включала етапи денатурації, відпалу праймерів та елонгації для забезпечення специфічної ампліфікації вірусних нуклеїнових кислот.

**Таблиця 2.2**

**Температурний режим ПЛР [57]**

Температура	Час	Кількість циклів
95 °C	5 хв	1
95 °C	30 с	30
55 °C	30 с	30
72 °C	45 с	30
72 °C	5 хв	1

**2.2.6 Електрофорез**

Для електрофорезу нуклеїнових кислот використовували 1,5% агарозний гель, який дозволяє ефективно розділяти фрагменти ДНК відповідно до їх розміру.

Для приготування гелю 0,3 г агарози точно зважували і додавали до 20 мл TBE-буфера. Щоб отримати TBE було змішано 5.4 г Tris, 2.75 г борної

кислоти та 0.372 г EDTA (динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти) у 400 мл дистильованої води. Після розчинення компонентів об'єм розчину доводили до 500 мл дистильованою водою та ретельно перемішали.

Суміш агарози та буфера ретельно перемішували і нагрівали в мікрохвильовій печі приблизно 1 хв 20 с до повного розчинення агарози. Після нагрівання розчин візуально перевіряли на наявність помутніння та осаду. Важливо, щоб гель був повністю прозорим і однорідним, що свідчить про повне розчинення агарози.

Після досягнення однорідності розчину до суміші додали 5 мкл броміду етидію. Це інтеркаляційний барвник, який дозволяє візуалізувати нуклеїнові кислоти в ультрафіолетовому світлі.

Оскільки бромід етидію є потенційно мутагенною речовиною, всі маніпуляції з ним проводили в рукавичках і з дотриманням заходів безпеки.

Для створення лунок готували плашки з гребінкою, які поміщали в гель до застигання. Приготований розчин агарози повільно вливали в плашки, уникаючи утворення бульбашок повітря, які могли б вплинути на якість електрофоретичного розділення; після охолодження протягом 10-15 хв гель застигав і набував механічної міцності, необхідної для електрофорезу.

Перед використанням гребінку обережно видаляли, щоб не пошкодити лунки, що утворилися.

Готові гелі переносили в камеру для електрофорезу і заливали об'ємом Tris-буфера, який повністю покривав поверхню гелю і всі лунки для забезпечення належного проходження струму під час електрофорезу.

Кожну лунку заповнювали 6 мкл зразка ДНК і попередньо змішували з 1 мкл барвника (Thermo Scientific™, США) для моніторингу міграції ДНК на гелі.

Одну з лунок заповнювали 6 мкл молекулярних маркерів, які завжди містили фрагменти ДНК відомого розміру, щоб слугувати стандартом для оцінки розміру зразка [62].

Електрофорез проводили при 120 В протягом 20 хв [50].

Під час цього процесу негативно заряджені молекули ДНК рухалися через пористу структуру агарозного гелю до анода, а швидкість руху залежала від розміру фрагментів.

Після завершення електрофорезу гелі аналізували за допомогою транслюмінатора з ультрафіолетовим освітленням. При цьому зразки ДНК, зв'язані з бромистим етидієм, світилися, що дозволяло візуально оцінити їх розмір і концентрацію. Отримані зображення фотографували для подальшого аналізу та документування результатів експерименту.

## РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення

### 3.1 Відбір зразків та підготовка проб

Дослідження проводилося на чотирнадцяти зразках води, відібраних у різних районах Києва. Вибір зразків обумовлений тим, що необхідно було проаналізувати воду з різних джерел з різним ступенем потенційного забруднення антропогенним впливом та вірусними частинками.

На першому етапі зразки пройшли грубу фільтрацію, щоб видалити великі механічні домішки та частково покращити прозорість. Однак навіть після цього етапу зразки стічних вод з Інституту урології ім. Возіанова Національної медичної академії України та Бортницької водоочисної станції залишалися каламутними і мали помітний неприємний запах, що свідчить про високу концентрацію органічних і неорганічних забруднювачів.

Зразок з річки Дніпро був злегка каламутними і рудоватого кольору, що може свідчити про наявність у воді глинистих частинок і сполук заліза. Специфічних запахів не було, що свідчить про відсутність значного забруднення органічними речовинами або стічними водами.

Зразок з озера в парку Нивки мав зеленуватий колір і болотянисий запах. Це може бути пов'язано зі стоячою водою та розкладанням органічних речовин.

Після центрифугування більшість зразків стали набагато прозорішими та світлішими. Це свідчить про те, що завислі частинки ефективно осіли.

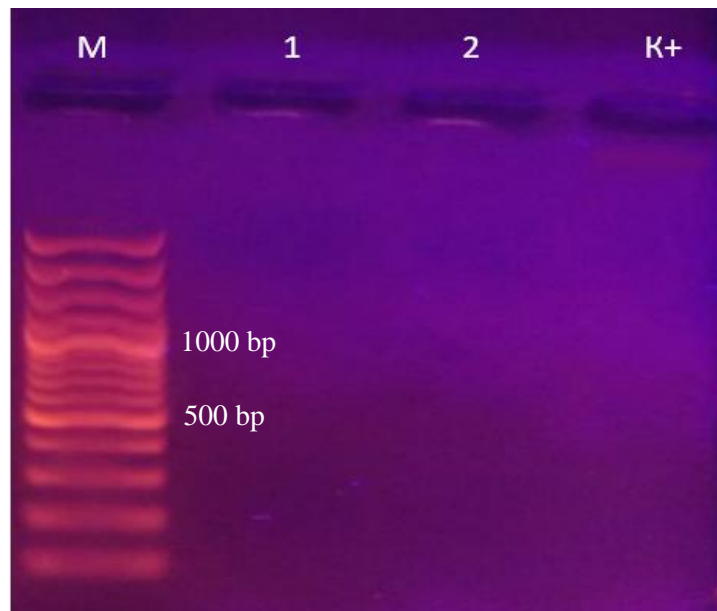
Однак зразки стічних вод з Інституту урології та Бортницьких очисних споруд не повністю усунули неприємний запах.

На наступному етапі дослідження для концентрації вірусу використовували шприцеві фільтри.

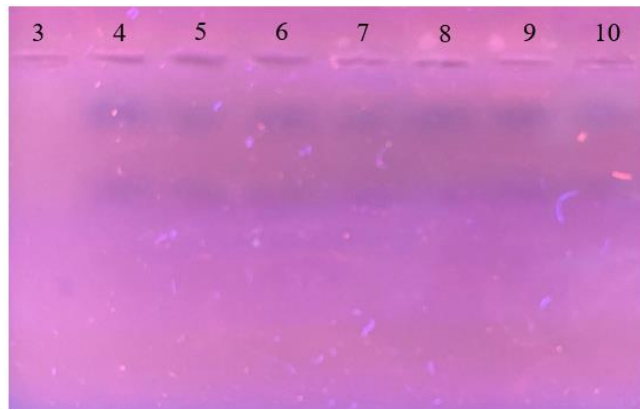
### 3.2 Результати виділення нуклеїнових кислот

Із зразків води відібраних з озера Верховина, річки Дніпро, стічних вод з Інституту урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН України, стічних вод отриманих з Бортницьких водоочисних споруд, озера Андріївське, озера Синє, Китаївських ставків, озера в парку Нивки, водопровідної води отримана зі Святошинського та Голосіївського районів, Русанівського каналу, Голосіївських озер, водойми на острові Муромець, Святошинського озера для детекції вірусів рослин та фагів нуклеїнові кислоти виділяли за допомогою комерційного набору RNeasy Mini Kit (50) (QIAGEN, Німеччина) [55].

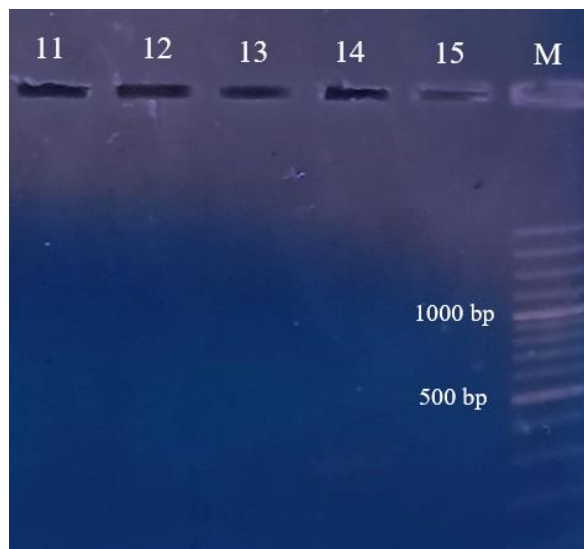
Для оцінки якості та ефективності виділення зразки піддавали електрофорезу в агарозному гелі, щоб візуалізувати наявність нуклеїнових кислот, визначити їх цілісність і можливі домішки.



