КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ « Інститут біології та медицини»
Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА
Протокол № засідання кафедри
від ‘’ ____ ’’_____ 2026 р.

АНАЛІЗ БАКТЕРІОФАГІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ЗРАЗКІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

Випускна кваліфікаційна робота
студентки денної форми навчання
за спеціальністю «Біологія та біохімія»
Лапіної Олександри Євгеніївни
Науковий керівник від кафедри
к.б.н., доцент Андрійчук О.М.

Робота виконана на базі кафедри вірусології ННЦ « Інститут біології та медицини»
під керівництвом к.б.н. доцента Андрійчук Олени Миколаївни

Оцінка захисту роботи

_____

Київ-2026 р.

ЗМІСТ

ВСТУП.....3
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури…….....5
1.1. Кліматичні та екологічні аспекти, що впливають на віросферу Антарктиди ……..... 5
1.2. Гени антибіотикорезистентності в антарктичному віромі..... 9
1.3. Морфологічна та генетична характеристика бактеріофагів, поширених на південному полюсі……..…….....10
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень…….……19
2.1. Бактерії та бактеріофаги, джерела їх виділення……..……19
2.2. Накопичення бактеріофагів у рідкому поживному середовищі з примусовою аерацією……..….21
2.3. Виявлення бактеріофагів на твердому поживному середовищі…….23
2.4. Очистка та концентрація бактеріофагів……..….26
2.5. Трансмісійна електронна мікроскопія……..27
2.6. Спектр літичної активності бактеріофага чутливого до *Pseudomonas fluorescens* 8573……..29
2.7. Електрофорез продуктів виділення ДНК……...……..30
2.8. Методи статистичної обробки отриманих експериментальних даних……..….32
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення…….……34
3.1. Комплексна характеристика бактеріофага виділеного з антарктичного ґрунту прибережжя……34
3.2. Основні характеристики геному бактеріофага……...….39
3.3 Філогенетичний аналіз зв'язків бактеріофага……...45
ВИСНОВКИ……..51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ…….……52

ВСТУП

Побережжя Аргентинських островів, що розташоване в західній частині Антарктиди, проте вивчення впливу екстремальних умов на вірусні спільноти майже не відбувається. Винятковість екосистеми зумовлена комбінацією низьких температур, підвищеного індексу ультрафіолетового випромінювання та високою конкуренцією за поживні речовини, що створює ідеальні умови для вивчення адаптацій мікроорганізмів за участі бактеріофагів [1].

Бактеріофаги, які представлені в антарктичних екосистемах, відіграють важливу роль у регуляції бактеріальних спільнот, що забезпечує збереження рівноваги в динамічному циклі поживних речовин. Генетична та морфологічна різноманітність притаманна фагам за полярним колом, відрізняється високим рівнем адаптації до екстремальних умов [2].

Останні дослідження виявили, що бактеріофаги, які поширені на південному полюсі не тільки беруть значну участь в регуляції мікробіоти, але й сприяють передачі генетичної інформації між бактеріями, що сприяє стійкості до екстремальних умов та природних аналогів антимікробних хімічних сполук [3, 4]. Унікальна структура фагів, що забезпечує стійкість до низьких температур і впливу ультрафіолетового випромінювання, дозволяють бактеріофагам ефективно взаємодіяти з чутливими хазяями навіть за екстремальних умов [5, 6].

Тому, дослідження бактеріофагів отриманих з ґрунтових екосистем Аргентинських островів мають вагоме значення для розуміння біорізноманіття Антарктики, ролі в екологічних механізмах вірусно-бактеріальних взаємодій і адаптацій мікроорганізмів до виживання в екстремальних середовищах. Окрім того, фаги здатні лізувати бактерії за допомоги лізинів, що може знайти практичне значення в біотехнології, як приклад, таких як біоконтроль патогенних бактерій [7, 8].

Таким чином, морфологічна та генетична характеристика бактеріофагів, поширених на Аргентинських островах, дозволяє не лише розкрити екологічну роль фагів, але й відкриває нові горизонти в застосуванні бактеріофагів з метою біоконтролю патогенних мікроорганізмів у рослинництві [9].

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Кліматичні та екологічні аспекти, що впливають на віросферу Антарктиди

Аргентинські острови знаходяться в західній частині Антарктиди, що належить північно-західній частині узбережжя Антарктичного півострова. На даній території сформувались унікальні кліматичні умови, що обумовлено ізольованістю, низькою температурою, високим індексом ультрафіолетового випромінювання та бідними на поживні середовища ґрунтами [1]. Тому дані екстремальні умови мають велике значення для досліджень змін клімату, функціонування екосистем у суворому кліматі та адаптаційних механізмів організмів, що постійно мешкають у середовищі з низькими температурами [10]. Холодоадаптовані мікроорганізми стали джерелом численних цінних інструментів для застосування в широкому спектрі інноваційних технологій. Щоб подолати численні проблеми, з якими стикаються в полярних пустелях, ці мікроорганізми мають великий спектр синергетичних адаптацій на всіх рівнях, починаючи від адаптації клітинної оболонки та ферментів до виробництва кріопротекторів та шаперонів, а також нових метаболічних можливостей.[11].

Аргентинські острови належать до архіпелагу невеликих островів, що розташовані у районі протоки Ґреґорі. Завдяки близькому розташуванню до материка, острови піддаються впливу як морського, так і континентального клімату, що робить їх важливим природним об’єктом у вивченні полярних екосистем [1].

Середньорічна температура коливається в межах -10°C, але взимку температура може знижуватися до -30°C, а влітку підніматися до 2-5°C. Рівень опадів коливається в межах 200–500 мм на рік, більшість із яких

випадає у вигляді снігу. Через наявність масивної озонової діри, рівень ультрафіолетового випромінювання в Антарктиці вищий, ніж у багатьох інших частинах Земної кулі.

Також, тривалість світлового дня має значний вплив на функціонування екосистем. У періоди коли триває полярна ніч, мікроскопічні спільноти змушені адаптуватися до тривалої відсутності світла, і навпаки за тривалості полярного дня до надмірної кількості ультрафіолетового випромінювання [6].

Екосистеми Аргентинських островів можна умовно розділити на ґрунтові, водні та льодові бактеріальні спільноти. Дані середовища слугують домом для різноманітних мікроорганізмів, включаючи бактерії, археї, гриби та віруси, які адаптувалися до екстремальних умов крізь мільйони років еволюції [12].

Ґрунти на островах відносять до одних з найбільш збіднених у світі. Через низький вміст поживних речовин основними мешканцями ґрунтів є психрофільні бактерії та археї, які демонструють високу стійкість до низьких температур та вологості [13]. Бактеріофагам, що були знайдені в даних ґрунтах, належить ключова роль у підтримці стабільності в бактеріальних спільнотах [14]. Геномний аналіз фагів, виділених з ґрунтів Антарктиди, виявили наявність генів, пов’язаних з реплікацією ДНК та регуляцією метаболічних процесів бактерії-хазяїна, включно з адаптацією до низьких температур, що є свідченням тривалої коеволюції між фагами та популяціями ґрунтових мікроорганізмів [15].

Водні об’єкти північно-західної частини Антарктичного півострова, такі як озера покриті вічною мерзлотою та прибережні води, є середовищем для різноманітних мікробних спільнот. Температури в цих водах зазвичай наближені до точки замерзання, а солоність може варіюватися від 30‰ у зимовий період та до 20–25‰ влітку, що зумовлене через танення льодовиків [16]. У льодовикових озерах, ізольованих від морської води, солоність значно

нижча та наближена до рівня прісної води [12]. Бактеріофаги, що були знайдені у водних екосистемах Аргентинських островів, характеризуються високою різноманітністю та сезонною мінливістю вірусного складу, що впливає на чисельність представників мікроорганізмів та різноманітність вірусів [5].

Дослідження прибережних вод Антарктичного півострова, вказують на залежність від зміни сезонів. Влітку спостерігається значне підвищення чисельності фагів, які інфікують домінуючі таксони бактерій, що має вплив на регуляцію біогеохімічних циклів, включно з колообігом важливих хімічних елементів таких, як вуглець та азот (Рис. 1.1), що входять в склад важливих сполук для забезпечення функціонування прибережних екосистем [17].

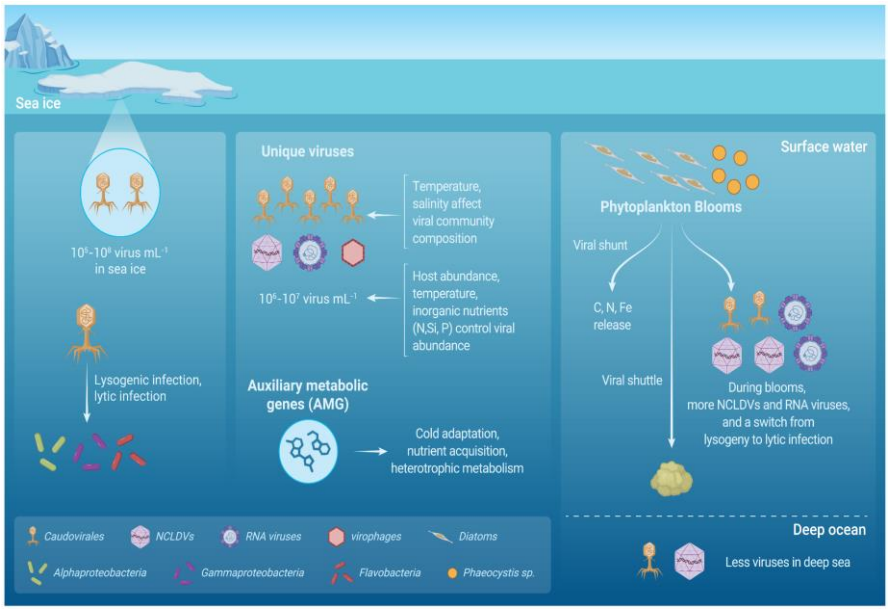


Рис. 1.1. Біорізноманіття та екологічна роль вірусів у морських екосистемах Антарктики: поширення бактеріофагів у морських екосистемах, поверхневих та глибоководних водах; літичний та лізогенний цикл розвитку фагів; сезонна динаміка вірусних популяцій під час цвітіння фітопланктону; роль фагів у кругообігу поживних речовин та поширення допоміжних метаболічних генів (AMGs), що сприяють адаптації мікроорганізмів до екстремальних полярних умов [18].

На поверхні островів де панує вічна мерзлота також наявна бактеріальна активність. Бактерії зачасту існують у тісному симбіозі з бактеріофагами, які допомагають їм адаптуватися до надмірного ультрафіолетового випромінювання та сезонних замерзань і відтавань [3]. Було встановлено, що в бактеріофагів присутні механізми для забезпечення стабільності віріонів за низьких температур, а також здатність до лізогенії, що дозволяє зберігати генетичний матеріал у бактерії-хазяїні протягом несприятливих періодів [19].

Унікальність мікроорганізмів антарктичного регіону полягає у здатності до адаптації до низьких температур. Психрофільні та психротолерантні бактерії підтримують метаболічну активність при температурах близьких до точки замерзання води, завдяки наявності систем синтезу антифризних білків і змінам в ліпідному складі мембранних структур, виявлено, що ліпіди в складі мембран антарктичних грамнегативних бактерій має іншу довжину та ступінь ненасиченості жирними кислотами, що має вплив на стабільність оболонки за низьких температур і перепадів солоності. [12].

Фагова активність має значний вплив на бактеріальні спільноти, які беруть участь у циклі фіксування азоту, таким чином мають опосередкований вплив на доступність азоту в ґрунті. Данні механізми дуже важливі для збідненого субстрату узбережжя Аргентинських островів [4].

Бактеріофаги Антарктичного півострову є не лише генетично та морфологічно різноманітними, а й мають широкий ареал географічного поширення, що свідчить про наявність механізмів дисперсії в полярних екосистемах. Було описано фаги з лізогенним циклом, специфічний до представників бактерій роду *Pseudomonas*, геном яких знайдено як в Арктиці, так і в Антарктиці. Геномний аналіз виявив, що даний фаг належить до порядку *Autographiviridae* та має низку унікальних генів, що пов’язані з лізогінією, що сприяє адаптації до низьких температур. Таке відкриття свідчить про подібність віросфери між віддаленими полярними регіонами [2].

1.2. Гени антибіотикорезистентності в антарктичному вірому

Хоча Антарктида вважається відносно незайманим середовищем, та в ході досліджень по всьому півострові було виявлено гени та детермінанти антибіотикорезистентності. Попередні оцінки свідчать про те, що антибіотикорезистентність у більшій частині Антарктиди, ймовірно, наближається до «доантимікробного стану» і, отже, може слугувати орієнтиром для моделювання взаємодій та поширення в більш індустріалізованих регіонах. Однак залишаються питання, щодо рівнів природної антимікробної резистентністі (АМР), на відміну від антропогенної АМР, через ізольований, ситуативний характер середовища [20]. Щодо АМР, наявні дані свідчать, що в районах з мінімальною або відсутньою людською діяльністю антарктичні ґрунти містять давні риси АМР без очевидного антропогенного забруднення. Однак у районах з відносно високою людською діяльністю існують потенційні докази антропогенного впливу на профілі. Як приклад, кастери генів антибіотикорезистентності, характерні для людського походження, були виявлені в ізолятах *Escherichia coli* з морської води, донних відкладів і фекалій тварин. Але нещодавні дослідження виявили, що резистоми антарктичних ґрунтів, ймовірно, формувалися під впливом абіотичних, а не антропогенних факторів, зокрема pH і середньорічною температурою поверхні повітря (MASAT) [21].