**Рис. 3.1.** Результат виділення РНК вірусів рослин: 1- зразок води з озера Верховина; 2- зразок води з річки Дніпро; K<sup>+</sup>- позитивний контроль; M- Маркери (100 bp)



**Рис. 3.2.** Результат виділення РНК вірусів рослин: 3- стічні води з інституту урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН України; 4- стічні води з Бортницьких водоочисних споруд; 5- зразок води з озера Андріївське; 6- зразок води з озера Синє; 7- зразок води з Китаївських ставків; 8- зразок води з озера в парку Нивки; 9- водопровідна вода зі Святошинського району; 10-водопровідна вода зі Голосіївського району

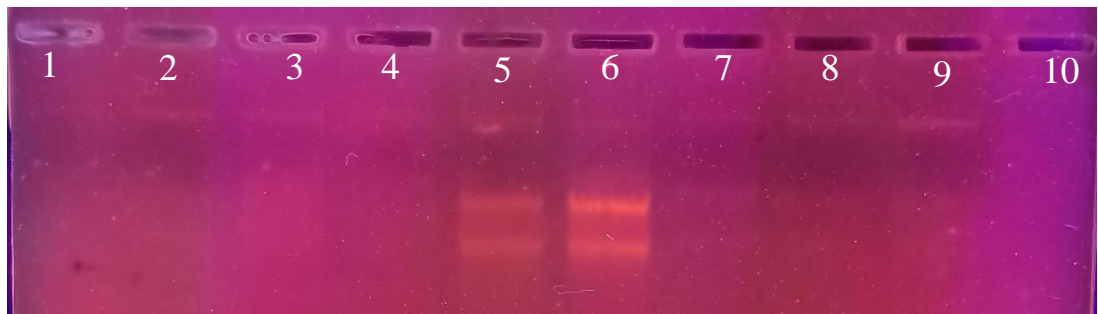


**Рис. 3.3.** Результат виділення РНК вірусів рослин: 11- зразок води з Голосіївських озер; 12- зразок води з Русанівського каналу; 13- зразок води з о.Муромець; 14- зразок води зі Святошинського озера; 15- зразок води з Русанівського каналу концентрований методом ультрацентрифугування;  
М- Маркери (100 bp)

Попри те, що на електрофорезі не помітно виділеної РНК було прийнято рішення продовжувати експеримент, оскільки позитивний

контроль, що точно містив вірус був також ледь помітним. Можна припустити, що відсутність результатів виділення РНК на електрофорезі пов'язана з недостатньою чутливістю цього методу.

Електрофорез із виділеною ДНК CrAssphage показав помітно кращі результати: на гелях чітко спостерігалось виявлення ДНК у більшості проаналізованих зразків. Це вказує на успішне виділення та достатню якість матеріалу, придатну для наступних молекулярно-біологічних досліджень.



**Рис. 3.4.** Результат виділення ДНК CrAssphage: 1- стічні води з інституту урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН України; 2- стічні води з Бортницьких водоочисних споруд; 3- зразок води з озера Андріївське; 4- зразок води з озера Синє; 5- зразок води з Китаївських ставків; 6- зразок води з озера в парку Нивки; 7- зразок води з річки Дніпро; 8- зразок води з озера Верховина; 9- зразок води зі Святошинського озера; 10- зразок води з о.Муромець



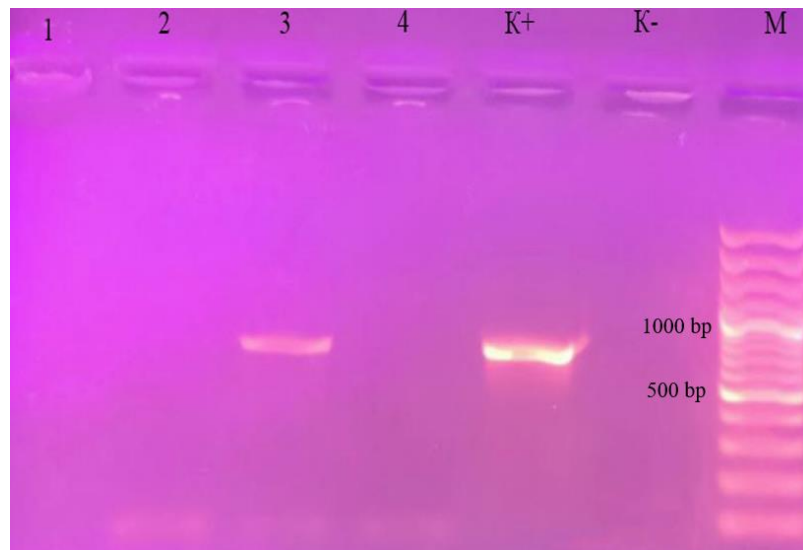
**Рис. 3.5.** Результат виділення ДНК CrAssphage: 11- зразок води з Голосіївських озер; 12-зразок води з Русанівського каналу; 13-- водопровідна вода зі Святошинського району; 14-водопровідна вода зі Голосіївського району

### 3.3 Результати ПЛР

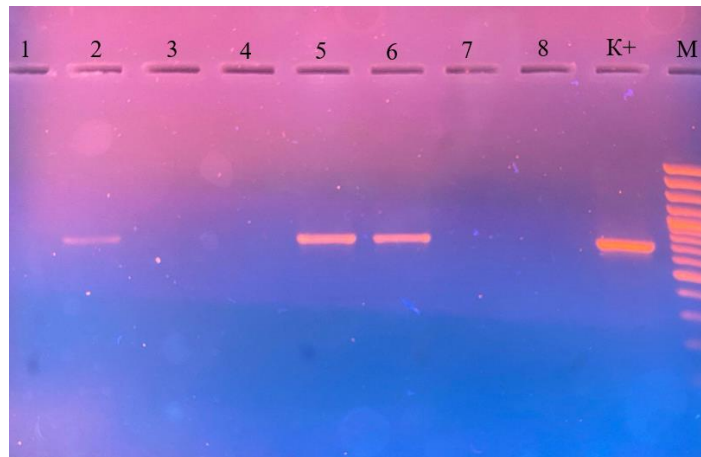
Після етапу виділення РНК вірусів рослин було проведено зворотну транскрипцію з використанням Random Primer Mix з набору M-MuLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs (NEB), США) [54].

Отримана таким чином кДНК дала можливість провести ідентифікацію декількох тобамовірусів PMMoV, ToMV та ToBRFV.

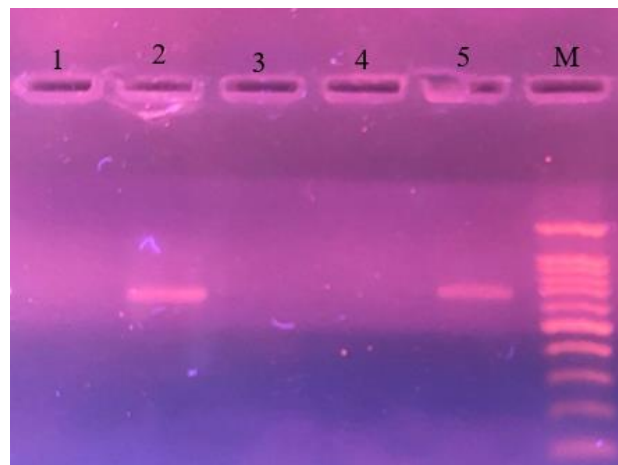
За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів до вірусу м'якої плямистості перцю, вірусу коричневої зморшкуватості плодів томатів та вірусу мозаїки томатів було встановлено наявність ToMV у зразку води відібраної з озера Верховина (рис 3.4), у зразку стічних вод з Бортницьких водоочисних, а також у зразку з озера в парку Нивки та Китаївських ставків (рис 3.5) та в зразку з Русанівського каналу (рис 3.6).



**Рис. 3.6.** Результат ПЛР зразків води: 1- зразок води з озера Верховина з праймерами до PMMoV; 2- зразок води з річки Дніпро з праймерами до PMMoV; 3- зразок води з озера Верховина з праймерами до ToMV; 4- зразок води з річки Дніпро з праймерами до ToMV; K<sup>+</sup>- позитивний контроль; K<sup>-</sup> -негативний контроль; M- Маркери (100 bp)

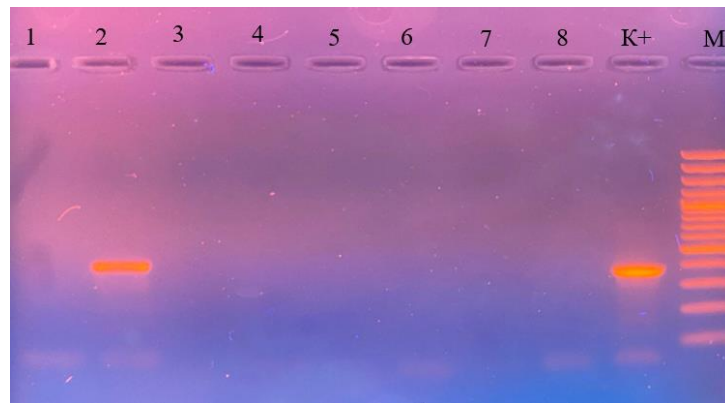


**Рис. 3.7.** Результат ПЛР зразків води з праймерами до ToMV: 1- стічні води з інституту урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН України; 2- стічні води з Бортницьких водоочисних споруд; 3- зразок води з озера Андріївське; 4- зразок води з озера Синє; 5- зразок води з Китаївських ставків; 6- зразок води з озера в парку Нивки; 7- водопровідна вода зі Святошинського району; 8-водопровідна вода зі Голосіївського району; K<sup>+</sup>- позитивний контроль; M- Маркери (100 bp)

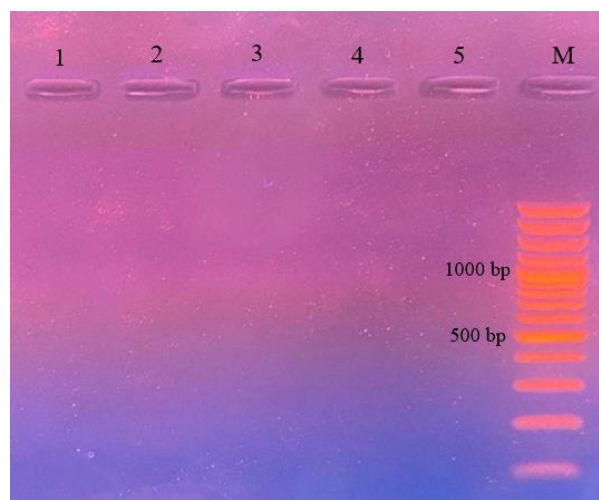


**Рис. 3.8.** Результат ПЛР зразків води з праймерами до ToMV: 1- зразок води з Голосіївських озер; 2- зразок води з Русанівського каналу; 3- зразок води з о.Муромець; 4- зразок води зі Святошинського озера; 5- зразок води з Русанівського каналу концентрований методом ультрацентрифугування; M- Маркери (100 bp)

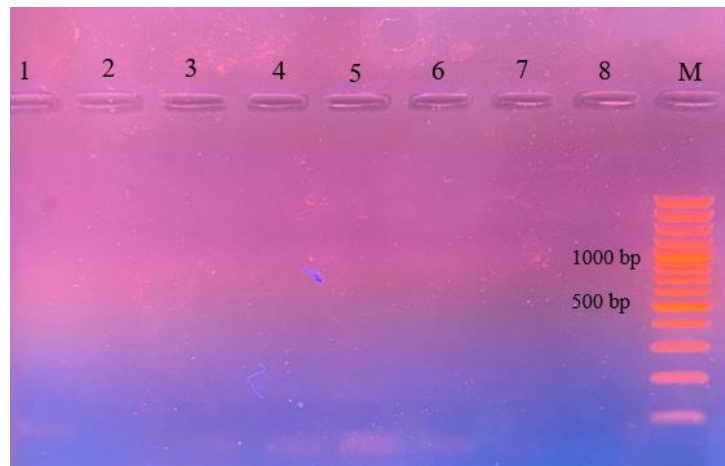
РММoV було ідентифіковано у зразку стічних вод з Бортницьких водоочисних (рис 3.7).



**Рис. 3.9.** Результат ПЛР зразків води з праймерами до РММoV: 1- стічні води з інституту урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН України; 2- стічні води з Бортницьких водоочисних споруд; 3- зразок води з озера Андріївське; 4- зразок води з озера Синє; 5- зразок води з Китаївських ставків; 6- зразок води з озера в парку Нивки; 7- водопровідна вода зі Святошинського району; 8-водопровідна вода зі Голосіївського району; K<sup>+</sup>- позитивний контроль; M- Маркери (100 bp)



**Рис. 3.10.** Результат ПЛР зразків води з праймерами до РММoV: 1- зразок води з Голосіївських озер; 2- зразок води з Русанівського каналу; 3- зразок води з о.Муромець; 4- зразок води зі Святошинського озера; 5- зразок води з Русанівського каналу концентрований методом ультрацентрифування; M- Маркери (100 bp)  
ToBRFV не було знайдено в жодному зі зразків (рис 3.9).



**Рис. 3.11.** Результат ПЛР зразків води з праймерами до ToBRFV: 1- стічні води з інституту урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН України; 2- стічні води з Бортницьких водоочисних споруд; 3- зразок води з озера Андріївське; 4- зразок води з озера Синє; 5- зразок води з Китаївських ставків; 6- зразок води з озера в парку Нивки; 7- водопровідна вода зі Святошинського району; 8- водопровідна вода зі Голосіївського району; М- Маркери (100 bp)

На основі отриманих результатів електрофорезів було створено таблицю для наочності даних (табл 3.1).

**Таблиця 3.1**

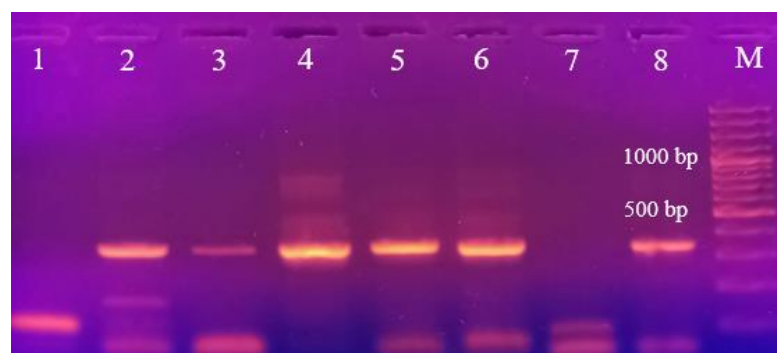
**Результати ідентифікації вірусів рослин**

Місце відбору зразка води	Наявність вірусу в пробі		
	ToMV	PMMoV	ToBRFV
Озеро Верховина	+	-	-
Річка Дніпро	-	-	-
Стічні води з інституту урології	-	-	-
Стічні води з Бортницьких водоочисних	+	+	-
Озеро Андріївське	-	-	-

## Продовження таблиці 3.1

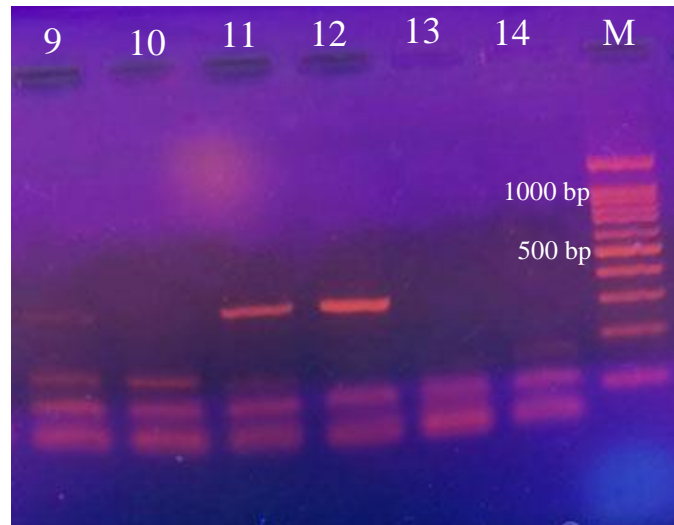
Озеро Синє	-	-	-
Китаївські ставківки	+	-	-
Озеро в парку Нивки	+	-	-
Водопровідна вода зі Святошинського району	-	-	-
Водопровідна вода зі Голосіївського району	-	-	-
Голосіївські озера	-	-	-
Русанівського каналу	+	-	-
Острів Муромець	-	-	-
Святошинського озера	-	-	-

При постановці полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів до CrAssphage було встановлено їх наявність у зразках: з стічних вод з Бортницьких водоочисних споруд, води з озера Андріївське, води з озера Синє, води з Китаївських ставків, води з озера в парку Нивки, води з озера Верховина (рис 3.10), води зі Святошинського озера, води з Голосіївських, води з Русанівського каналу (рис 3.11).