Однак, очевидно, не можна виключати наявність антропогенного забруднення антибіотиками через стічні води, міграції тварин та наукові експедиції, що може сприяти селекції АМР, існують докази того, що розвиток антибіотикорезистентності є давнім поширеним природним явищем на Антарктичному півострові, яке, як і інші метаболічні особливості, розвивалося протягом мільярдів років еволюції. До того ж, набагато менше відомо про мікробне різноманіття та природний резистоміс, що зустрічаються в екстремальних середовищах, які, є багатим джерелом нових

механізмів резистентності завдяки високоендемічній мікробіоті, що природним чином розвинула механізми для виживання в суворих умовах та опору токсичним речовинам. Серед цих спільнот у культивованій мікробіоті переважають *Pseudomonas*, які виявилися природно стійкими до багатьох антибіотиків [22].

Більшість генів антибіотикорезистентності, виявлених в Антарктичному регіоні, походять переважно від видів, які здатні продукувати антибіотики, була підтверджена присутністю генів біосинтезу антибіотиків у багатьох філах, що кодують резистентність, і додатково підкреслюється повною відсутністю мобільних генетичних елементів (транспозонів, інтегронів і рекомбіназ), які фланкують усі ймовірні гени антибіотикорезистентності. Антибіотикорезистентність, передається вертикально протягом поколінь, з обмеженим або повністю відсутнім горизонтальним переносом між видами [23].

1.3. Морфологічна та генетична характеристика бактеріофагів, поширених на південному полюсі

Аргентинські острови, що належать до частина Антарктичного півострова, мають унікальні кліматичні умови для вивчення бактеріофагів, яким відведена важлива роль в мікробних екосистемах. Дані віруси, що мають здатність інфікувати бактерії, демонструють високу різноманітність у морфологічній структурі, генетичній організації та функціях в екосистемі. Фаги приймають участь у регуляції бактеріальних популяцій, моделюють метаболічні процеси і підтриманні біогеохімічних циклів, що особливо важливо в збідненому субстраті Антарктичного півострова [1, 4, 5].

Бактеріофаги, Аргентинських островів, за морфологічними характеристиками можна розділити на: міоподібні, сифоподібні та

подоподібні, а також менш вивчені таксони. Особлива увага при дослідженнях вірому південного полюсу приділяється морфологічним та генетичним особливостям організації вірусів, що сприяє їх адаптації до суворих кліматичних умов [4].

Міоподібні або Т4 бактеріофаги є одним з домінуючих таксонів, що були знайдені на просторах Антарктики. Для представників цієї групи характерна складна структурна організація, що включає ікосаедричний капсид, в якій упакована дволанцюгова ДНК, та довгий скоротливий хвостовий відросток, який використовується для “ін’єкції” генетичного матеріалу у чутливу бактерію (Рис. 1.2) [5]. Геном Т4 фагів може досягати розмірів до 170 тисяч пар основ, що забезпечує генетичну складність і адаптивність. Міоподібним бактеріофагам притаманний літичний цикл розвитку, що сприяє вивільненню органічного матеріалу та перерозподілу поживних речовин у середовищі.

Генетичний потенціал для вірусно-опосередкованого циклу азоту також був виявлений серед представників Т4 бактеріофагів в геномі яких були виявлені гени деградації метіоніну, зокрема ДНК (цитозин-5)-метилтрансфераза (*dcm)*.

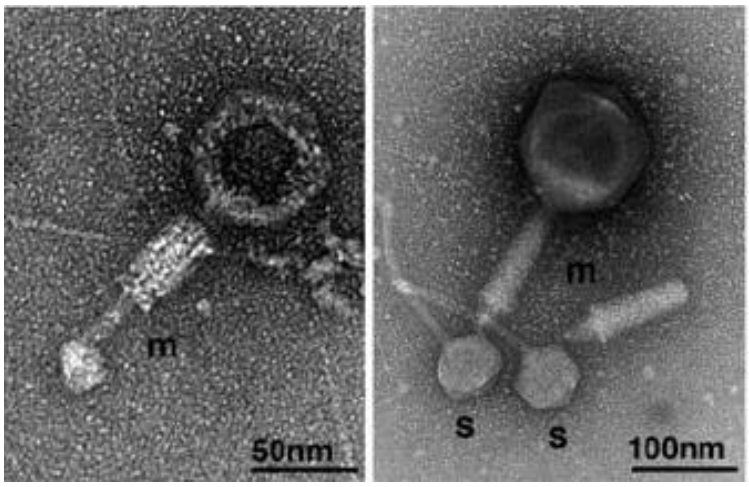


Рис. 1.2. Електро-мікроскопічне дослідження бактеріофагів, що за морфологією відносять до міоподібних, які були знайдені в Лімполярному озері [24].

Хоча *dcm* все ще підлягає вивченню, він може мати численне переваги для фагів, такі як стабілізація капсидів, допомога в уникненні обмежень органічного азоту через деградацію метіоніну та запобігання розпізнаванню прокаріотичними метилтрансферазами. Ген *dcm* може посилювати деградацію метіоніну, а потім перенаправляти сірку в шлях біосинтезу цистеїну, в свою чергу збільшення якого може забезпечити більшу міцність капсиду та структурну стабільність, що також може бути корисним як стратегія виживання протягом зими для літичних вірусів, що зберігаються поза чутливою бактерією, особливо коли чисельність хазяїна зменшується протягом зимових місяців [25].

Представники сифоподібних бактеріофагів також широко поширені в Антарктичному біотопі, для фагів λ характерний довгий нескоротливий хвостовий відросток з ікосаедричим капсидом, в якому міститься дволанцюгова ДНК із геномом що становить близько 50 тисяч пар основ (Рис. 1.3) [1].

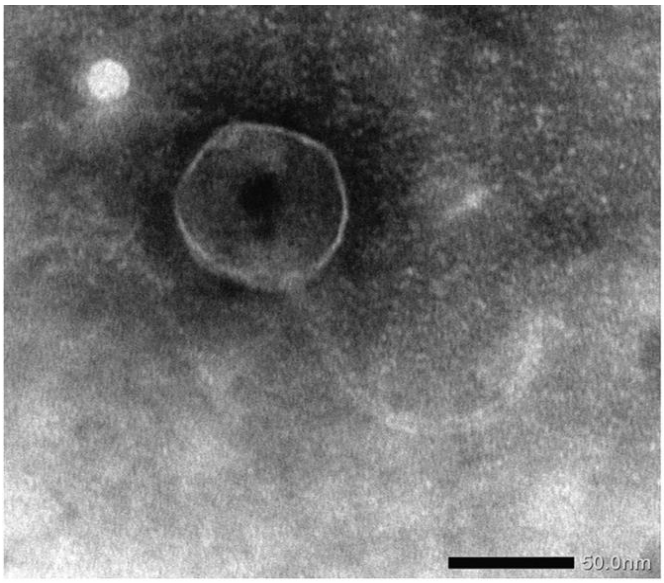


Рис. 1.3. Електро-мікроскопічне дослідження бактеріофагів, що за морфологією відносять до сифоподібних, отримані з наземних біотопів Антарктиди [26].

Для сифоподібних фагів характерний лізогенний цикл репродукції, що надає здатності до інтеграції власного генетичного матеріалу до геному бактерії-хазяя підчас несприятливих умов. Це сприяє горизонтальному переносу генів, що є важливим механізмом адаптації бактерій до екстремальних умов [3].

Обмеження середовища, такі як низькі температури та, як наслідок, обмежена здатність до дифузії, призводять до надзвичайно локалізованих взаємодій між фагами та чутливими бактеріями [27]. Отримані дані свідчать про динамічну та безперервну взаємодію між хазяїном та фагом [28]. За таких умов фаги зачасту обирають лізогенний цикл розвитку за якого фаг інтегрує свій геном у ДНК бактерії, формуючи профаг. У такому стані генетичний матеріал може залишатися не активним протягом тривалого часу [29]. Інтеграція генетичної інформації профага може надавати бактеріям нові властивості, такі як стійкість до вірусного лізису або підвищена метаболічна гнучкість. Наприклад, гени, що кодують білки, здатні захищати бактерію від температурного стресу, можуть активуватися в певних умовах, підвищуючи її шанси на виживання [4].

Наявність активних лізогенних бактеріофагів неминуче призводить до еволюції спеціалізованих бактеріальних захисних систем, і було виявлено широкий спектр механізмів бактеріального захисту проти фагових мобільних елементів. До них належать елементи адаптивного імунітету, такі як системи CRISPR-Cas, та механізми вродженого імунітету, такі як системи рестрикції-модифікації (RM) та токсин-антитоксин абортивної інфекції (Abi). Пангеномні дослідження також виявили нові захисні системи, які широко поширені серед бактеріальних таксонів до них належать система виключення бактеріофагів (BREX), що забезпечує стійкість до хвостатих фагів *Siphoviridae* шляхом пригнічення реплікації фагової ДНК, та інші менш

добре охарактеризовані системи, такі як елементи Thoeris, Shedu та Gabija, які підвищують стійкість бактерій [30].

Фаги також відіграють ключову роль у захисті бактерій від ультрафіолетового випромінювання. Вони здатні переносити гени, які сприяють відновленню пошкодженої ДНК, а переносити генетичну інформацію активації синтезу захисних пігментів, які поглинають УФ-промені. Це дозволяє мікроорганізмам зберігати життєздатність у районі із високим рівнем ультрафіолетового випромінювання через озонову діру [12].

Представники фагів λ відіграють значну роль у підтриманні рівноваги, в регуляції чисельності бактеріальних угрупувань і сприяють їх генетичному різноманіттю, відіграють досі недооцінену роль у еволюції мікробних спільнот антарктичного півострову та формують колективний імунітет [14].

Подоподібні T7 фаги вирізняються своєю компактністю в структурній організації, з коротким хвостовим відростком і сферичним або ікосаедричною капсидом. Геном зазвичай представлений дволанцюговою ДНК та має розмір від 20 до 40 тисяч пар основ (Рис. 1.4). Завдяки своїй морфологічній будові є високоефективними в інфікуванні бактерій, що населяють прибережні води Антарктиди[2].

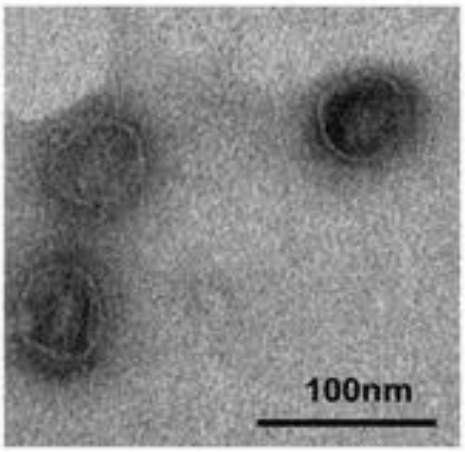


Рис. 1.4. Електро-мікроскопічне дослідження бактеріофагу, що за морфологією відносять до подоподібних фагів, який виділено з зразків зібраних в Антарктиці [31].

Т7 бактеріофаги виявляють високу стійкість до низьких температур, за рахунок білкових оболонок, які захищають їхній генетичний матеріал від замерзання та пошкоджень [5].

Віруси гіпераридних пустель не тільки самі витримують тривалі морози та екстремальний окислювальний стрес, але й можуть передавати гени екстремотолерантності своїм хазяям та сприяти їхньому виживанню (Рис. 1.5) [32]. Для фагів, які були знайдені в арктичних віромах, характерна передача генетичної інформації, щодо білків холодового шоку чутливим-бактеріям, що слугує очевидною перевагою для мікроорганізмів у полярних середовищах [33].

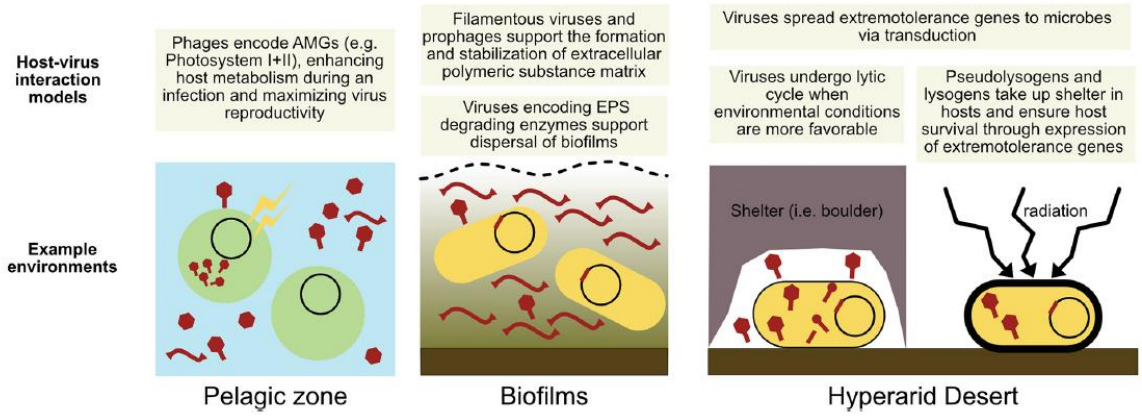


Рис. 1.5. Схематичне зображення моделей взаємодії «бактеріофаг хазяїн» у гіпераридній пустелі та порівняння з моделями взаємодії для інших середовищ [32].