**Рис. 3.12.** Результат ПЛР зразків води з праймерами до CrAssphage: 1- стічні води з інституту урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН; 2- стічні води з Бортницьких водоочисних споруд; 3- зразок води з озера Андріївське; 4- зразок води з озера Синє; 5- зразок води з Китаївських

ставків; 6- зразок води з озера в парку Нивки; 7- зразок води з річки Дніпро; 8- зразок води з озера Верховина; М- Маркери (100 bp)



**Рис. 3.13.** Результат ПЛР зразків води з праймерами до CrAssphage: 9- зразок води зі Святошинського озера; 10- зразок води з о.Муромець; 11- зразок води з Голосіївських озер; 12-зразок води з Русанівського каналу; 13-- водопровідна вода зі Святошинського району; 14-водопровідна вода зі Голосіївського району; М- Маркери (100 bp)

**Таблиця 3.2**

### Результати ідентифікації CrAssphage

Місце відбору зразка води	Наявність CrAssphage в пробі
Озеро Верховина	+
Річка Дніпро	-
Стічні води з інституту урології	-
Стічні води з Бортницьких водоочисних	+
Озеро Андріївське	+
Озеро Синє	+

Продовження таблиці 3.2

Китаївські ставків	+
Озеро в парку Нивки	+
Водопровідна вода з Святошинського району	-
Водопровідна вода з Голосіївського району	-
Голосіївські озера	+
Русанівського каналу	+
Острів Муромець	-
Святошинського озера	+

Для забезпечення надійності та відтворюваності результатів у цьому дослідженні були використані позитивні та негативні контролю, які пройшли той самий процес обробки, що й аналізовані зразки води.

В якості позитивного контролю використовували розчини, що містять вірус мозаїки томатів або вірус м'якої плямистості перцю в концентрації 1 мг/мл.

Наявність цих контрольних зразків дозволила валідацію методів фільтрації, концентрації вірусу, виділення РНК та електрофоретичного аналізу.

Як негативний контроль використовували безнуклеазну воду, що не містить вірусних частинок або нуклеїнових кислот. Це дозволило виключити можливість контамінації та оцінити специфічність використаних реагентів і процедур.

Всі контрольні зразки пройшли ті ж процеси тестування, що і вихідні зразки води, включаючи фільтрацію, центрифугування, концентрацію вірусу, екстракцію РНК та електрофоретичний аналіз.

Це забезпечило об'єктивність експерименту і підтвердило достовірність отриманих результатів.

Як маркер молекулярної маси ДНК використовували Thermo Scientific™ O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. Ці маркери містять фрагменти ДНК відомого розміру і використовуються для точного вимірювання довжини нуклеїнових кислот у зразку під час електрофоретичного аналізу. Використання таких маркерів дозволило чітко ідентифікувати отримані амплікони та оцінити ефективність процедури виділення та ампліфікації вірусної РНК.

Оскільки CrAssphage набули широкого застосування у світовій практиці як класичні індикатори вірусного забруднення води, у цьому дослідженні проведено порівняльний аналіз їхньої появи в парі з вірусами, що вражають рослини. А саме, досліджувалася одночасна присутність CrAssphage, вірусу томатної мозаїки та вірусу м'якої крапчастості перцю у пробах води.

Для наочного представлення результатів було застосовано кольорове кодування (табл.3.2):

- Синім позначено наявність лише CrAssphage та ToMV;

Використання такого підходу дозволяє наочно оцінити рівень вірусного забруднення та визначити потенційні джерела контамінації водного середовища.

Таблиця 3.3

## Співвідношення наявності вірусів рослин та CrAssphage

Місце відбору зразка води	Наявність вірусів в пробі			
	ToBRFV	PMMoV	ToMV	CrAssphage
Озеро Верховина	-	-	+	+
Річка Дніпро	-	-	-	-
Стічні води з інституту урології	-	-	-	-
Стічні води з Бортницьких водоочисних	-	+	+	+
Озеро Андріївське	-	-	-	+
Озеро Синє	-	-	-	+
Китаївські ставків	-	-	+	+
Озеро в парку Нивки	-	-	+	+
Голосіївські озера	-	-	-	+
Русанівського каналу	-	-	+	+
Святошинського озера	-	-	-	+

У подальших дослідженнях доцільно акцентувати увагу на встановленні кореляційних взаємозв'язків між модельними вірусами рослин та бактеріофагом CrAssphage, який вже вважається маркером фекального забруднення водного середовища. Аналіз потенційних залежностей між представленими вірусами може сприяти глибшому розумінню їхньої екологічної стабільності, закономірностей поширення та поведінкових

характеристик у водних екосистемах. Результати таких досліджень можуть стати основою для оптимізації процедур моніторингу вірусного навантаження у воді, що є ключовим у контексті екологічної оцінки стану довкілля та забезпечення безпеки водопостачальних систем.

### **3.4 Кореляція з відомими дослідженнями та моделювання інноваційних підходів до моніторингу якості водних ресурсів**

Якість води є одним з найважливіших факторів, що впливають на здоров'я людей, екосистеми та загальний стан навколишнього середовища. Вода відіграє важливу роль у виживанні всіх живих організмів, а її забруднення може мати серйозні наслідки для довкілля та здоров'я людей. Джерела забруднення можуть бути біологічними (патогени, віруси, бактерії, водорості), хімічними (важкі метали, пестициди, фармацевтичні препарати) та фізичними (тверді частинки, радіоактивні речовини, зміни температури).

Присутність вірусів рослин у воді відома давно, але їх вплив ще недостатньо вивчений. В останні роки вони привертають все більший інтерес до цього питання, оскільки можуть слугувати маркерами фекального забруднення.

Крім того, віруси рослин зберігаються у водному середовищі і тому можуть бути використані для оцінки ефективності систем очищення води. Дослідження поширеності рослинних вірусів у воді є важливим для розуміння шляхів їх розповсюдження, механізмів виживання та потенційного впливу на здоров'я людини і навколишнє середовище; молекулярно-біологічні методи, такі як ПЛР, можуть бути використані для ідентифікації вірусів у водоймах з високою точністю.

Згідно з деякими дослідженнями, найпоширеніші віруси рослин, що Зродів, з яких рід *Tobamovirus* викликає особливий інтерес завдяки своїй широкій екологічній гнучкості та високій стійкості до умов навколишнього середовища. Тобамовіруси можуть передаватися через людські фекалії та

воду, забруднену сільськогосподарськими стоками, що вказує на їх потенціал як маркерів фекального забруднення.

Рід *Tobamovirus* включає 37 видів, більшість з яких інфікують рослини з родин *Solanaceae* (пасльонові) та *Cucurbitaceae* (гарбузові). Оскільки деякі з цих рослин є важливими сільськогосподарськими культурами, забруднення води вірусом може мати значний вплив на сільськогосподарський сектор і спричинити економічні збитки [63].

Найпоширенішими вірусами, пов'язаними з тобамовірусами, є вірус м'якої плямистості перцю та вірус мозаїки томатів. Вони були виявлені в декількох водоймах по всьому світу, що підтверджує їх глобальну циркуляцію. Крім того, вірусу бурої зморшкватості плодів томатів також важливий і активно вивчається як потенційний біологічний індикатор забруднення води, поширеність *ToBRFV* може свідчити про наявність значних рівнів органічного забруднення, пов'язаного з діяльністю людини.

### 3.4.1 РММоV для моніторингу якості водних ресурсів

Дійсно, РММоV виявляється поширенішим у зразках води в світі, ніж інші віруси, які з часом були запропоновані як потенційні вірусні індикатори забруднення фекаліями людини в зразках навколишнього середовища. Ці дані знайшли своє підтвердження і в рамках нашого дослідження: вірус м'якої плямистості перцю був ідентифікований у зразку стічних вод, що, цілком вірогідно, пояснюється його значною концентрацією у фекаліях, які містять частки інфікованих рослин або ж продуктів їх обробки.

Цей вірус виділяється з фекаліями здорового населення у високих концентраціях, а його присутність у воді пов'язана з харчовими звичками (споживанням перцю та продуктів переробки, таких як гострий соус і каррі) і не залежить від інфікування людини, оскільки не повідомлялося, що РММоV реплікується в кишечнику людини [64]. Наші результати також корелюються з наведеними спостереженнями: виявлення РММоV у стічних

водах підтверджує його екскрецію, не залежну від інфекційного процесу, що додатково підкреслює його харчове походження та не залежить реплікації в людському організмі.

Вперше РММoV був ідентифікований у 2009 році у неочищених та очищених стічних водах з концентрацією до  $10^7$  та  $10^6$  копій генома/мл відповідно. Крім того, повідомлялося про широку дифузю, оскільки РММoV було виявлено в неочищених стічних водах з Африки, Азії, Австралії, Америки та Європи [65].

Для вивчення поширеності та вірусного навантаження РММoV у водних середовищах були досліджені різні водні матриці, включаючи неочищені та очищені стічні води, річкові води, естуарії та прибережні води (тобто води, що не використовуються та використовується для купання), підземні води та питну воду.

В одному з досліджень РММoV було виявлено у 79,3% зразків неочищених стічних вод, відібраних в Італії між 2017 і 2019 роками, що відповідає аналогічним дослідженням з інших країн, в яких повідомлялося про наявність РММoV у стічних водах від 57% до 100%. Вірусне навантаження у стічних водах Італії було значним - від  $1,5 \times 10^5$  до  $2,1 \times 10^7$  копій генома/л, що відповідає аналогічним дослідженням у США ( $3,7$ - $4,4 \times 10^6$  г.к./л;) та В'єтнамі ( $5,5$ - $7,2 \times 10^6$  г.к./л), але нижче, ніж у Німеччині ( $3,9 \times 10^4$  до  $3,3 \times 10^8$  к.к. /л), Болівії ( $1 \times 10^9$  г.к./л), Австралії ( $5,7 \times 10^7$  г.к./л) та інших [66, 67, 68].

Лише в кількох дослідженнях вивчалася поширеність і концентрація РММoV у річкових водах. У дослідженні, що проводилося в Італії 75,0% річкових зразків були позитивними на РММoV; концентрація вірусу, однак, була загалом низькою (середнє значення  $6,1 \times 10^2$  г.к./л, діапазон від  $1,4 \times 10^1$  до  $1,5 \times 10^4$  г.к./л) [69].

Що стосується інших водних матриць, то різні методології, використані в дослідженнях, можуть пояснювати варіабельність, хоча також різна кількість рослин, що містять РММoV в річковому басейні, може сприяти

такому розмаїттю. Що стосується морських вод, РММoV було виявлено лише в 25% прибережних вод, що використовуються для купання, і в низьких концентраціях.

Тобто вміст вірусу має наступну закономірність: очищені стічні води (75,0%;  $2,9 \times 10^5$ ) > річкові води (75,0%;  $6,1 \times 10^2$ ) > естуарні води (66,6%;  $4,8 \times 10^2$ ) > прибережні води (25,0%;  $8,5 \times 10^1$ ) > підземні води (13,4%;  $5,9 \times 10^1$ ) > питні води (не виявлено), що свідчить про зменшення градієнта від забруднених до чистих вод та репрезентативність РММoV для мікробіологічного стану водного середовища.

Також у дослідженнях РММoV у водах не виявлено сезонності, що узгоджується з попередніми дослідженнями, які також не виявили значної сезонної тенденції в різних географічних регіонах [70].

Як зазначається РММoV має харчове походження і не пов'язаний з інфікуванням людини, його присутність і концентрація у водному середовищі корелює з екскрецією фекалій, але навряд чи залежить від сезонних або екологічних умов, що впливають на інфікування людини вірусними патогенами.

Що стосується досліджень асоціації РММoV і фекальних індикаторних бактерій (кишкова паличка і кишкові ентерококи), за винятком питної води, в якій не було виявлено жодного з цих мікроорганізмів: концентрації РММoV не корелювали з кількістю кишкових інфекцій у зразках морської води, відібраних з різних місць у США, а також з кількістю кишкових паличок у карстових водоносних системах у Мексиці, і лише слабка або кореляція була виявлена з кількістю кишкових паличок та кишкових інфекцій в озерних водах, що зазнали перенаселення в Австралії.

З іншого боку, помірна кореляція між фекальними індикаторними бактеріями та РММoV була виявлена в прісноводних середовищах Сінгапуру.

Ці результати можна пояснити різною поведінкою та стійкістю бактеріальних і вірусних мікроорганізмів (як патогенів, так і індикаторів) у водному середовищі [71, 72, 73, 74].

Таким чином є вже чимало досліджень, що демонструють наявність РММoV у водному середовищі, показавши, що він є повсюдним протягом усього водного циклу, з концентраціями, що варіюють залежно від різних типів води. Отримані дані дослідження цілком корелюють зі світовими трендами, чітко показуючи присутність РММoV у зразках місцевих стоків, що додає вагомості ідеї застосування цього вірусу як перспективного показника фекального забруднення. Однак, у рамках проведеного нами дослідження, РММoV не можна вважати дієвим вірусним індикатором для відстеження стану поверхневих вод у Києві. Його знайдено лише в пробах стічних вод, а у пробах води з річок та озер вірус не зареєстровано. Це вказує на його неповну репрезентативність у контексті оцінки якості поверхневих водойм саме в цій місцевості. Існує ймовірність, що така вибірковість обумовлена як особливостями місцевого харчування, так і екологічними чинниками у межах водозбірного басейну.

### **3.4.2 ToMV для моніторингу якості водних ресурсів**

В свою чергу ToMV має не меншу популярність. Відомо, що тобамовіруси, такі як вірус мозаїки томатів є надзвичайно стабільними та широко поширеними РНК-вірусами, які інфікують багато різних видів рослин.

Інфекційний ToMV був виділений із вод, що дренують лісові насадження в Хорватії, у Німеччині, у Північному Рейні-Вестфалії, у центральному Нью-Йорку та в районі високих вершин гір Адірондак.

Інфекційні віріони ToMV були виявлені навіть у хмарах і тумані. РНК ToMV була виявлена у льодовику віком від <500 до приблизно 140 000 років із місць буріння в Гренландії, яка може бути абіотичним резервуаром.

Оскільки багато європейських лісів розташовані на території, яка колись була сільськогосподарською, віруси, виявлені в лісових деревах, ґрунті та воді, могли походити від заражених рослинних залишків. Віруси, виділені в лісових екосистемах без попередньої історії сільського господарства, можуть бути місцевими або занесеними іншим механізмом [72].

Запропоновано декілька можливих шляхів розповсюдження ToMV, таких як розповсюдження в хмарах із сільськогосподарських районів у гірські ліси та з лісової екосистеми через воду назад у сільськогосподарські райони. Тому виявлення ToMV у зразках води не було несподіваним.

Наприклад в одному з досліджень ToMV було виявлено у семи з дев'яти зразків води різного походження, зібраних по всій Словенії. Зразки були взяті з різних джерел по всій країні: один із зрошувальної води в теплиці, зараженій ToMV, один із зразка води з гравійної ями та п'ять із річок. В іншому віромному аналізі джерел зрошувальної води вірус мозаїки томатів було виявлено в 14 із 22 проб [75, 3].

Отримані нами дані підтверджують, що вірус ToMV широко розповсюджений у водному середовищі. Зокрема, ToMV виявлено у пробах води з озера Верховина, з Бортницької станції очищення стічних вод, а також з озера в парку Нивки, з Китаївських ставків та з Русанівського каналу. З огляду на те, що вірус мозаїки томатів здатний заражати багато видів рослин, серед яких і культурні, і дикорослі, можна припустити, що частіше виявлення вірусу в аналізованих зразках може бути зумовлено більшим спектром хазяїв.

Не менш значущим фактором є велике виробництво томатів в Україні, де водні ресурси активно залучаються для зрошення. Крім того, необхідно підкреслити високий рівень споживання томатів та продуктів з них в Україні, що передбачає потенційну можливість потрапляння вірусу в стічні води через рослинні залишки.

На основі цього даний вірус найкраще підходить, щоб бути використаним в схемах діагностики якості води.

### 3.4.3 ToBRFV для моніторингу якості водних ресурсів

Вірус бурї зморшкуватості плодів томатів в також все частіше виявляють у різних джерелах води, включаючи неочищені стічні води, води річок, ставків та зрошувальну воду. Його присутність у стічних водах є особливо важливою, оскільки це свідчить про те, що вірус виділяється через людську діяльність, ймовірно, внаслідок споживання заражених томатів та продуктів на основі томатів.

На даний момент цей вірус виявлений у Мексиці, США, Китаї, Ірані, Ізраїлі, Йорданії, Саудівській Аравії, Сирії, Узбекистані, Австрії, Бельгії, Кіпрі, Чехії, Естонії, Німеччині, Греції, Угорщині, Італії, Мальті, Нідерландах, Норвегії, Польщі, Словенії, Іспанії, Швейцарії та Туреччині. Крім того, окремі вогнища ToBRFV виявлені у Франції, Португалії та Великій Британії [76].

Кілька досліджень підтвердили, що РНК ToBRFV присутня у стічних водах, які потрапляють на очисні споруди, часто у високих концентраціях.