Т7 бактеріофаги - це широко вивчені вірулентні віруси, які зазвичай є синонімом строго вірулентного способу життя. Важко уявити, як Т7-подібний фаг може функціонувати в "одомашненому" помірному способі життя, в якому він включений в геном хазяїна. Однак, фаги знайдені в Антарктиді мають Т7-подібні білки в канонічному Т7-подібному порядку генів, але з додаванням лізогенних генних модулів, які контролюються новим марР-подібним транскрипційним регулятором. Крім того, було

ідентифіковано Т7-подібні елементи профагу в широкому спектрі грамнегативних бактеріальних геномів і невеликій кількості грампозитивних геномів. Ідентифікація цих елементів у різноманітних бактеріальних видів викликає цікаві еволюційні питання про походження Т7-подібних фагів і про те, який цикл, помірний чи вірулентний, Їм характерний [34].

Важливим аспектом є вплив бактеріофагів на метаболізм бактерій. У процесі інфікування Т7 фаги можуть змінювати пріоритети використання енергетичних ресурсів бактерією-хазяїном. Це дозволяє адаптуватися до умов обмеженого доступу до поживних речовин, завдяки перерозподіл ресурсів на більш важливі для виживання процеси [35]. Наприклад, фаги можуть активувати гени, які посилюють катаболічні процеси, зокрема розщеплення органічних сполук для отримання енергії. У середовищах з низькою кількістю органічного вуглецю такі зміни можуть бути вирішальними для підтримання функціональності екосистеми [5].

Така мутуалістична взаємодія дуже подібна до вірусних AMG, виявлених в помірних широтах, як приклад гени фотосистем I і II у морських ціанофагів та CAZymes у вірусах знайдених у ґрунті тропіків, де AMG підсилюють вірусну продукцію шляхом посилення метаболізму хазяїна під час інфекції. У гіпераридному середовищі вірусні гени екстремотолерантності, ймовірно, збільшують шанси на вірусну продукцію, шляшом сприяння виживання хазяїна, навіть якщо вони призводять до тимчасової “сплячки”.

Подібна модель взаємодій вірус-господар була описана в біоплівках, де вірусна лізогеннія підтримує формування, стабілізацію та розповсюдження біоплівок, а біоплівки, в свою чергу забезпечують захист вірусів від стресу навколишнього середовища [36].

Окрему групу бактеріофагів, складають мікровірусів представлені підродиною *Gokushovirinae*, які представлені одноланцюговою ДНК, а геном

складає всього декілька тисяч пар основ та мають ікосаедричну будову капсиду (Рис. 1.6).

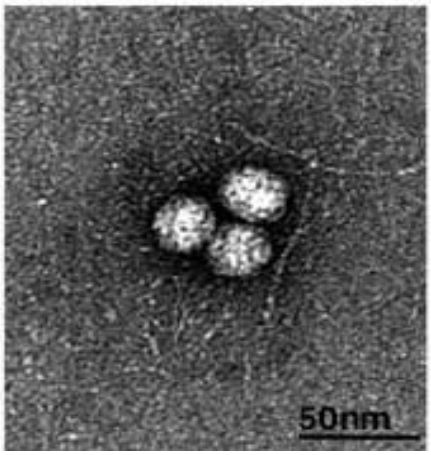


Рис. 1.6. Електро-мікроскопічне дослідження мікровірусів знайдених в антарктичному озері [24].

Данні віруси були знайдені в Антарктичному кріоконіті [35]. Відомо, що мікровіруси інфікують ентеробактерії, а їх наявність на Антарктичному півострові пояснюється наявністю представників безхребетних таких, як коловертки та тихоходки, які виявлені в зразках осаду кріоконіту [36, 37, 38].

Унікальна морфологія сприяє поширенню мікровірусів по просторам антарктичного півострова та висока генетична варіабельність і є ключовими компонентами унікальної, екстремальної мікробної екосистеми Антарктики [39]. Також характерна висока частка унікальності виявлених геномів, що може бути свідченням наявності активної прадавньої віросфери в центральній частині антарктичного півострова [32].

Окрім впливу на окремі бактерії, фаги моделюють структуру бактеріальних спільнот, сприяючи їхній стійкості до змін навколишнього середовища. Здійснюють регуляцію чисельності домінантних бактеріальних таксонів, що запобігає монокультурності та створює умови для співіснування різноманітних мікроорганізмів. Це має особливе значення для екстремальних

екосистем, де різноманіття є ключовим фактором екологічної стабільності [1].

Не менш важлива роль бактеріофагів у підтриманні біогеохімічних циклів. Лізис бактерій сприяє вивільненню органічних і неорганічних речовин у навколишнє середовище, зокрема важливі сполуки азоту та вуглецю. Це створює можливості для інших мікроорганізмів використовувати ці хімічні сполуки та формувати складні трофічні зв’язки [4].

Бактеріофаги, що представлені на антарктичному півострові, відіграють ключову роль у регуляції чисельності бактерій, підтримці балансу та циркуляції хімічних та генетичних елементів. Їх висока різноманітність і здатність адаптуватися до екстремальних умов роблять їх важливими об’єктами для вивчення, особливо в контексті глобальних кліматичних змін.

Вивчення бактеріофагів південного полюсу не лише розширює знання про їхню екологічну роль, а й відкриває нові можливості для дослідження їх впливу в помірних широтах [40].

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Бактерії та бактеріофаги, джерела їх виділення

Користуючись досягненнями попередніх років, отриманих при вивченні наукової літератури та результати досліджень, дають можливість встановити, що бактеріофаги, ізольовані з географічно віддалених регіонів, викликають певні труднощі при підборі чутливої бактерії-хазяїна, що спричинені специфікою їх адаптації до місцевих умов та бактеріальних штамів. Саме тому, при подальшому пошуку чутливих пар «фаг-бактерія», використовували бактерії із антарктичних зразків ґрунту, які могли б слугувати потенційними хазяями для фагів. Для досягнення цієї мети було використано готові комерційні агаризовані поживні середовища на основі рибного гідролізату, зокрема ГРМ-агар та ГРМ-бульйон, що забезпечило оптимальні умови для росту бактеріальних культур. Результати первинного культивування дали змогу відібрати 10 ізолятів бактерій для подальших досліджень.

Фітопатогенні штами бактерій, що використовувалися в дослідженні, були отримані з кількох колекцій, а саме: відділ фітопатогенних бактерій музею Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, науково-дослідна лабораторія (НДЛ) Фармакології і експериментальної патології ННЦ «Інститут біології та медицини», а також Національний антарктичний науковий центр. Серед фітопатогенних бактерій українського походження, які слугували індикаторними культурами для виділення бактеріофагів, були використані штами *Pseudomonas fluorescens* 8573, *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* 4013 та *Pseudomonas syringae pv. lachrymans* 7591. Крім того, із колекції НДЛ Фармакології і

експериментальної патології були надані фітопатогенні штами, попередньо ізольовані з антарктичного регіону: *Pseudomonas sp.* 863/1, *Bacillus sp.*, а також нетиповані штами під номерами 6 і 5.

На відібраних бактеріальних ізолятах з метою пошуку чутливих пар «фаг-бактерія» тестувалися вірусні фільтрати, отримані із антарктичних зразків. В ході експерименту використовувалася методика двошарового агару, яка передбачає прямий висів фагового матеріалу на бактеріальний газон.

При дослідженнях використано матеріали, а саме зразки ґрунту та рослин, відібрані під час сезонних експедиційних робіт у 2022 році поблизу Української антарктичної станції «Академік Вернадський», розташованої на острові Галіндез Аргентинського архіпелагу (координати: 65.245678° південної широти, 64.257825° західної довготи). Регіон характеризується субантарктичним кліматом із відносно м'якими умовами порівняно з внутрішніми районами Антарктиди. Влітку температура повітря зазвичай коливається близько 0°C, тоді як узимку вона різко знижується до -20…-25°C. Кліматичні особливості включають часті циклони, що призводять до високої хмарності, опадів і туманів, сильних вітрів зі швидкістю 30-35 м/с і більше в зимовий період. Проби ґрунту та моху відбиралися з різних ділянок острова Галіндез. На кожній ділянці, площею до 1 м² брали по чотири аліквоти відкритого ґрунту масою 50 г (глибина відбору 0 - 5 см). Під час транспортування зразки зберігалися в стерильних 50-мл поліпропіленових пробірках типу «Фалкон» при температурі нижче 0°, в лабораторії — при -20°C або +4°C залежно від умов зберігання.

Відбір зразків фагів і бактерій із поліетиленових «Фалконів» проводився в стерильних умовах ламінарного боксу, що забезпечило уникнення контамінації лабораторними штамами. Для виділення вірусних частинок (ВПЧ) використано 10 зразків ґрунту та моху. Кожен зразок аналізувався у трьох повторах для забезпечення достовірності результатів.

Процедура ізоляції бактеріофагів включала: гомогенізацію 5 г ґрунту в 50 мл фізіологічного розчину (0,9% NaCl), ресуспендування суспензі на орбітальному шейкері на протязі 20 хв для рівномірного розподілу частинок, центрифугування при 4000 g на протязі 20 хв для видалення великих часток, фільтрування мембранним фільтром з діаметром пор 0,45 мкм одержаного супернатанту. В результаті було одержано приблизно 30 мл чистого фагового фільтрату, що був використаний для подальшого тестування.

Виявлення фагів здійснювалося методом прямого висіву на бактеріальний газон. Для розведення фагових суспензій використовували фізіологічний розчин (0,9% NaCl) або готовий комерційний м'ясний бульйон, приготований відповідно до рекомендацій виробника. Дані середовища забезпечували стабільність фагів і сприяли їхній активності під час експериментів.

За результатами досліджень було ідентифіковано чутливі пари «фаг-бактерія», що дало змогу закласти основу для подальшого вивчення біорізноманіття бактеріофагів в екстремальних умовах Антарктики.

2.2. Накопичення бактеріофагів у рідкому поживному середовищі з примусовою аерацією

Застосувавши метод культивування чутливих бактеріальних штамів із подальшим їх лізисом під дією фагів у рідкому поживному середовищі з примусовою аерацією відбувається процес накопичення бактеріофагів. Для забезпечення оптимальних умов для росту бактерій і розмноження фагів процес акумуляції відбувався за контрольованої температури 25°C, як поживне середовище використовували готовий комерційний бульйон, характеризується стабільним складом і високою поживною цінністю, що сприяє ефективному культивуванню.

Для експерименту використовували спеціалізовані скляні колби, призначені для культивування мікроорганізмів із забезпеченням аерації. Кожна колба вміщувала 100 мл стерильного поживного бульйону, до якого додавали 2 мл матеріалу, що містив бактеріофаги. Даний матеріал попередньо отримували методом виколювання окремих негативних колоній (зон лізису) із двошарового агару, що свідчили про активність бактеріофагів. Додатково вносили 5 мл змиву бактеріальної культури, яка слугувала чутливим хазяєм для фагів. Дана методика забезпечує достатню кількість бактеріальних клітин для інфікування фагами та їх подальшого розмноження.

За допомогою компресора здійснювали примусову аерацію, що сприяло створенню оптимальних умов культивування. В процесі примусової аерації повітря подавалося через скляну трубку, оснащену стерильним ватним фільтром, що запобігає контамінації культури сторонніми мікроорганізмами. Інтенсивна аерація сприяла насиченню середовища киснем, що прискорювало метаболічні процеси в бактеріальних клітинах і переводило їх у логарифмічну фазу росту (log-фазу). Логарифмічна фаза характеризується активним поділом клітин, що є ідеальним періодом для фагової інфекції, оскільки забезпечує максимальну кількість чутливих бактерій для розмноження вірусів. При застосуванні кисневої аерації досягається значно вищий титр бактеріофагів порівняно зі статичним культивуванням.

Завершення процесу лізису бактеріальних клітин та накопичення фагів у середовищі візуалізуються за деякими ознаками: спостерігається різке посилення піноутворення в колбі, що пов’язане з руйнуванням клітин і вивільненням внутрішньоклітинного вмісту, клітинні рештки осідають на дно колби у вигляді осаду, рідина в колбі ставала помітно прозорішою. На цьому етапі аерацію припиняли, щоб уникнути надмірного перемішування лізату та унеможливити пошкодження вірусних частинок.

На наступному етапі до отриманого лізату додавали хлороформ у невеликій кількості для запобіганню росту сторонньої мікрофлори, яка могла потрапити в культуру під час маніпуляцій або зберігання. Хлороформ ефективно пригнічував ріст небажаних мікроорганізмів, не впливаючи на життєздатність бактеріофагів. Далі лізат піддавали додатковій обробці. Для видалення залишків клітин і отримання чистого препарату, придатного для подальших досліджень або зберігання проводили центрифугування або фільтрацію.

Застосований метод накопичення бактеріофагів виявився ефективним завдяки поєднанню контрольованих умов культивування, інтенсивної аерації та ретельного моніторингу процесу лізису. В результаті отримали високий титр бактеріофагів у достатньо великому об'ємі, що є важливим для їх подальшого вивчення, аналізу їх специфіки, стабільності та потенційного застосування для вивчення основних проблем вірусології, молекулярної біології та біотехнології.

2.3. Виявлення бактеріофагів на твердому поживному середовищі

Якісне виявлення бактеріофагів базується на застосуванні методів, в основі яких використовують тверді поживні середовища. Такий підхід дозволяє одночасно аналізувати численні зразки та оцінювати їх за морфологічними характеристиками, забезпечує не лише ідентифікацію фагів, але й можливість порівняння їхньої активності та специфічності до різних бактеріальних культур. На твердому середовищі можна чітко спостерігати такі ознаки, як розмір, форма, прозорість зон лізису, наявність ореолів навколо негативних колоній, а також їх однорідність чи гетерогенність.

Титрування методом spot-test:

Ефективним способом визначення титру бактеріофагів на одній бактеріальній культурі є метод spot-test. Порівняно з іншими методиками використання spot-test значно економить час і ресурси. Значною перевагою є можливість використання лише однієї чашки Петрі з бактеріальним газоном для оцінки активності фагів в розведені, що спричиняє лізис. Процедура передбачає підготовку серійних розведень вірусовмісного матеріалу, які виконували у стерильних умовах, зазвичай у пластикових плашках. Фаговий лізат поступово розводили у фізіологічному розчині (0,9% NaCl) для отримання діапазону концентрацій.

На поверхні чашки Петрі з бактеріальним газоном, що вирощений на твердому поживному середовищі, попередньо маркером наносили сітку, розділяючи її на окремі сектори. Кожен сектор позначали числом, що відповідає ступеню розведення фагової суспензії. У центр кожного сектора наносили 10 мкл фагового лізату в розведені, після чого чашку інкубували у термостаті за температури 24 – 25°C протягом 12 – 24 годин. По завершенню інкубації результати оцінювали за наявністю зон лізису — ділянок, де бактеріальний ріст відсутній через вплив фагів. Титр бактеріофага визначали як найбільше розведення, при якому ще спостерігається утворення чітких негативних колоній (зон лізису) на бактеріальному газоні.

Повна відсутність росту бактерій у місці нанесення краплі фагового фільтрату або поява дрібних стерильних плям, які відповідають негативним колоніям є доказом присутності активних бактеріофагів у зразку. В залежності від типу фага, концентрації вірусних частинок і чутливості бактеріальної культури виділені зони можуть варіювати за розміром і виглядом. Метод spot-test є особливо цінним для скринінгу великої кількості зразків, оскільки дозволяє швидко оцінити активність фагів і підібрати оптимальні умови для подальших досліджень.

Титрування двошаровим методом за Граціа:

Для титрування бактеріофага існують різні методи. До найбільш поширених відноситься метод агарових шарів за Граціа, запропонований бельгійським вченим Андре Граціа в 1936 році. Двошаровий метод за Граціа є класичним підходом для кількісного визначення титру бактеріофагів і базується на висіванні серійних розведень фагового лізату на чашки Петрі з бактеріальним газоном. Цей метод забезпечує високу точність і дозволяє отримати дані про концентрацію фагів у бляшкоутворюючих одиницях на мілілітр (БУО/мл), що є стандартною одиницею вимірювання для фагів.

На першому етапі готують десятикратні розведення фаговмісного матеріалу. Для цього в 12 стерильних пробірок вносять по 4,5 мл фізіологічного розчину (0,9% NaCl), після чого до першої пробірки додають 0,5 мл вихідного фагового лізату. Ретельно перемішавши 0,5 мл із першої пробірки переміщують до другої, і так далі, створюючи послідовний ряд розведень. Наступним кроком є підготовка чашок Петрі з двошаровим агаром. Нижній шар складається з твердого агару (1,4%), який забезпечує стабільну основу, тоді як верхній шар формується з м’якого агару (0,7%), охолодженого до температури +45°C, щоб уникнути пошкодження бактерій і фагів.

До 2,5 мл м’якого агару додають 1 мл фагового розведення та 200 мкл суспензії газонної бактеріальної культури, яка слугує чутливим господарем. Суміш ретельно перемішують та швидко виливають на поверхню нижнього агару в чашці Петрі, формуючи рівномірний верхній шар. Після застигання агару чашки інкубують за температури 24°C протягом 18 – 20 годин. Полегшена дифузія фагових частинок завдяки зниженій концентрації агару забезпечує циклічність інфекційного процесу, коли кожна генерація фагового потомства після лізису клітини-хазяїна здатна інфікувати сусідні клітини, що призводить до утворення видимих зон лізису, або бляшок, на поверхні агару.

Титр бактеріофагів розраховують за формулою:

$$T = (y / V) \times x ,$$

де T — титр фагів у бляшкоутворюючих одиницях на мілілітр (БУО/мл); y — кількість бляшок, що утворилися на чашці; V - об’єм фагової суспензії (у мл), нанесеної на газон; x — ступінь розведення (10^{-n}).

Для підвищення точності розрахунків обирають чашки з невеликою кількістю бляшок (приблизно 20). Це дозволяє уникнути помилок, пов’язаних із надмірною щільністю або недостатньою кількістю зон лізису. Отриманий титр відображає концентрацію життєздатних фагових частинок у вихідному зразку та є важливим показником для оцінки їх активності.

Метод spot-test і двошаровий метод за Граціа — доповнюють один одного, тим самим забезпечуючи як швидкий скринінг, так і точне кількісне визначення фагів. Використання даних методів дозволяє не лише виявити бактеріофаги в зразках, але й оцінити їхню концентрацію, специфічність та морфологію негативних колоній.

2.4. Очистка та концентрація бактеріофагів

Метод диференційного центрифугування застосовують для очистки та концентрації бактеріофагів. Цей метод передбачає послідовне осадження компонентів фаголізату шляхом використання різних швидкостей центрифугування. Дозволяє ефективно відокремити бактеріальні залишки та інші домішки від вірусних частинок, забезпечуючи отримання високоякісного вірусного препарату. Для досягнення бажаного рівня очищення використовували щонайменше два повних цикли диференційного центрифугування.

Диференційне центрифугування проводиться поетапно. Перший етап - низькошвидкісне центрифугування, результатом є осадження клітинних уламків, залишків бактеріальних клітин та інших грубих фракцій. Центрифугування здійснювали при швидкості 5000 обертів за хвилину протягом 30 хвилин. Після завершення цього етапу надосадову рідину (що містить бактеріофаги) обережно зливали в окремий стерильний контейнер, уникаючи турбування осаду. Осад, що містить небажані клітинні компоненти, утилізують шляхом занурення в дезінфекційний розчин.

Другий етап - високошвидкісне центрифугування (Optima L-90K Ultracentrifuge), забезпечує осадження вірусних частинок. Відбувається при швидкості 38 000 обертів за хвилину, протягом 2 годин 30 хвилин при температурі 4 – 5 °C. Після завершення центрифугування надосадову рідину видаляли, залишаючи лише осад, що містить концентровані бактеріофаги. Отриманий осад ресуспендували в об’ємі, що становив близько 1/10 від початкового, використовуючи 0,1 М трис-HCl буфер з pH 7,2 – 7,4, що забезпечує стабільність фагових частинок та їх подальше збереження.

Результатом проведених процедур є очищений концентрат бактеріофагів з високим титром, що зазвичай становив 10^7 – 10^9 бляшкоутворювальних одиниць на мілілітр (БОУ/мл).

2.5. Трансмісійна електронна мікроскопія

Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) використовується для дослідження тонких об’єктів, зокрема ТЕМ дозволяє отримувати пряме зображення об’єкта за допомогою електронного променя на рівні нанометрової та субнанометрової роздільної здатності. Теоретично роздільна здатність трансмісійного електронного мікроскопа може досягати 0,002 нм, проте у практичних умовах для біологічних об’єктів вона зазвичай становить

близько 2 нм, що цілком достатньо для вивчення морфології вірусів. ТЕМ є одним із найефективніших методів візуалізації ультраструктури вірусних частинок, а саме бактеріофагів.

Основними конструктивними елементами просвічувального електронного мікроскопа є електронна гармата (джерело електронів), системи магнітоелектричних лінз, вакуумна камера та система візуалізації. Потік електронів формується за допомогою катодної нитки за рахунок явища термоелектронної емісії та прискорюються високою напругою. Конденсорні лінзи формують паралельний електронний пучок, який проходить крізь підготовлений зразок, розташований на опорній сітці з плівкою. Більш щільні ділянки зразка сильніше розсіюють електрони, створюючи контрастне зображення. Візуалізація зображення здійснюється на моніторі.

Відбір та підготовка зразків до електронно-мікроскопічного дослідження включає наступні етапи. Готують плівки-підкладки на які наносять зразок, товщиною приблизно 0,02 – 0,05 мкм, виготовляються з формвару, Для забезпечення механічної стійкості використовують металеві сітки, що слугують опорою під час експонування зразка електронному пучку.

При виготовленні плівок із колодію використовували наступну методику. На поверхню води в чашці Петрі наносили краплю 1% розчину колодію в амілацетаті. Після випаровування розчинника утворювалася тонка плівка, яка залишалася на поверхні води. На цю плівку за допомогою пінцета обережно викладали металеві сітки з інтервалом приблизно 1,5–2 мм. Плівка має знаходитись під сітками. Далі сітки разом із плівкою переносили на фільтрувальний папір для подальшої сушки. Щоб уникнути забруднення, готові сітки з плівками зберігали в закритих чашках Петрі.

Наступний етап передбачає нанесення вірусного препарату. На підготовлену сітку з плівкою наносили краплю суспензії бактеріофагів. Через 1 хвилину надлишок рідини видаляли фільтрувальним папером, уникаючи повного висихання поверхні. Важливо, щоб вірусні часточки встигли

адсорбуватися до підкладки до моменту видалення рідини. Після цього проводили контрастування зразка.

Чітка візуалізація морфологічних особливостей фагових частинок здійснюється методом негативного контрастування. Суть методу полягає в обробці зразка електронно-щільними речовинами - солями важких металів, що утворюють темне тло навколо вірусних частинок, де віруси виглядають світлими на його фоні. Як контрастуючі агенти використовували натрієву сіль фосфорно-вольфрамової кислоти.

У дослідженні використовували трансмісійний електронний мікроскоп JEM-1230, який забезпечує високу роздільну здатність до 0,2 нм, дозволяє працювати в широкому діапазоні збільшення — від 20× до 600 000×. Мікроскоп обладнаний енергодисперсійним рентгенівським спектрометром Oxford X MAX-80T для елементного аналізу досліджуваних зразків, а також цифровою фотокамерою, що дає змогу зберігати отримані зображення у цифровому форматі. Дослідження проводилися на базі Центру колективного користування електронними мікроскопами Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

2.6. Спектр літичної активності бактеріофагів

Для оцінки біологічної активності бактеріофага було проведено дослідження спектру літичної дії щодо різних штамів фітопатогенних бактерій. Спектр літичної активності визначає чутливі бактерії, до яких фаг виявляє специфічність і здатен до продуктивної інфекції. Це ключовий параметр оцінки потенціалу фага для біоконтролю.

У дослідженні було використано 10 бактеріальних культур, серед яких є як представники антарктичних так і українські штами. Зразки бактерії були люб’язно надані відділом фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та

вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України та Науково-дослідною лабораторією фармакології і експериментальної патології навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини».

Для встановлення спектру літичної активності було використано метод подвійного агару. Бактеріальні культури вносили до розплавного 1,5% агару в кількості 500 мкл, розподіляючи суспензію по всій поверхні чашки для утворення рівномірного бактеріального газону. Після цього фагову суспензію з титром 10^6 БОУ/мл вносили до розплавленого і охолодженого до 45°С 0,7% агару, в кількості 200 мкл, а потім рівномірно нашаровували на вже застиглий бактеріальний газон. Інкубацію проводили 18 - 24 годин за температури 25°С. Наявність чутливої пар фан - бактерія визначалась наявністю зон лізису відносно досліджуваних культур.

Для достовірної оцінки спектру літичної активності кожен тест було проведено в трикратному повторі для підтвердження у випадках, коли спостерігалося часткова прозорість або поодинокі негативні колонії. Також було враховано тип лізису: повний або неповний, що може вказувати на тип репродукції бактеріофага літичний чи помірний.

Дані було зведено в таблицю з подальшим порівнянням чутливості бактеріальних штамів до досліджуваного бактеріофага.

2.7. Електрофорез продуктів виділення ДНК

Електрофорез в агарозному гелі - лабораторний метод, який використовується для аналізу нуклеїнових кислот. Метод базується на міграції негативно заряджених молекул ДНК крізь агарозну матрицю під дією електричного струму до позитивного електрода, оскільки ДНК має негативний заряд за фізіологічного pH. Швидкість міграції залежить від розміру фрагментів. Менші молекули проходять крізь пори гелю швидше,

ніж більші, що забезпечує ефективне розділення, ідентифікацію й очищення фрагментів виділеної ДНК.

Для виділення геномної ДНК використовували комерційний набір GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), згідно з протоколом виробника. Зразки бактеріальних клітин (1 - 3 мл нічної культури) збирали центрифугуванням при 5000 × g протягом 10 хвилин. Осад клітин ресуспензували в 180 мкл буфера для лізису. Далі додавали 20 мкл протеїнази K та інкубували суміш при 56 °C протягом 30 хвилин для повного лізису клітин.