У Словенії дослідники виявили РНК ToBRFV у зразках стічних вод ще у 2017 році, до того, як було офіційно повідомлено про інфіковані рослини томатів у сільськогосподарських умовах. Це свідчить про те, що моніторинг стічних вод може слугувати інструментом раннього виявлення нових рослинних вірусів.

Аналогічним чином у США довгострокове дослідження, проведене в Луїзіані, показало, що ToBRFV постійно присутній у неочищених стічних водах з частотою виявлення до 77%. Вірусне навантаження у стічних водах зазвичай коливалося від 3,5 до 6,1  $\log_{10}$  копій на літр, що свідчить про те, що вірус потрапляє в систему стічних вод у значних кількостях.

ToBRFV також був виявлений у поверхневих водах, включаючи річки та ставки, що використовуються для зрошення. Це викликає занепокоєння щодо потенційних шляхів передачі, коли скидання стічних вод або

сільськогосподарські стоки можуть сприяти поширенню вірусу на сільськогосподарські культури. На відміну від деяких рослинних вірусів, які швидко деградують поза організмом хазяїна, ToBRFV виявляється дуже стійким у водному середовищі, що дозволяє йому зберігатися і циркулювати в екосистемах поза прямим сільськогосподарським забрудненням [77, 78].

Сезонність ToBRFV у стічних водах є важливим фактором для розуміння його стійкості та потенційної ролі як екологічного індикатора. Хоча деякі вірусні патогени, такі як кишкові віруси людини, демонструють сильні сезонні тенденції, зумовлені коливаннями в захворюваності людей та умовами навколишнього середовища, дослідження показують, що ToBRFV залишається відносно стабільним у стічних водах протягом року.

Дослідження, в якому проводився моніторинг зразків стічних вод на наявність ToBRFV протягом 13 місяців, показало, що вірус постійно виявлявся протягом усіх сезонів. Вірус продемонстрував відносно незначні місячні варіації концентрацій копій гена в діапазоні від  $1,86 \times 10^8$  до  $7,21 \times 10^8$  г/л. Коефіцієнт варіації для ToBRFV становив 61,8%, що вказує на невеликі коливання концентрацій. Максимальна концентрація ToBRFV була зафіксована в листопаді 2021 та 2022 років, що характеризувалося зниженням температури та мінімумом опадів. Ця сезонна тенденція може бути пов'язана зі збільшенням споживання томатів у холодні місяці, оскільки споживається більше перероблених томатних продуктів, таких як консервовані томатні соуси та супи [79].

Виявлення ToBRFV у стічних водах призвело до зростання інтересу до його потенційного використання як вірусного індикатора для моніторингу ефективності очищення стічних вод і забруднення навколишнього середовища. Хороший вірусний індикатор повинен бути присутнім у стічних водах у великій кількості та бути легким для виявлення, стійким до деградації в навколишньому середовищі, щоб його можна було відстежувати в процесі очищення, постійно присутнім у різні періоди часу та в різних місцях.

ToBRFV відповідає цим критеріям завдяки своїй високій стабільності чисельності та цілорічному виявленню. Насправді ToBRFV часто виявляється у стічних водах у вищих концентраціях, ніж інші широко використовувані вірусні індикатори, такі як вірус м'якої крапчастості перцю, який широко використовується для відстеження забруднення фекаліями людини.

Крім того, нещодавні дослідження показали, що ген білка руху ToBRFV може слугувати маркером для відстеження мікробного джерела, зокрема, фекального забруднення людини. Присутність вірусу в системах стічних вод у різних географічних регіонах посилює його потенціал як нового вірусного індикатора як сільськогосподарського, так і антропогенного забруднення води [80].

Оскільки ToBRFV з'являється у стічних водах до виявлення спалахів у сільському господарстві, його можна використовувати як систему раннього попередження для нагляду за вірусами рослин.

Можливість відстеження ToBRFV в річках і зрошувальній воді підкреслює необхідність подальших досліджень його ролі в передачі вірусу водним шляхом.

Розуміння того, як ToBRFV поводить себе під час різних процесів очищення стічних вод, допоможе оцінити його надійність як показника ефективності очищення.

Наявність ToBRFV у стічних водах, його мінімальна сезонна мінливість, а також висока стабільність і чисельність роблять його перспективним вірусним індикатором для екологічного та сільськогосподарського нагляду. Проте в нашому дослідженні його не було виявлено в жодному з досліджених зразків води. Це може бути пов'язано з тим, що вірус з'явився відносно недавно і ще не набув значного поширення в Україні. Оскільки вірус був вперше виявлений лише кілька років тому, його циркуляція у водній екосистемі, можливо, ще не досягла значного рівня, що призвело до того, що його генетичний матеріал не був виявлений

у досліджуваних зразках. Тому на даний момент він не підходить на роль індикатора якості води в Києві. Однак, зважаючи на його високу інфекційність та здатність швидко поширюватися через інфіковані рослини, необхідний подальший моніторинг для оцінки потенційного ризику його поширення у водних системах у майбутньому.

Результати вищезазначених досліджень узгоджуються з багатьма науковими звітами, що підкреслюють широке розповсюдження та передачу тобамовірусів водним шляхом. Зокрема, багато досліджень підтвердили, що віруси роду *Tobamovirus* можуть тривалий час зберігатися у водному середовищі, що дозволяє їм легко поширюватися на великі відстані і заражати нові рослини-господарі.

Розуміння поширеності та розповсюдження водних тобамовірусів має важливе значення для моніторингу якості води, оскільки тобамовіруси є біологічними індикаторами забруднення водних екосистем.

Циркуляція тобамовірусів у водних системах, таких як поверхневі води, зрошувальні канали та стічні води, може вказувати на наявність забруднювачів антропогенного або природного походження. Виявлення цих вірусів у водному середовищі підкреслює необхідність ефективного моніторингу водних ресурсів для оцінки ризиків, пов'язаних з поширенням патогенів.

Тобамовіруси є важливими об'єктами дослідження в екологічному моніторингу через їхню тривалу персистенцію у воді та здатність переноситися на великі відстані. Їх стійкість до різних умов навколишнього середовища і здатність інфікувати різні види рослин вимагають комплексного підходу до вивчення механізмів їх поширення у воді. Враховуючи серйозність проблеми, подальші дослідницькі зусилля повинні бути спрямовані на розробку методів виявлення тобамовірусів у зразках води.

Необхідно розробити чутливі та специфічні тести, здатні виявляти навіть низькі концентрації вірусу в різних водних екосистемах. Дослідження

динаміки інфекції та факторів навколишнього середовища, що впливають на виживання вірусу у воді, є важливими для оцінки ризику подальшого поширення. Крім того, необхідно розробити ефективні стратегії очищення води від вірусних забруднень. Сучасні методи, такі як фільтрація, ультрафіолетове опромінення, хімічна дезінфекція та передові процеси окислення, можуть стати важливими інструментами в боротьбі з вірусним забрудненням водних ресурсів. Застосування цих технологій може знизити ризик поширення вірусних патогенів водним шляхом і забезпечити безпеку водних ресурсів сільськогосподарського та екологічного призначення.

Отже, всебічний моніторинг тобамовірусів у водних екосистемах та впровадження ефективних методів лікування відіграватиме важливу роль у запобіганні поширенню вірусу через воду. Розуміння ролі цих вірусів як потенційних індикаторів забруднення води не тільки покращить управління якістю води, але й допоможе розробити стратегії підтримки екологічного балансу та захисту сільськогосподарського виробництва від вірусних загроз.