Після лізису до зразка додавали 200 мкл буфера для зв'язування та ретельно змішували. Отриману суміш переміщували в колонку зі спін-фільтром, встановлену в збірну пробірку, та центрифугували при 6000 × g протягом 1 хвилини. Колонку промивали двома різними буферами для промивання, передбаченими в наборі, з подальшим центрифугуванням для видалення залишків етанолу. Після фінального центрифугування колонку переміщували в чисту стерильну пробірку та додавали 50 - 100 мкл елюючого буфера (TE або стерильної деіонізованої води), інкубували 2 хвилини при кімнатній температурі та центрифугували для отримання очищеної ДНК. Концентрацію та ступінь очищення ДНК визначали за допомогою спектрофотометрії (наприклад, NanoDrop). Отримані зразки геномної ДНК аналізувалися методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі.

Для приготування 1,5% агарозного гелю 300 мг агарози розчиняли в 20 мл 0,089 М TBE-буферу. Суміш нагрівали в мікрохвильовій печі до повного розчинення агарози (приблизно 1 - 2 хвилини), після чого охолоджували до температури 50 °C. До розчину додавали 15 мкл розчину бромистого етидію (0,5 мг/мл), ретельно перемішували та заливали у планшет з гребінкою. Після полімеризації (10 хвилин при кімнатній температурі) гель переміщували в електрофоретичну камеру та заливали

TBE-буфером, щоб над гелем утворився шар буфера товщиною приблизно 1 см.

У сформовані лунки додавали по 5 мкл зразків ДНК, змішаних із завантажувальним буфером. Як маркер молекулярної маси використовували стандартний ДНК-маркер. Електрофорез проводили при напрузі 15 В/см протягом 20 хвилин. Візуалізацію результатів здійснювали за допомогою ультрафіолетового трансилюмінатора, документуючи зображення за допомогою фотосистеми.

2.8. Методи статистичної обробки отриманих експериментальних даних

Отримані фотографії морфології негативних колоній та знімки електронної мікроскопії були оброблені із застосуванням базової описової статистики. До кожного параметра: довжина хвостового відростка, діаметр капсиду, розмір негативних колоній, тощо було обчислено середнє значення, стандартне відхилення, мінімальні та максимальні значення.

Анотацію геному бактеріофага проводили з використанням онлайн ресурсу Prokka, що дозволяє здійснювати швидке автоматизоване позначення генів у геномах. Попередньо було завантажено продукт секвенування, послідовність у форматі FASTA. Для виявлення можливих генів антибіотикорезистентності було використано Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) та інструмент Resistance Gene Identifier (RGI). В аналіз було виконано Loose Hits, через еволюційну віддаленість геному бактеріофага на відміну від вже відомих клінічних штамів.

Для визначення таксономічного положення та філогенетичних зв’язків бактеріофага було проведено порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей великої субодиниці термінази (TerL) консервативного гена,

що широко застосовується як маркер для класифікації фагів порядку *Caudoviricetes.*

З відкритої бази даних NCBI GenBank було підібрано 15 референтних амінокислотних послідовностей TerL, що відносяться до представників родини *Autographiviridae*. У вибірку було включено ізоляти виділені з різних географічних регіонів світу, а також специфічні антарктичні фаги для оцінки регіональної спорідненості. Множинне вирівнювання послідовностей проводили за допомогою алгоритму ClustalW та MUSCLE, в програмному забезпеченні MEGA 7.

Для визначення кількісної оцінки ступеня ідентичності послідовностей та візуалізації розбіжностей між досліджуваними послідовностями було використано програмне забезпечення Sequence Demarcation Tool (SDT) v1.3. та Excel 2024. Результати було представлено у вигляді кольорового спектру для теплової карти, де градієнт відображав ступінь гомології між 16-ма досліджуваними амінокислотними послідовностями. Розрахунок проводили з використанням параметрів за замовчуванням, що дозволило чітко детермінувати межі між родами в межах родини *Autographiviridae*.

Філогенетичний аналіз здійснювали методом Maximum Likelihood. Вибір оптимальної моделі заміщення амінокислот проводили на основі найменшого значення інформаційного критерію Байєса (BIC). Статистичну достовірність топології дерева було підтверджено за допомогою бутстреп-аналізу з проведенням 500-та ітерацій. Візуалізація філогенетичного дерева була здійснена у програмному забезпеченні MEGA 7.

Отримані дані представлені у вигляді таблиць, діаграм та зображень, що дозволяє комплексно оцінити ефективність та специфічність Антарктичного бактеріофага у взаємодії з фітопатогенними бактеріями різних континентів.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Комплексна характеристика бактеріофагів, виділених з антарктичного ґрунту прибережжя

Під час проведення сезонних досліджень на архіпелазі Аргентинських островів, на Українській антарктичній станції "Академік Вернадський" у 2022 році, було відібрано зразки рослин та ґрунту з прибережжя.

У загалом до України було привезено 33 зразки з антарктичного регіону, з них 28 у вигляді сухої суміші були об’єднані в один інтегрований зразок та 5 зразків вологого ґрунту: WT23 від 17.03.22, T24 V. від 23.03.22 (1), T24 V. від 23.03.22 (2), WT24 від 17.03.22 та T24 V. від 28.03.22.

З всіх 33-ох зразків було виділено 8 ізолятів фагів (табл. 3.1), з яких для подальшого дослідження було обрано WT23.

Таблиця 3.1

Результати пошуку чутливих пар “фаг-бактерія” зі зразків отриманих з антарктичної експедиції у 2022 року

Зразки з Антарктиди / Індикаторні культури	Суха суміш	WT23 17.03. 2022	T24 V. 23.03. 2022	T24 V. 23.03. 2022	WT24 17.03. 2022	T24 V. 28.03. 2022
АБ2	-	+	+	-	-	-

«Продовження таблиці 3.1»

Bacillus subtilis 5	-	+	-	-	-	-
Bacillus subtilis 6	-	-	-	+	-	-
Cq13	+	-	-	-	-	-
863	-	-	+	-	-	-
P. savastanoi pv. phaseolicola 4013	-	-	-	+	-	-
Serratia marcescens	-	-	-	-	-	+
Pseudomonas fluorescens 8573	-	+	-	-	-	-

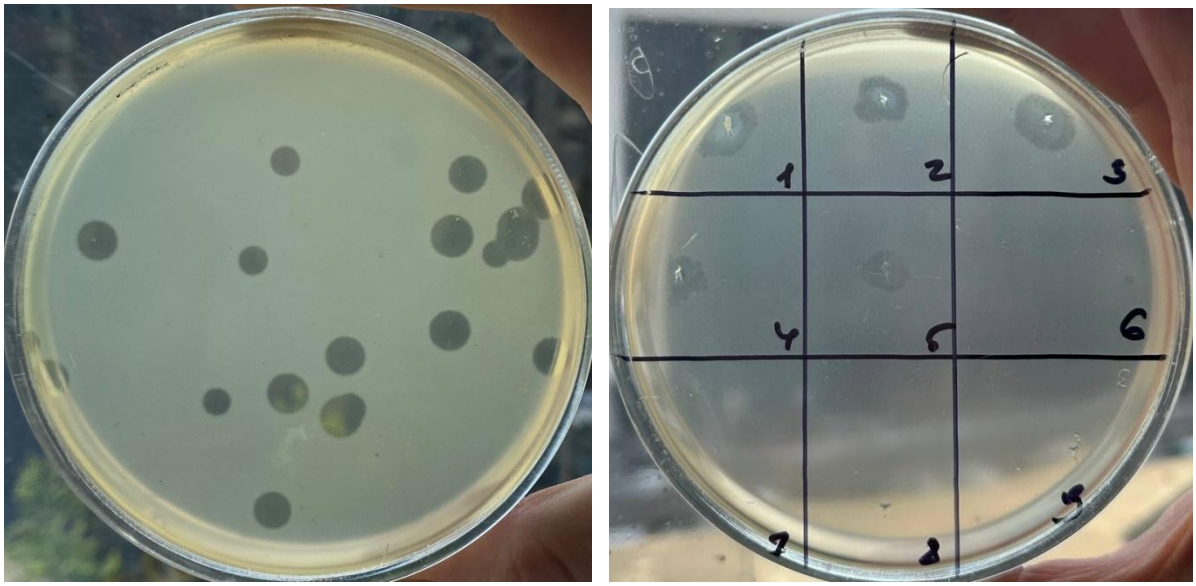
Для пошуку чутливої пари «фаг-бактерія» на бактеріальних штамах. Було зроблено прямий висів на бактеріальний газон отриманих фаголізатів за методом двошарового агару для отримання негативних колоній бактеріофага на чутливому бактеріальному штамі та подальшого пасування фага. За отриманими результатом, з'ясовано, що бактеріофаг отриманий зі зразку WT23 виявився чутливим до українського штаму бактерії *Pseudomonas fluorescens* 8573.

Наявність негативних колонії бактеріофага фіксувалася після 24-ох годин інкубації за наявністю характерних прозорих бляшок, які мали діаметр

0,5 ± 0,02 мм. Літичну активність досліджуваного бактеріофага визначали методом spot-test по утворенню зон лізису у місцях нанесення зразку. Крім того, досліджено можливість фага реплікуватись всередині хазяя з подальшою оцінкою негативних колоній, оскільки наявність зон лізису за результатами spot-test не підтверджують літичний цикл репродукції та продуктивний інфекційний процес.

З огляду на морфологію утворених негативних колоній (Рис. 3.1), прозорі бляшки з ореолом, бактеріофагу притаманний літичний цикл розвитку, що підтверджує, що фаг є вірулентним та не вступає в літичний цикл, а відразу викликає загибель чутливої бактерії.

Відповідно до методу титрування за Граціа, титр фага, чутливого до *Pseudomonas fluorescens* 8573, становив 3×10^7 БУО/мл. Після накопичення ізоляту та проведення титрування методом spot-test титр фага досягав 10^8.



а *б*

Рис. 3.1. Морфологія негативних колоній фагів на індикаторній бактерії *Pseudomonas fluorescens* 8573: а) результати титрування за Граціа; б) результати титрування методом spot-test.

За отриманими результатами трансмісійної електронної мікроскопії, проведеної для ізоляту бактеріофага чутливого до *Pseudomonas fluorescens* 8573, з'ясовано, що капсид має характерний ікосаедричний тип симетрії з діаметром приблизно 56 ± 1 нм. Крім того, фаг має короткий хвостовий відросток, довжина якого становить близько 14 ± 3 нм (Рис. 3.2)

Морфологічні характеристики дозволяють віднести даний бактеріофаг до представників подоподібних вірусів, для яких характерна наявність саме короткого, нескорочувального хвостового відростку та ікосаедрична будова капсиду. Це підтверджує, що бактерії роду *Pseudomonas*, є типовими хазяями для бактеріофагів, які належать до подоподібних бактеріофагів.

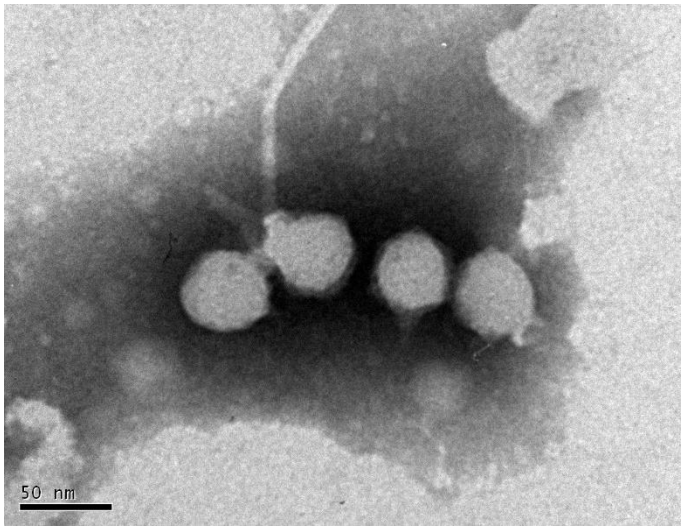


Рис. 3.2. Трансмісивна електронна мікроскопія бактеріофага 8573.

Для визначення спектра літичної активності бактеріофага чутливого до *Pseudomonas fluorescens* 8573 було висіяно на бактеріальний газон десяти різних штамів, таких як: *Pseudomonas* sp. 863/1, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae*, а також *Bacillus subtilis* (штами 5 та 6), *Serratia marcescens* sp., ізолят Cq13, *Clavibacter michiganensis* і антарктичний ізолят АБ3. Бактерії відрізняються за грам-реакцією, систематичним положенням, екологічною нішею,

патогенністю та географічним походженням. Зразки були протестовані за допомогою методу краплинної інокуляції для виявлення зон лізису та оцінки ступеня чутливості (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Спектр літичної активності бактеріофага 8573

Індикаторні культури	**Ізолят 8573**
Pseudomonas sp. 863/1	-
Bacillus subtilis 6	-
Cq13	-
АБ3	-
Bacillus subtilis 5	+
P. savastanoi pv. phaseolicola	-
Serratia marcescens sp.	-
Pseudomonas syringae	-
Clavibacter michiganensis	-
Pseudomonas fluorescens	+

Бактеріофаг проявляє літичну активність, щодо двох індикаторних культур: *Pseudomonas fluorescens* 8573 та *Bacillus subtilis* 5. До решти протестованих штамів літична активність відсутня.

Фаги родини *Autographiviridae* (які раніше належали до підродини *Autographivirinae* яка входила у склад роду *Podoviridae*) вважаються вузькоспеціалізованими вірусами, що чутливі до грамнегативних бактерій, для яких типовим хазяєм є бактерії *Pseudomonas*. Однак дослідження мікробіоценозів екстремальних середовищ, Антарктиди зокрема, виявили унікальну будову рецептор-зв'язуючих білків (RBPs) на дистальних частинах коротких хвостів T7 фагів, що асоційовані з ферментами деполімеразами, які розщеплюють екзополісахариди (EPS), що входять до складу захисної капсули бактерій. Оскільки, більшість антарктичних бактерій, незалежно від будови поверхневого апарату, продукують подібні кріопротекторні цукри для захисту від холоду, антарктичні бактеріофаги родини *Autographiviridae* можуть використовувати дані полісахариди як первинні рецептори [19].

3.2. Основні характеристики геному бактеріофага

За попередньо продуманою схемою було проведено електрофорез для візуалізації успішного виділення продуктів ДНК кітом Thermo Scientific. Процедура електрофорезу виконувалася з метою підтвердження якості та цілісності виділених зразків ДНК.

За результатами анотації отриманими з продуктів секвенування встановлено, що геном бактеріофага чутливого до *Pseudomonas fluorescens* 8573 представлений кільцевою дволанцюговою ДНК (dsDNA) із загальною довжиною 40 310 bp (Рис. 3.3).

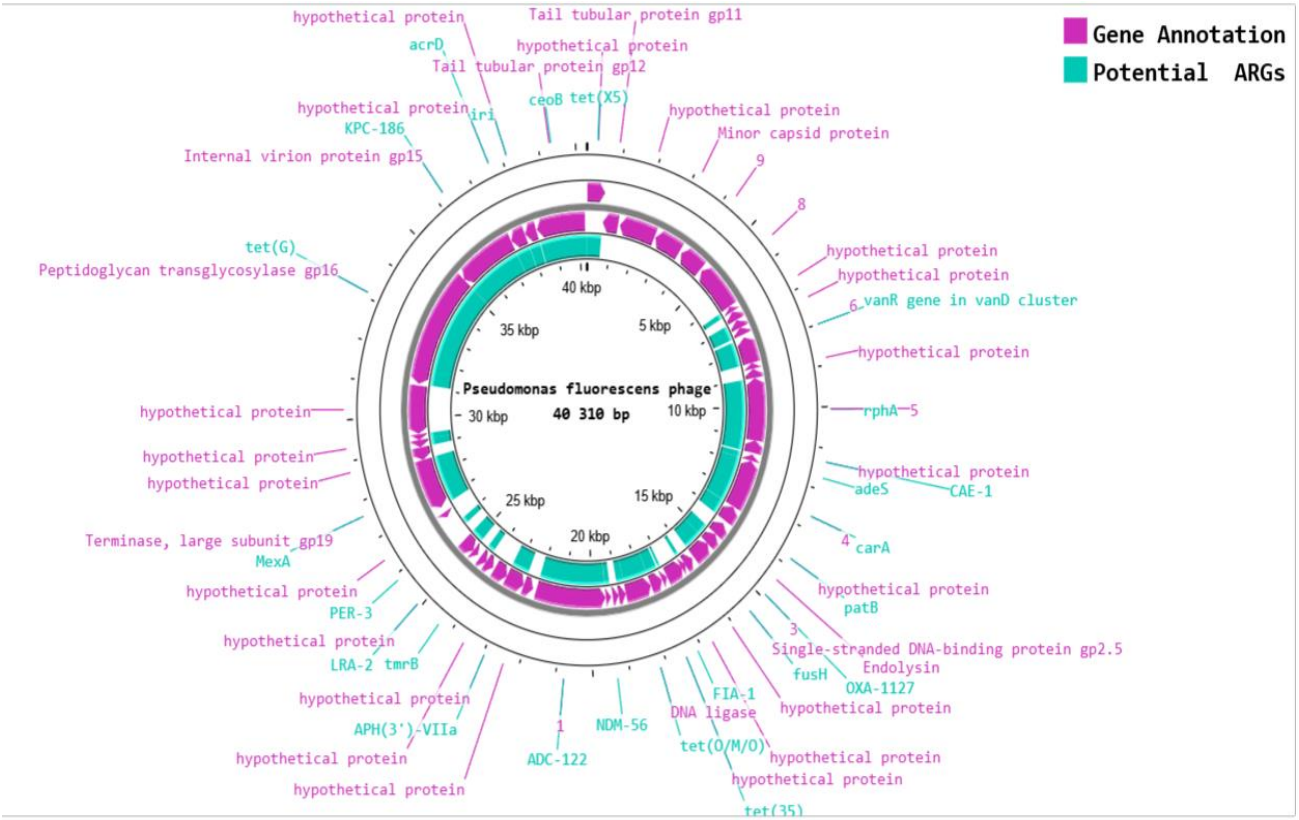


Рис. 3.3. Характеристика генетичної організації бактеріофага 8573.

За результатами анотації було ідентифіковано такі функціональні гени до яких належать структурні білки: Tail tubular protein (gp11, gp12), Minor capsid protein, Internal virion protein (gp15); ферменти лізису клітини-хазяїна: Endolysin, Peptidoglycan transglycosylase (gp16); ферменти реплікації: Single-stranded DNA-binding protein (gp2.5), DNA ligase; упаковка ДНК: Terminase, small and large subunits (gp18, gp19) (Таблиця 3.3).

Таблиця 3.3

Функціональні гени бактеріофага 8573

Функції	**Ген**	**Нитка ДНК**	**Старт-позиція (bp)**	**Стоп-позиція (bp)**	**Довжина (bp)**	**Розмір амінокислотних залишків**	**Функція**
Структурні гени	Tail tubular protein (gp11)	-	587	1,174	588	175	Структура хвостового відростка
	Tail tubular protein (gp12)	-	38,386	40,227	1,842	556	Деполімераза/ хвостової нитки (адсорбція)
	Minor capsid protein	-	2,656	3,681	1,026	345	Будова капсиду
	Internal virion protein (gp15)	-	35,127	37,340	2,214	556	Стрижень хвоста/ внутрішній білок

«Продовження таблиці 3.3»

Функція упаковки	Terminase, small subunit (gp18)	-	28,952	29,209	258	85	Мала субодиниця термінази
	Terminase, large subunit (gp19)	-	26,758	28,518	1,761	553	Велика субодиниця термінази
Функція лізису	Endolysin	-	14,202	14,663	462	136	Лізис
	Peptidoglycan transglycosylase (gp16)	-	31,128	35,123	3,996	1023	Деградація пептидоглікану.
Реплікація та метаболізм ДНК	Single-stranded DNA-binding protein (gp2.5)	-	15,110	15,805	696	221	Зв’язування одноланцюгової ДНК
	DNA ligase	-	17,692	18,675	984	232	COOH-NH2 лігаза

Наявність гену повноцінної деполімерази (gp12) у структурі хвостового апарату є прямим доказом того, що цей фаг еволюційно пристосований до інфікування бактерії з потужними захисними оболонками [41], характерними для грампозитивної флори антарктичних ґрунтів, тому це пояснює наявність негативних колоній на індикаторній бактерії *Bacillus subtilis 5*.

На генетичній карті карті (Рис. 3.3) можна відмітити наявність генетичної структури fusion protein 5.5/5.7, який розташований між генами DNA ligase та Single-stranded DNA-binding protein gp2.5, що являється прикладом гібридного білка, який може виникати внаслідок генетичної рекомбінації або злиття сусідніх генів. Такі злиті білки можуть мати комбіновані функції. У даному випадку fusion protein 5.5/5.7 може відповідати за функції пов’язані з реплікацією ДНК, оскільки розташований поруч із відповідними генами. Це може вказувати на еволюційну адаптацію геному бактеріофагу до більш ефективної координації реплікаційних процесів.

Генетична мапа (Рис. 3.3) містить численні "hypothetical protein", які рівномірно розподілені по геному, це може вказувати на те, що значна частка генів кодує білки, функції яких ще не досліджено. Такі білки можуть відповідати за нові функції, які ще не описані в базах даних. Hypothetical protein, які розташовані біля функціональних генів, такими як Tail tubular protein (gp11, gp12), Minor capsid protein, Terminase (gp19), що може свідчити про допоміжну роль у структурних або регуляторних функціях.

Підчас аналізу геному бактеріофага чутливого до *Pseudomonas fluorescens* 8573 за допомогою бази даних CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) було включено Loose Hits, що має критичне значення для зразків з Антарктиди. Оскільки гени еволюціонували ізольовано, тому можуть суттєво відрізнятися від можуть суттєво дивергувати від «клінічних» прототипів, наявних у сучасних базах даних. Аналіз за допомогою RGI Job Include Loose Hits (Рис. 3.3), що геном

бактеріофага можливо містить детермінанти стійкості до широкого спектру антимікробних препаратів (acrD, arr-4, vanR, vanW, ades, fusH, FIA-1, ADC-122, тощо). Зокрема, знайдено послідовності, що асоційовані з резистентністю до: ванкоміцину, рифампіцинів, фузидової кислоти, фторхінолонів, бета-лактамів (Табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Аналіз генів антибіотикорезистентності в геномі бактеріофага 8573 за допомогою бази даних CARD

Продукт гену	Тип антибіотика	Механізм дії
tet(6)	Тетрациклін	Ефлюкс
tet(O/M)	Тетрациклін	Захист рибосом
tet(31S)	Тетрациклін	Ефлюкс
arr-4	Рифампіцин	ADP-рибозилювання
APH(3')-VIIA	Аміноглікозиди	Інактивація (фосфорилювання)
vanR (vanD cluster)	Ванкоміцин	Модифікація пептидоглікану
vanW (vanI cluster)	Ванкоміцин	Модифікація пептидоглікану
catA	Хлорамфенікол	Інактивація (ацетилювання)
patB	Фторхінолони	Ефлюкс
ADC-122	Цефалоспорини	Гідроліз (цефалоспориназа)
NDM-34	Карбапенеми	Гідроліз(металобеталактамаза)

«Продовження таблиці 3.4»

FIA-1	Фосфоміцин	Інактивація антибіотика
MYO-1	Фосфоміцин	Інактивація антибіотика
FUSH	Фосфоміцин	Інактивація антибіотика

Наявність "Loose Hits", що відповідає менш достовірним збігам може свідчити про ймовірне, спільне філогенетичне походження з вже відомими механізмами резистентності, які не мають відомих наближених гомологів у відкритих базах даних. Це може свідчити про наявність еволюційної дивергенції генів стійкості, що можуть мати спільне коріння з вже добре вивченими механізмами стійкості, але крізь мільйони років ізоляції в екстремальних умовах могли набути унікальної структури або їхньої унікальності для геному даного бактеріофага.

Бактеріофаг, отриманий з ґрунту Антарктиди, може містить гени антибіотикорезистентності, які, ймовірно, походять від резистентності бактерій до антибіотикоподібних сполук, що продукуються іншими мікроорганізмами для підтримки конкуренції в екосистемі [23]. Дані гени могли поширюватись від бактерії-хазяя до бактеріофагу завдяки горизонтальному переносу, що свідчить про складні екологічні взаємодії в ізольованих екосистемах.

3.3. Філогенетичний аналіз зв'язків бактеріофага

Для встановлення точного таксономічного положення бактеріофага в рамках сучасної класифікації ICTV вимагає комплексного підходу, що ґрунтується на порівняльному аналізі окремих консервативних генетичних

маркерів. Для ізоляту фагу чутливого до , знайденого в зразках ґрунту Аргентинських островів, проведення філогенетичного аналізу ускладнюється значною еволюційною дивергенцією та мозаїчним геномом, що є характерним для вірусів, які існують в тривалій географічній ізоляції.

Методичною особливістю даного етапу роботи став перехід від аналізу нуклеотидних послідовностей до амінокислотних. Дане рішення прийнято для мінімізації впливу «інформаційного шуму», який спричинено високою частотою синонімічних замін нуклеотидів у геномах бактеріофагів. Використання амінокислотних послідовностей дозволяє нівелювати варіативність стартових кодонів (зокрема, альтернативний кодон GTG для досліджуваного фага) та уникнути пов'язаних із зсувом рамки зчитування помилок вирівнювання, що спотворює топологію філогенетичного дерева при роботі з геномами.

Основним маркером у даному філогенетичному аналізу було обрано ген, що кодує велику субодиницю термінази (TerL). Ген, що кодує даний білок є одним із найбільш консервативних характерним для порядку *Caudoviricetes*, оскільки має критично важливу функцію упаковки ДНК у капсид і має відносно стабільну еволюційну траєкторію порівняно зі структурними білками хвоста або деполімеразами [42].

Для побудови репрезентативної філогенетичного дерева було сформовано вибірку, що включає референтні ізоляти відібрані з офіційної бази даних ICTV. До аналізу було залучено представників ключових таксонів, найбільш споріднених із фагами фітопатогенних бактерій, зокрема це представники таких родів, як *Pifdecavirus*, *Unosvirus* та *Troedvirus*. Застосування методу матриць ідентичності (SDT-аналіз) у поєднанні з побудовою філогенетичного дерева дозволило не лише визначити таксономічну приналежність бактеріофага чутливого до *Pseudomonas fluorescens* 8573, а й провести оцінку ступеню його унікальності порівняно з раніше вже описаними антарктичними та європейськими ізолятами.