## ВИСНОВКИ

1. З метою ідентифікації вірусів поліфагів проведено дослідження проб води з різних водойм міста Києва, а саме з озера Верховина, річки Дніпро, стічні води з Інституту урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН України, стічні води, отримані з Бортницьких водоочисних споруд, озера Андріївське, озера Синє, Китаївських ставків, озера в парку Нивки, водопровідна вода отримана зі Святошинського та Голосіївського районів, Русанівського каналу, Голосіївських озер, водойми на острові Муромець, Святошинського озера.
2. Для концентрування вірусу зі зразків води було використано два методи. Фільтрування за допомогою шприцевого фільтра для видалення вірусів та ультрацентрифугування. Обидва методи збагачення вірусів виявилися ефективними для виділення вірусного матеріалу із зразків води для подальшого аналізу.
3. Методом ЗТ-ПЛР було встановлено наявність вірусу мозаїки томатів в зразку води з озера Верховина, у зразку стічних вод з Бортницьких водоочисних, а також у зразку з озера в парку Нивки та Китаївських ставків та в зразку з Русанівського каналу. Отриманий продукт ампліфікації становив 700 бр. Вірус м'якої плямистості перцю було ідентифіковано у зразку стічних вод з Бортницьких водоочисних споруд. Отриманий продукт ампліфікації становив 387 бр.
4. Як класичні вірусні індикатори якості води, методом ПЛР були діагностовані CrAssphage. Показана їх наявність практично у всіх зразках.
5. Показано перспективність застосування одного з трьох досліджених вірусів, а саме вірусу мозаїки томатів, для створення схем діагностики якості води на території України.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Nat Rev Microbiol (2011) ‘Microbiology by numbers’, *Nature Reviews Microbiology*, 9, p. 628. doi:10.1038/nrmicro2644.
2. Koopmans, M. and Duizer, E. (2004) ‘Foodborne viruses: an emerging problem’, *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), pp. 23–41. doi:10.1016/s0168-1605(03)00169-7.
3. Maksimović, O., Bačnik, K., Selda Rivarez, M.P., Vučurović, A., Mehle, N., Ravnikar, M., Gutiérrez-Aguirre, I. and Kutnjak, D. (2024) ‘Virome analysis of irrigation water sources provides extensive insights into the diversity and distribution of plant viruses in agroecosystems’, *Water Research*, 249, p. 120712. doi:10.1016/j.watres.2023.120712.
4. Lewandowski, D.J. (2008) ‘Tobamovirus’, in Mahy, B.W.J. and Van Regenmortel, M.H.V. (eds.) *Encyclopedia of Virology*. 3rd edn. Academic Press, pp. 68–72. doi:10.1016/B978-012374410-4.00514-8.
5. Ochar, K., Ko, H.-C., Woo, H.-J., Hahn, B.-S. and Hur, O. (2023) ‘Pepper Mild Mottle Virus: An Infectious Pathogen in Pepper Production and a Potential Indicator of Domestic Water Quality’, *Viruses*, 15(2), p. 282. doi:10.3390/v15020282.
6. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2019) *Virus Taxonomy: 2018b Release*. Available at: <https://ictv.global/taxonomy> (Accessed: 18 March 2019).
7. Gaur, R. (2018) *Plant Viruses: Diversity, Interaction and Management*. Boca Raton: CRC Press.
8. Dolja, V. V., Krupovic, M., & Koonin, E. V. (2020). Deep roots and splendid boughs of the global plant virome. *Annual Review of Phytopathology*, 58, 23–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-030320-095423>
9. Hull, R. (2014) ‘Origins and Evolution of Plant Viruses’, in Hull, R. (ed.) *Plant Virology*. 5th edn. Academic Press, pp. 423–476. doi:10.1016/B978-0-12-384871-0.00008-X.

10. Li, E., Saleem, F., Edge, T.A. and Schellhorn, H.E. (2021) 'Biological Indicators for Fecal Pollution Detection and Source Tracking: A Review', *Processes*, 9(11), p. 2058. doi:10.3390/pr9112058.
11. Sabar, M.A., Honda, R. and Haramoto, E. (2022) 'CrAssphage as an indicator of human-fecal contamination in water environment and virus reduction in wastewater treatment', *Water Research*, 221, p. 118827. doi:10.1016/j.watres.2022.118827.
12. Thebo, A.L., Drechsel, P. and Lambin, E.F. (2017) 'A global, spatially-explicit assessment of irrigated croplands influenced by urban wastewater flows', *Environmental Research Letters*, 12, 074008. doi:10.1088/1748-9326/aa75d1.
13. Bačnik, K., Kutnjak, D., Pecman, A., Mehle, N., Tušek Žnidarič, M. et al. (2020) 'Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment', *Water Research*, 177, 115628. doi:10.1016/j.watres.2020.115628.
14. Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B.W. and Turina, M. (2016) 'A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan', *Archives of Virology*, 161, pp. 503–506. doi:10.1007/s00705-015-2677-7.
15. Dombrovsky, A., Tran-Nguyen, L.T.T. and Jones, R.A.C. (2017) 'Cucumber green mottle mosaic virus: rapidly increasing global distribution, etiology, epidemiology, and management', *Annual Review of Phytopathology*, 55, pp. 231–256. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035349.
16. Hamza, I.A., Jurzik, L., Überla, K. and Wilhelm, M. (2011) 'Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water', *Water Research*, 45, pp. 1358–1368. doi:10.1016/j.watres.2010.10.039.
17. Colson, P., Richet, H., Desnues, C., Balique, F., Moal, V., Grob, J.J., Berbis, P., Fournier, P.E., Raoult, D. (2010) 'Pepper mild mottle virus, a plant virus associated with specific immune responses, fever, abdominal pains, and

- pruritus in humans', *PLoS ONE*, 5(4), e10041. doi:10.1371/journal.pone.0010041.
18. Kitajima, M., Sassi, H.P. and Torrey, J.R. (2018) 'Pepper mild mottle virus as a water quality indicator', *npj Clean Water*, 1, 19. doi:10.1038/s41545-018-0019-5.
19. Rosario, K., Symonds, E.M., Sinigalliano, C., Stewart, J. and Breitbart, M. (2009) 'Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution', *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp. 7261–7267. doi:10.1128/AEM.00410-09.
20. Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J.Q., Wei, C.L., Soh, S.W.L., Hibberd, M.L., Liu, E.T. and Rohwer, F. (2006) 'RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses', *PLoS Biology*, 4(1), pp. 0108–0118. doi:10.1371/journal.pbio.0040003.
21. Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ito, T. and Ohgaki, S. (2013) 'Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan', *Applied and Environmental Microbiology*, 79, pp. 7413–7418. doi:10.1128/AEM.02354-13.
22. Kuroda, K., Nakada, N., Hanamoto, S., Inaba, M., Katayama, H., Do, T.A. and Tanaka, H. (2015) 'Pepper mild mottle virus as an indicator and a tracer of fecal pollution in water environments: Comparative evaluation with wastewater-tracer pharmaceuticals in Hanoi, Vietnam', *Science of the Total Environment*, 506–507, pp. 287–298. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.11.020.
23. Rachmadi, A.T., Torrey, J.R. and Kitajima, M. (2016) 'Human polyomavirus: advantages and limitations as a human-specific viral marker in aquatic environments', *Water Research*, 105, pp. 456–469. doi:10.1016/j.watres.2016.09.009.
24. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Murai, K. (2017) 'Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for

- those viruses', *Water Research*, 115, pp. 29–39. doi:10.1016/j.watres.2017.02.060.
25. Michen, B. and Graule, T. (2010) 'Isoelectric points of viruses', *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), pp. 388–397. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x.
26. Kuroda, K. et al. (2015) 'Pepper mild mottle virus as an indicator and a tracer of fecal pollution in water environments: Comparative evaluation with wastewater-tracer pharmaceuticals in Hanoi, Vietnam', *Science of the Total Environment*, 506–507, pp. 287–298. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.11.020.
27. Çağlar, B.K., Fidan, H. and Elbeaino, T. (2013) 'Detection and molecular characterization of pepper mild mottle virus from Turkey', *Journal of Phytopathology*, 161(6), pp. 434–438. doi:10.1111/jph.12100.
28. Peng, J., Shi, B., Zheng, H., Lu, Y., Lin, L., Jiang, T., Chen, J. and Yan, F. (2015) 'Detection of pepper mild mottle virus in pepper sauce in China', *Archives of Virology*, 160(8), pp. 2079–2082. doi:10.1007/s00705-015-2450-4.
29. Verbyla, M.E. et al. (2016) 'Managing microbial risks from indirect wastewater reuse for irrigation in urbanizing watersheds', *Environmental Science & Technology*, 50(13), pp. 6803–6813. doi:10.1021/acs.est.6b01219.
30. Sangsanont, J., Dan, D.T., Thi Viet Nga, T., Katayama, H. and Furumai, H. (2016) 'Detection of pepper mild mottle virus as an indicator for drinking water quality in Hanoi, Vietnam, in large volume of water after household treatment', *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 51(13), pp. 1100–1106. doi:10.1080/10934529.2016.1195324.
31. Sassi, H.P., Tuttle, K.D., Betancourt, W.Q., Kitajima, M. and Gerba, C.P. (2018) 'Persistence of viruses by qPCR downstream of three effluent-dominated rivers in the western United States', *Food and Environmental Virology*. doi:10.1007/s12560-018-9343-7.
32. Gu, X., Tay, Q.X.M., Te, S.H., Saeidi, N., Goh, S.G., Kushmaro, A., Thompson, J.R. and Gin, K.Y.-H. (2018) 'Geospatial distribution of viromes