Для проведення всебічного аналізу та дослідження філогенетичних зв'язків досліджуваного антарктичного ізоляту, до вибірки було залучено амінокислотні послідовності великої субодиниці термінази (TerL) бактеріофагів, виділених у різних географічних регіонах та середовищах по всій земній кулі. Такий підхід дозволяє порівняти унікальний генетичний код бактеріофага Ukraine1_2 із глобальною популяційною структурою порядку *Caudoviricetes*.

Однією важливою умовою для проведення філогенетичного аналізу було обмеження вибірки послідовностей виключно представниками родини *Autographiviridae*. Такий підхід було обрано для забезпечення коректного вирівнювання послідовностей, оскільки продукти білків в межах однієї родини зберігають спільну доменну архітектуру, що мінімізує ризик хибних зіставлень.

Візуалізація отриманих результатів попарного порівняння амінокислотних послідовностей великої субодиниці термінази (TerL) представлена у форматі теплової карти, отриманої за допомоги Sequence Demarcation Tool (SDT) v1.3 (Рис. 3.4).

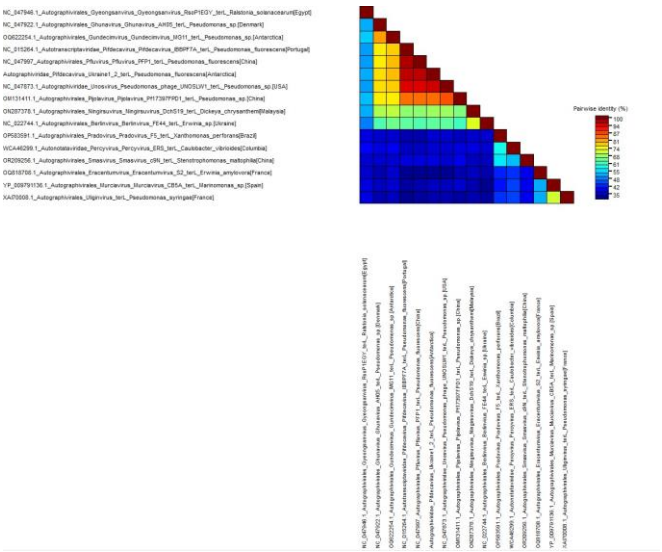


Рис. 3.4. Теплова карта попарної ідентичності амінокислоних послідовностей великої субодиниці термінази бактеріофагів родини *Autographiviridae*. Виконана в прогамі SDT v1.3.

Дана модель відображає матрицю ідентичності (Pairwise identity), де кожна клітинка на перетині осей відповідає кількісному показнику гомології між двома ізолятами. Колірне кодування карти базується на градієнтній шкалі, де сині відтінки відповідають низькому рівню подібності (менше 30%), а червоний колір вказує на високу консервативність послідовностей (понад 90%).

Отримана теплова карта, демонструє чітку диференціацію кластерів спорідненості. У центральній частині матриці спостерігається формування стабільного домену, який об'єднує *Pifdecavirus*, *Pfluvirus*, *Unosvirus* та *Pijolavirus*. Внутрішня ідентичність у групі становить 87–94%, що слугує доказом високої консервативності механізмів пакування ДНК у бактеріофагів. Досліджуваний ізолят належить кластеру та демонструє високий рівень подібності з представниками роду *Pifdecavirus*.

Аналіз теплової матриці отриманий за допомоги Excel дозволяє деталізувати ці спостереження конкретними показниками гомології (Рис. 3.5).

Autographiviridae_Pifdecavirus_Ukraine1_2_terL_Pseudomonas_fluorescens(Antarctica)																				
NC_047873.1_Autographiviridae_Unosvirus_Pseudomonas_phage_UNO-SLW1_terL_Pseudomonas_sp.(USA)	0,043																			
NC_015264.1_Autotranscriptaviridae_Pifdecavirus_Pifdecavirus_IBBPF7A_terL_Pseudomonas_fluorescens(Portugal)	0,036	0,047																		
OM131411.1_Autographivirales_Pijolavirus_Pijolavirus_Pf17397FPD1_terL_Pseudomonas_sp.(China)	0,125	0,118	0,129																	
ON287378.1_Autographivirales_Ningirsuvirus_Ningirsuvirus_DchS19_terL_Dickeya_chrysanthemi(Malaysia)	0,294	0,298	0,298	0,303																
NC_047922.1_Autographivirales_Ghunavirus_Ghunavirus_AH05_terL_Pseudomonas_sp.(Denmark)	0,219	0,212	0,221	0,221	0,277															
NC_047997_Autographivirales_Pfluvirus_Pfluvirus_PFP1_terL_Pseudomonas_fluorescens(China)	0,034	0,052	0,026	0,124	0,296	0,223														
OQ822254.1_Autographivirales_Gundecimvirus_Gundecimvirus_MG11_terL_Pseudomonas_sp.(Antarctica)	0,204	0,206	0,212	0,225	0,287	0,184	0,210													
OP583591.1_Autographivirales_Pradovirus_Pradovirus_F5_terL_Xanthomonas_perforans(Brazil)	0,667	0,665	0,670	0,665	0,676	0,665	0,672	0,667												
OQ818708.1_Autographivirales_Eracenturnvirus_Eracenturnvirus_S2_terL_Erwinia_amylovora(France)	0,680	0,682	0,680	0,670	0,650	0,659	0,678	0,650	0,609											
NC_022744.1_Autographivirales_Berlinvirus_Berlinvirus_FE44_terL_Erwinia_sp.(Ukraine)	0,343	0,346	0,345	0,369	0,258	0,350	0,345	0,333	0,670	0,669										
NC_047946.1_Autographivirales_Gyeongsanvirus_Gyeongsanvirus_RsoP1EGY_terL_Ralstonia_solanacearum(Egypt)	0,474	0,478	0,481	0,463	0,479	0,483	0,478	0,463	0,650	0,654	0,511									
OR209256.1_Autographivirales_Smasvirus_Smasvirus_c9N_terL_Stenotrophomonas_maltophilia(China)	0,655	0,657	0,657	0,652	0,667	0,654	0,661	0,652	0,429	0,627	0,674	0,650								
WCA46299.1_Autonotataviridae_Percyvirus_Percyvirus_ERS_terL_Caulobacter_vibrioides(Columbia)	0,667	0,663	0,667	0,648	0,655	0,648	0,665	0,650	0,410	0,584	0,669	0,627	0,466							
YP_009791136.1_Autographivirales_Murciavirus_Murciavirus_CB5A_terL_Marinomonas_sp.(Spain)	0,657	0,659	0,665	0,655	0,663	0,650	0,661	0,654	0,607	0,455	0,667	0,629	0,622	0,582						
XAI70008.1_Autographivirales_Uliginvirus_terL_Pseudomonas_syringae(France)	0,661	0,667	0,669	0,663	0,659	0,663	0,663	0,661	0,581	0,457	0,676	0,639	0,609	0,566	0,258					

Рис. 3.5. Матриця генетичних дистанцій між бактеріофагами родини *Autographiviridae* на основі послідовностей гена terL. Виконана в прогамі Excel 2024.

Для бактеріофагу Ukraine1_2 зафіксовано низькі значення генетичних дистанцій із найближчими представниками *Pifdecavirus*, з типовими

представниками родини: з *Unosvirus* (NC_047873.1) - 94,8 - 95,5%, з португальським *Pifdecavirus* (NC_015264.1) - 96,0 - 97,4%, а з китайським *Pfluvirus* (NC_047997.1) - 94,8 - 96,0%, що відповідає високому рівню спорідненості.

Водночас матриця підтверджує наявність спорідненості з антарктичним фагом *Gundecimvirus* MG11 (OQ622254.1), з ідентичністю 20,4%. Це значення перевищує показники гомології з позарегіональними ізолятами, що дозволяє ідентифікувати бактеріофаг Ukraine1_2 як частину унікального антарктичного філогенетичного вузла.

Отримані данні теплових матриць дозволяє зробити висновок про свідчать про чітку приналежність бактеріофага Ukraine1_2 до роду *Pifdecavirus* та його високу спорідненість в межах спільного кластеру та значну віддаленість від інших родів, що входять до родини *Autographiviridae*.

Філогенетичний аналіз, проведений на основі амінокислотної послідовності гена великої субодиниці термінази (TerL), демонструє приналежність досліджуваного бактеріофагу Ukraine1_2 до родини *Autographiviridae* та формує спільний кластер з бактеріофагами роду *Pifdecavirus* (Рис. 3.6).

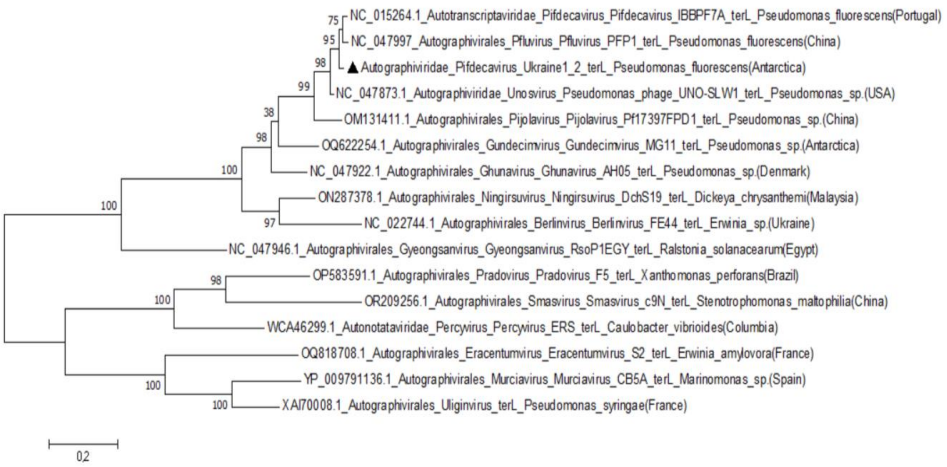


Рис. 3.6. Філогенетичне дерево бактеріофагів родини *Autographiviridae*, побудоване за амінокислотними послідовностями гена великої субодиниці термінази. Виконана в програмі MEGA 7.0.

На філогенетичному дереві досліджуваний ізолят формує окрему спільну гілку разом із близькоспорідненими фагами, що інфікують *Pseudomonas fluorescens*.

Високі значення bootstrap-підтримки (95–99) також свідчать про надійність сформованого кластера та підтверджують спільне еволюційне походження цих вірусів. Отриманий результат засвідчує те, що досліджуваний бактеріофаг має тісні філогенетичні зв'язки з представниками роду *Pifdecavirus*, що асоційовані із бактеріями *Pseudomonas*.

Варто зазначити, що до спорідненості фага MG11 також знайденого на антарктичному півострові, який належить до роду *Gundecimvirus*, що може свідчити про циркуляцію генетичних варіантів у полярних екосистемах та екологічну пластичність цієї групи вірусів.

Віддалені філогенетичні зв'язки встановлено з представниками інших родів *Ghnavirus*, *Ningirsuvirus*, *Berlinvirus* та *Gyeongsanvirus*, які формують окремий кластер та мають більшу генетичну дистанцію. Ще більш віддаленими є представники родів *Pradovirus*, *Smasvirus*, *Muscavirus*, *Uliginvirus, Percyvirus* та *Eracentumvirus*, що підтверджує їх окремі еволюційні лінії.

ВИСНОВОК

1. Зі 33 зразків ґрунту, відібраних під час Української антарктичної експедиції на станції «Академік Вернадський», вперше було виділено та описано новий ізолят бактеріофага 8573. Морфологічний аналіз з використанням трансмісійної електронної мікроскопії підтвердив наявність фага з коротким хвостовим відростком (розмір: головки 56 ± 1 нм/хвостового відростока 14 ± 3 нм).

2. Перевірено біологічну активність ізоляту фагу 8573 до 10 штамів бактерій. Встановлено, що ізолят фагу проявляє літичну активність лише до *Bacillus subtilis* 5.

3. Встановлено, що бактеріофаг має кільцеву длДНК довжиною 40 310 bp із вираженою адаптацією до інфікування бактерій з додатковими захисними оболонками завдяки гену деполімерази. Особливістю геному є наявність ряду детермінант антибіотикорезистентності, що вказує на інтенсивний горизонтальний перенос генів в екстремальних екосистемах.