- in tropical freshwater ecosystems’, *Water Research*, 137, pp. 220–232. doi:10.1016/j.watres.2018.03.015.
33. Tandukar, S. et al. (2018) ‘Presence of human enteric viruses, protozoa, and indicators of pathogens in the Bagmati River, Nepal’, *Pathogens*, 7(2), 38. doi:10.3390/pathogens7020038.
34. Hruby, C.E. et al. (2013) 2013 Survey of Iowa groundwater and Evaluation of Public Well Vulnerability Classifications for Contaminants of Emerging Concern, Iowa Geological and Water Survey, Technical Information Series 57.
35. McGinnis, S. et al. (2018) ‘Human Bacteroides and total coliforms as indicators of recent combined sewer overflows and rain events in urban creeks’, *Science of the Total Environment*, 630, pp. 967–976. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.02.259.
36. Kato, R., Asami, T., Utagawa, E., Furumai, H. and Katayama, H. (2018) ‘Pepper mild mottle virus as a process indicator at drinking water treatment plants employing coagulation sedimentation, rapid sand filtration, ozonation, and biological activated carbon treatments in Japan’, *Water Research*, 132, pp. 61–70. doi:10.1016/j.watres.2017.12.066.
37. Asami, T., Katayama, H., Torrey, J.R., Visvanathan, C. and Furumai, H. (2016) ‘Evaluation of virus removal efficiency of coagulation-sedimentation and rapid sand filtration processes in a drinking water treatment plant in Bangkok, Thailand’, *Water Research*, 101, pp. 84–94. doi:10.1016/j.watres.2016.05.001.
38. Озеро Верховина (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/csnfic> [Accessed 5 Mar. 2025].
39. Центральний пляж (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/spoxgb> [Accessed 5 Mar. 2025].
40. Інститут урології імені академіка О.Ф. Возіанова НАМН України (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/mflzaa> [Accessed 5 Mar. 2025].

- 41.Бортницькі водоочисні споруди (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/mzhfir> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 42.Озеро Андріївське (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.lu/vbkmvz> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 43.Озеро Синє (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/nxunmi> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 44.Китаївські ставки (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.cc/aeprv> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 45.Озеро в парку Нивки (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.gd/xmkoat> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 46.Святошинський район (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/jradsu> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 47.ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/lbcazs> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 48.Русанівський канал (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/hdoувр> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 49.Голосіївські ставки (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/ruzndi> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 50.Муромець (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/уркprt> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 51.Святошинське озеро (n.d.) Google Maps [online]. Available at: <https://surl.li/cwphxy> [Accessed 5 Mar. 2025].
- 52.Міністерство охорони здоров'я України (2007) Наказ № 284: Про затвердження методичних вказівок «Санітарно-вірусологічний контроль водних об'єктів» [Електронний ресурс]. Доступно за: [https://zakononline.com.ua/documents/show/73927\\_\\_73927](https://zakononline.com.ua/documents/show/73927__73927) [Дата звернення: 15 квітня 2025].
- 53.Prado, T., Gaspar, A.M.C. and Miagostovich, M.P. (2014) Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods.

- Brazilian Journal of Microbiology, 45, pp.343–349. doi:10.1590/S1517-83822014000100049.
54. Corpuz, M.V.A. et al. (2020) Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Science of the Total Environment*, 745, 140910. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140910.
55. QIAGEN (2021) RNeasy® Mini Kit Quick-Start Protocol [Електронний ресурс]. Доступно за: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-kits?catno=74104> [Дата звернення: 1 березня 2025].
56. New England Biolabs (n.d.) M-MuLV Reverse Transcriptase [Електронний ресурс]. Доступно за: <https://www.neb.com/en/products/m0253-m-mulv-reverse-transcriptase#Protocols--Manuals---Usage> [Дата звернення: 1 березня 2025].
57. New England Biolabs (2012) Protocol for OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (M0482) [Електронний ресурс]. Доступно за: <https://www.neb.com/en/protocols/2012/09/06/protocol-for-onetaq-2x-master-mix-with-standard-buffer-m0482> [Дата звернення: 1 березня 2025].
58. Jarret, R.L. et al. (2008) The Occurrence and Control of Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) in the USDA/ARS Capsicum Germplasm Collection. *Seed Technology*, 30(1), pp.26–36. Доступно за: <http://www.jstor.org/stable/23433368> [Дата звернення: 26 квітня 2024].
59. Letschert, B. et al. (2002) Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *Journal of Virological Methods*, 106(1), pp.1–10. doi:10.1016/s0166-0934(02)00135-0.
60. Panno, S., Caruso, A. and Davino, S. (2019) First Report of Tomato Brown Rugose Fruit Virus on Tomato Crops in Italy. *Plant Disease*, 103. doi:10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN.

- 61.Liang, Y.Y. et al. (2016) crAssphage is not associated with diarrhoea and has high genetic diversity. *Epidemiology and Infection*, 144(16), pp.3549–3553. doi:10.1017/S095026881600176X.
- 62.Thermo Scientific (n.d.) O'GeneRuler™ Ready-to-use 100bp Plus DNA Ladder [Электронний ресурс]. Доступно за: <https://www.fishersci.se/shop/products/fermentas-o-generuler-ready-to-use-100bp-plus-dna-ladder/10756221> [Дата звернення: 1 березня 2025].
- 63.International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2022) Virus Taxonomy: 2022 Release [Электронний ресурс]. Доступно за: <https://ictv.global/taxonomy> [Дата звернення: 30 липня 2022].
- 64.Symonds, E.M. et al. (2018) Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste) water treatment development and public health management. *Water Research*, 144, pp.1–12.
- 65.Rosario, K. et al. (2009) Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, pp.7261–7267.
- 66.Han, T.H. et al. (2014) Detection of norovirus genogroup IV, klassevirus, and pepper mild mottle virus in sewage samples in South Korea. *Archives of Virology*, 159, pp.457–463.
- 67.Schmitz, B.W. et al. (2016) Virus reduction during advanced bardenpho and conventional wastewater treatment processes. *Environmental Science and Technology*, 50, pp.9524–9532.
- 68.Kitajima, M. et al. (2014) Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes: Identification of potential viral indicators. *Science of the Total Environment*, 488–489, pp.290–296.
- 69.Farkas, K., Walker, D. I., Adriaenssens, E. M., & Jones, D. L. (2020). Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. *Water Research*, 181, 115926. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115926>

70. Hamza, H. et al. (2019) Pepper mild mottle virus in wastewater in Egypt: A potential indicator of wastewater pollution and the efficiency of the treatment process. *Archives of Virology*, 164, pp.2707–2713.
71. Rosiles-Gonzalez, G. et al. (2017) Occurrence of pepper mild mottle virus (PMMoV) in groundwater from a karst aquifer system in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Food and Environmental Virology*, 9, pp.487–497.
72. Ahmed, W. et al. (2019) Enhanced insights from human and animal host-associated molecular marker genes in a freshwater lake receiving wet weather overflows. *Scientific Reports*, 9(1), 12503. doi:10.1038/s41598-019-48682-4.
73. Saeidi, N. et al. (2018) Occurrence of traditional and alternative fecal indicators in tropical urban environments under different land use patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, e00287-18.
74. Mehle, N. and Ravnikar, M. (2012) Plant viruses in aqueous environment – Survival, water mediated transmission and detection. *Water Research*, 46(16), pp.4902–4917. doi:10.1016/j.watres.2012.07.027.
75. Boben, J. et al. (2007) Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. *European Journal of Plant Pathology*, 118. doi:10.1007/s10658-007-9112-1.
76. Головне управління Держпродспоживслужби в Тернопільській області (2024) Загроза для овочевих культур – вірус зморшкуватості плодів томатів (ToBRFV) [Електронний ресурс]. Доступно за: <https://dpss-te.gov.ua/news/zahroza-dlia-ovochevykh-kultur-virus-zmorshkuvatosti-plodiv-tomativ-tobrfv> [Дата звернення: 16 березня 2025].
77. Mehle, N. et al. (2023) Tomato brown rugose fruit virus in aqueous environments – survival and significance of water-mediated transmission. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1187920. doi:10.3389/fpls.2023.1187920.
78. Sherchan, S.P., Malla, B. and Haramoto, E. (2023) First quantitative detection of tomato brown rugose fruit virus in wastewater in Louisiana. *Science of the Total Environment*, 888, 164001. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.164001.

79. Verma, S. et al. (2023) Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV): A Better Indicator of Viral Load and Treatment Efficacy of Wastewater Treatment. Preprint, Research Square. doi:10.21203/rs.3.rs-3147396/v1.
80. Natarajan, A. et al. (2023) The Tomato Brown Rugose Fruit Virus Movement Protein Gene Is a Novel Microbial Source Tracking Marker. *Applied and Environmental Microbiology*, 89, e00583-23. doi:10.1128/aem.00583-23.