4. На основі аналізу консервативного маркера TerL встановлено належність бактеріофага до родини *Autographiviridae* та роду *Pifdecavirus*. Високий рівень гомології з глобальними ізолятами у поєднанні з унікальними регіональними зв'язками підтверджує його еволюційну стабільність та специфічність до бактерій роду *Pseudomonas*

5. Виділений бактеріофаг може бути використаний як у фундаментальних вірусологічних дослідженнях, так і бути перспективним об’єктом для досліджень у галузі еволюції та екології вірусів екстремальних середовищ та потенційного використання у фаготерапії й біотехнології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adriaenssens, E.M., Kramer, R., Van Goethem, M.W., Makhalanyane, T.P., Hogg, I. and Cowan, D.A. (2017). Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics. Microbiome, 5(1). doi:https://doi.org/10.1186/s40168-017-0301-7.
2. Liu, Z., Jiang, W., Kim, C., Peng, X., Fan, C., Wu, Y., Xie, Z. and Peng, F. (2023). A Pseudomonas Lysogenic Bacteriophage Crossing the Antarctic and Arctic, Representing a New Genus of Autographiviridae. International journal of molecular sciences, 24(8), pp.7662–7662. doi:https://doi.org/10.3390/ijms24087662.
3. Ettinger, C.L., Saunders, M., Selbmann, L., Delgado-Baquerizo, M., Donati, C., Albanese, D., Roux, S., Tringe, S., Pennacchio, C., Rio, del, Stajich, J.E. and Coleine, C. (2023). Highly diverse and unknown viruses may enhance Antarctic endoliths' adaptability. 11(1). doi:https://doi.org/10.1186/s40168-023-01554-6.
4. Braga, L.P.P., Spor, A., Kot, W., Breuil, M.-C., Hansen, L.H., Setubal, J.C. and Philippot, L. (2020). Impact of phages on soil bacterial communities and nitrogen availability under different assembly scenarios. Microbiome, 8(1). doi:https://doi.org/10.1186/s40168-020-00822-z.
5. Demina, T.A., Anne-Mari Luhtanen, Roux, S. and Oksanen, H.M. (2022). Virus-Host Interactions and Genetic Diversity of Antarctic Sea Ice Bacteriophages. MBio, 13(3). doi:https://doi.org/10.1128/mbio.00651-22.
6. Coppola, D., Lauritano, C., Zazo, G., Nuzzo, G., Fontana, A., Ianora, A., Costantini, M., Verde, C. and Giordano, D. (2023). Biodiversity of UV-Resistant Bacteria in Antarctic Aquatic Environments. Journal of Marine Science and Engineering, 11(5), pp.968–968. doi:https://doi.org/10.3390/jmse11050968.

7. Acharya, D., Bhardwaj, A. and Kundan Kumar Chaubey (2023). Bacteriophages and lysins: Novel potential antimicrobials. Nucleation and Atmospheric Aerosols. [online] doi:https://doi.org/10.1063/5.0154209.
8. Harada, L.K., Silva, E.C., Campos, W.F., Del Fiol, F.S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V.N. and Balcão, V.M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. Microbiological Research, [online] 212-213, pp.38–58. doi:https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007.
9. Holovan, V. V., Andriichuk, O., & Budzanivska, I. H. (2019). Morphology and biological features of phages extracted from moss and soils of Antarctic region. Ukrainian Antarctic Journal, (1(18), 139-151. https://doi.org/10.33275/1727-7485.1(18).2019.138.
10. Aguirre de Cárcer, D., López-Bueno, A., Alonso-Lobo, J.M., Quesada, A., Alcamí, A. (2016). Metagenomic analysis of lacustrine viral diversity along a latitudinal transect of the Antarctic Peninsula. FEMS Microbiol Ecol., [online] Volume 92(6), pp.50 - 74. Available at: https://doi:10.1093/femsec/fiw074 [Accessed 7 Apr. 2016].
11. Collins, T. and Margesin, R. (2019). Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(7), pp.2857–2871. doi:https://doi.org/10.1007/s00253-019-09659-5.
12. Flaviana Di Lorenzo, Crisafi, F., Violetta La Cono, Yakimov, M.M., Molinaro, A. and Silipo, A. (2020). The Structure of the Lipid A of Gram-Negative Cold-Adapted Bacteria Isolated from Antarctic Environments. Marine Drugs, 18(12), pp.592–592. doi:https://doi.org/10.3390/md18120592.
13. Goordial, J., Davila, A., Lacelle, D., Pollard, W., Marinova, M.M., Greer, C.W., DiRuggiero, J., McKay, C.P. and Whyte, L.G. (2016). Nearing the cold-arid limits of microbial life in permafrost of an upper dry valley,

Antarctica. The ISME Journal, [online] 10(7), pp.1613–1624. doi:https://doi.org/10.1038/ismej.2015.239.

14. Bezuidt, O. K. I., Lebre, P. H., Pierneef, R., León-Sobrino, C., Adriaenssens, E. M., Cowan, D. A., & Makhalanyane, T. P. (2020). Phages Actively Challenge Niche Communities in Antarctic Soils. mSystems, 5(3), e00234-20. https://doi.org/10.1128/mSystems.00234-20.
15. Zrelovs N, Svanberga K, Jansons J, Lamsters K, Karuss J, Krievans M, Fridmanis D, Dislers A, Kazaks A. Isolation and genomic characterization of Psychrobacillus isolate L3 and bacteriophage Spoks: a new phage-host pair from Antarctic soil. BMC Genomics. 2025 Apr 18;26(1):386. doi: 10.1186/s12864-025-11425-z.
16. Gong, Z., Liang, Y., Wang, M., Jiang, Y., Yang, Q., Xia, J., Zhou, X., You, S., Gao, C., Wang, J., He, J., Shao, H., McMinn, A. (2018). Viral Diversity and Its Relationship With Environmental Factors at the Surface and Deep Sea of Prydz Bay, Antarctica. Frontiers in Microbiology, [online] Volume 9, p. 2981. Available at: https:// doi:10.3389/fmicb.2018.029812018 [Accessed 3 Dec. 2018].
17. Piedade GJ, Schön ME, Lood C, Fofanov MV, Wesdorp EM, Biggs TEG, Wu L, Bolhuis H, Fischer MG, Yutin N, Dutilh BE, Brussaard CPD. Seasonal dynamics and diversity of Antarctic marine viruses reveal a novel viral seascape. Nat Commun. 2024 Oct 24;15(1):9192. doi: 10.1038/s41467-024-53317-y.
18. Chuan Zhai, Fraser Kennedy, Yantao Liang, Min Wang, Andrew McMinn. Antarctic Marine Viruses: A Review and Future Perspectives. Ocean-Land-Atmos Res. 2025;4:0101.DOI:10.34133/olar.0101.
19. Demina, T. A., Luhtanen, A.-M., Roux, S., & Oksanen, H. M. (2022). Virus–host interactions and genetic diversity of Antarctic sea ice bacteriophages. mBio, 13(3), e00651-22. https://doi.org/10.1128/mbio.00651-22.

20. Hwengwere K, Paramel Nair H, Hughes KA, Peck LS, Clark MS, Walker CA. Antimicrobial resistance in Antarctica: is it still a pristine environment? Microbiome. 2022 May 6;10(1):71. doi: 10.1186/s40168-022-01250-x. PMID: 35524279; PMCID: PMC9072757.
21. Sun J, Lyons R, Weigh KV, Lieske S, Newsham KK, Hopkins DW, Dennis PG. Putative drivers of maritime Antarctic soil resistomes in the early 21st century: A baseline for monitoring environmental change and human influence. Sci Total Environ. 2026 Feb 1;1014:181361. doi: 10.1016/j.scitotenv.2026.181361. Epub 2026 Jan 9. PMID: 41518728.
22. Marcoleta AE, Arros P, Varas MA, Costa J, Rojas-Salgado J, Berríos-Pastén C, Tapia-Fuentes S, Silva D, Fierro J, Canales N, Chávez FP, Gaete A, González M, Allende ML, Lagos R. The highly diverse Antarctic Peninsula soil microbiota as a source of novel resistance genes. Sci Total Environ. 2022 Mar 1;810:152003. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152003. Epub 2021 Nov 29. PMID: 34856283.
23. Robinson, David et al. “Antarctic lake viromes reveal potential virus associated influences on nutrient cycling in ice-covered lakes.” Frontiers in microbiology vol. 15 1422941. 10 Sep. 2024, doi:10.3389/fmicb.2024.1422941.
24. López-Bueno A, Tamames J, Velázquez D, Moya A, Quesada A, Alcamí A. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. Science. 2009 Nov 6;326(5954):858-61. doi: 10.1126/science.1179287. PMID: 19892985.
25. Holovan V, Andriichuk O, Budzanivska I, Zelena P, Kondratiuk T, Shevchenko O. Bacteriophages and their microbial hosts in terrestrial biotopes of Antarctica. Antarctic Science. 2022;34(2):120-136. doi:10.1017/S0954102021000572.
26. Zablocki O, Adriaenssens EM, Cowan D. Diversity and Ecology of Viruses in Hyperarid Desert Soils. Appl Environ Microbiol. 2015 Nov 20;82(3):770-7. doi: 10.1128/AEM.02651-15. PMID: 26590289; PMCID: PMC4725269.

27. Yau, S. and Seth-Pasricha, M. (2019). Viruses of Polar Aquatic Environments. Viruses, 11(2), p.189. doi:https://doi.org/10.3390/v11020189.
28. da Silva Xavier A, de Almeida JCF, de Melo AG, Rousseau GM, Tremblay DM, de Rezende RR, Moineau S, Alfenas-Zerbini P. 2019. Characterization of CRISPR-Cas systems in the Ralstonia solanacearum species complex. Mol Plant Pathol 20:223–239. https://doi.org/10.1111/mpp.12750.
29. Liu, Zhenyu, Wenhui Jiang, Cholsong Kim, Xiaoya Peng, Cong Fan, Yingliang Wu, Zhixiong Xie, and Fang Peng. 2023. "A Pseudomonas Lysogenic Bacteriophage Crossing the Antarctic and Arctic, Representing a New Genus of Autographiviridae" International Journal of Molecular Sciences 24, no. 8: 7662. https://doi.org/10.3390/ijms24087662.
30. Hwang Y, Rahlff J, Schulze-Makuch D, Schloter M, Probst AJ. 2021. Diverse viruses carrying genes for microbial extremotolerance in the Atacama Desert hyperarid soil. mSystems 6:e00385-21. https://doi.org/10.1128/mSystems.00385-21.
31. Boeckman, Justin & Korn, Abby & Yao, Guichun & Ravindran, Aravind & Gonzalez, Carlos & Gill, Jason. (2022). Sheep in wolves' clothing: Temperate T7-like bacteriophages and the origins of the Autographiviridae. Virology. 568. 10.1016/j.virol.2022.01.013.
32. Wei, S.T.S., Lacap-Bugler, D.C., Lau, M.C.Y., Caruso, T., Rao, S., de los Rios, A., Archer, S.K., Chiu, J.M.Y., Higgins, C., Van Nostrand, J.D., Zhou, J., Hopkins, D.W. and Pointing, S.B. (2016). Taxonomic and Functional Diversity of Soil and Hypolithic Microbial Communities in Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. Frontiers in Microbiology, 7. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01642.
33. Kesava Priyan Ramasamy, Lovely Mahawar, Raju Rajasabapathy, Karanth Rama Rajeshwari, Miceli, C. and Pucciarelli, S. (2023). Comprehensive insights on environmental adaptation strategies in Antarctic bacteria and

biotechnological applications of cold adapted molecules. Frontiers in Microbiology, 14. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1197797.

34. Obeng N, Pratama AA, Elsas JDV. The Significance of Mutualistic Phages for Bacterial Ecology and Evolution. Trends Microbiol. 2016 Jun;24(6):440-449. doi: 10.1016/j.tim.2015.12.009. Epub 2016 Jan 27. PMID: 26826796.
35. Rastrojo A, Alcamí A. Viruses in Polar Lake and Soil Ecosystems. Adv Virus Res. 2018;101:39-54. doi: 10.1016/bs.aivir.2018.02.002. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29908593.
36. Wang H., Ling Y., Shan T., Yang S., Xu H., Deng X., Delwart E., Zhang W. Gut virome of mammals and birds reveals high genetic diversity of the family Microviridae. Virus Evol. 2019;5:vez013. doi: 10.1093/ve/vez013.
37. Kraberger S., Cook C.N., Schmidlin K., Fontenele R.S., Bautista J., Smith B., Varsani A. Diverse single-stranded DNA viruses associated with honey bees (Apis mellifera) Infect. Genet. Evol. 2019;71:179–188. doi: 10.1016/j.meegid.2019.03.024.
38. Romain Sausset, Petit, M., Valérie Gaboriau-Routhiau and Marianne De Paepe (2020). Correction: New insights into intestinal phages. Mucosal Immunology, 13(3), pp.559–559. doi:https://doi.org/10.1038/s41385-020-0260-3.
39. Shick SRA, Elrod ML, Schmidt A, Kraberger S, Ainley DG, Ballard G, Varsani A. Genomes of Single-Stranded DNA Viruses in a Fecal Sample from South Polar Skua (Stercorarius maccormicki) on Ross Island, Antarctica. Microbiol Resour Announc. 2023 Jun 20;12(6):e0029923. doi: 10.1128/mra.00299-23. Epub 2023 May 18. PMID: 37199625; PMCID: PMC10281173.
40. Zhang, Q.-Y., Ke, F., Gui, L. and Zhao, Z. (2022). Recent insights into aquatic viruses: Emerging and reemerging pathogens, molecular features, biological effects, and novel investigative approaches. Water Biology and Security, p.100062. doi:https://doi.org/10.1016/j.watbs.2022.100062.

41. Topka-Bielecka, Gracja et al. “Bacteriophage-Derived Depolymerases against Bacterial Biofilm.” *Antibiotics (Basel, Switzerland)* vol. 10,2 175. 10 Feb. 2021, doi:10.3390/antibiotics10020175.
42. Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny. Nat Rev Microbiol. 2020 Mar;18(3):125-138. doi: 10.1038/s41579-019-0311-5. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32015 529.