

УДК 578.81

В. В. Головань*, О. М. Андрійчук, І. Г. Будзанівська

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна

* Автор для кореспонденції: holovanviktoria@gmail.com

МОРФОЛОГІЯ ТА ДЕЯКІ БІОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФАГІВ, ВИДІЛЕНИХ З ҐРУНТУ ТА МОХУ АНТАРКТИКИ

РЕФЕРАТ. Виділення бактеріофагів із екосистем, що функціонують в умовах низьких температур, викликає значний науковий інтерес, хоча й має певні методичні труднощі, пов'язані з вивченням їх властивостей та еволюційних особливостей в різних кліматичних умовах. **Метою роботи** було виявити присутність бактеріофагів у зразках моху та ґрунту, відібраних на архіпелазі Аргентинських островів та структурних елементів віріонів, а також оцінити різноманітність морфотипів бактеріофагів в наземних біотопах Антарктики. **Методи.** Дослідженими зразками були мох та ґрунт, відібрані під час сезонних робіт у 2017 р. на Українській антарктичній станції «Академік Вернадський». Відбирали стерильний матеріал (5 г) поміщали в 50 мл 0,1 М Tris-HCl (рН 7,0) та ресуспендували на орбітальному шейкері. Далі утворений гомогенізатор відфільтровували, використовуючи шприцеві бактеріальні фільтри (розмір пор: 0,45 мкм). Отриманий фільтрат центрифугували протягом 2 годин, 90000g (центрифуга OPTIMA L-90K (Beckman Coulter)). Осад з кожної пробірки ресуспендували у 0,5 мл того ж буфера. Бактеріальні культури *Pseudomonas fluorescens* 8573, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *Clavibacter michignensis* sp., *Serratia marcescens* sp., *Cq13*, *Bacillus* sp., *Sphingobacterium thalophilum* sp., *Paenibacillus* sp. вирощували на поживному агарі щільністю 1,5% («Фармактив» Україна). Фаги були виявлені прямою інокуляцією. Титри вимірювали в бляшкоутворюючих одиницях на мл (БУО/мл), за допомогою методу агарових шарів за Грація. Концентровані препарати фагів аналізували за допомогою електронної мікроскопії. Контрастування здійснювали 1–2 % фосфорновольфрамисловою кислотою рН 7–7,4. **Результати.** Визначено морфологію ізольованих фагів. За результатами ЕМ фаги були віднесені до таксономічних груп за особливостями їх будови: до родини *Podoviridae*, С1 морфотипу, порядку *Caudovirales*; до родини *Siphoviridae*, В1-В2 морфотипів, порядку *Caudovirales*; до родини *Myoviridae*, А1, А3 морфотипу, порядку *Caudovirales*. Виявлено різноманітні бактеріофаги, які різняться за морфологічними, біохімічними характеристиками та чутливістю до бактеріальних культур. **Висновки:** отримані результати свідчать про таксономічну різноманітність бактеріофагів в наземних біотопах островів Аргентинського архіпелагу в Антарктиці, а також на західному узбережжі Антарктичного півострова. Встановлення літичної активності фагів до бактерій *Pseudomonas fluorescens* 8573, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591, *Serratia marcescens* sp., *Cq13* дозволяє припустити наявність специфічних механізмів, які дозволяють набувати здатності адаптації фагів до нових хазяїв.

Ключові слова: бактеріофаги, вірусні частки, електронна мікроскопія, зразки моху та ґрунту, Українська антарктична станція «Академік Вернадський».

ВСТУП

Бактеріофаги відіграють ключову роль у регуляції чисельності та складу мікробних асоціацій

Цитування: Головань В. В., Андрійчук О. М., Будзанівська І. Г. Морфологія та деякі біологічні характеристики фагів, виділених з ґрунту та моху Антарктики. *Український антарктичний журнал*, 2019. № 1(18), с. 139–151.

антарктичних озер з дуже низьким вмістом поживних речовин. В результаті фаголізу бактеріопланктону відбувається повернення органічних молекул в пул розчинної органічної речовини, необхідної для підтримання життєздатності та фізіологічної активності мікроорганізмів. Чисельність вірусних часток у товщі води антарктичних озер та ґрунтів корелює з чисельністю

бактеріопланктону. Віропланктон представлений в основному у вигляді бактеріофагів. Чисельність віропланктону варіює в межах 10^6 – 10^7 вірусоподібних часток у літрі. Дані щодо поширення бактеріофагів у полярних широтах є дуже обмежені. Однак, вони вказують на те, що фаги відіграють важливу роль у цих екосистемах, де переважають мікробні асоціації (Sawström, et al., 2008). На сьогодні існує лише два дослідження присвячені вивченню вірусного різноманіття в Антарктичному регіоні. Ці дослідження проводились на прибережних водах станції Палмер LTER (PAL-LTER) та станції В Західного Антарктичного півострова (Vrum, et al., 2015). Було висунуто гіпотезу про те, що полярні області можуть бути точковими місцями мікробної еволюції через більш високий вплив вірусів на мікробні асоціації (Anesio, and Bellas, 2011). Метавіромні дослідження солончаків мероміктичних озер показали високий рівень різноманітності вірусоподібних часток (переважно фагів) та кількох вірофагів у полярних широтах (Yau, et al., 2011). На сьогодні не опубліковано жодного комплексного аналізу присвяченого дослідженню вірусів антарктичних мохів та ґрунтів, існує лише обмежене число повідомлень про вивчення геномів у вірусів, розповсюджених у водних екосистемах Антарктики (Lopez-Bueno, et al., 2009). На сьогодні мало до-

Таблиця 1. Назва зразків відповідно до місця відбору проб

Table 1. The name of the samples according to the place of sampling

Зразок	Дата відбору	Місце та дата відбору проб
1	23.02.2017	о-ви Барселот
2	02.2017	мис Туксен
3	1.01.2017	о. Галіндез
4	02.2017	мис Туксен
5	4.02.2017	о. Бархани, о. Скуа
6	03.2017	о-ви Барселот
7	1.01.2017	о. Галіндез
8	1.03.2017	о-ви Барселот
9	23.02.2017	о-ви Барселот

сліджень присвячених вірусам виділеним на території Антарктиди, які стосуються класичної ізоляції фагів та експериментів з літичної індукції на культивованих видах бактерій (Williamson, et al., 2007; Meiring, et al., 2012; Swanson, et al., 2012). Зараз багаторічні мерзлі породи Арктики та Антарктики розглядаються як сховища різних форм мікроорганізмів, багато з яких виявились адаптованими до полярних умов і могли відновлювати здатність до росту і проліферації при відтаюванні льодистих порід (Paul, 2008).

Метою роботи було: встановити наявність бактеріофагів та структурних елементів віріонів у зразках моху та ґрунту, відібраних на архіпелазі Аргентинських островів, оцінити різноманітність морфотипів бактеріофагів у наземних біотопах Антарктики та охарактеризувати деякі біологічні властивості виявлених фагів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обробка зразків та виявлення бактеріофагів

Аналізували зразки моху, відібрані під час сезонних робіт в 2017 році на архіпелазі Аргентинських островів в зоні розміщення Української антарктичної станції “Академік Вернадський”. Для кожної ділянки відбору проб, відібрано по чотири аліквоти моху та ґрунту з площі приблизно 1 м², зразки зберігалися в стерильних 50 мл поліпропіленових фальконах при температурі нижче 0 °С, і перенесені до лабораторії на постійне зберігання при –20 °С та +4 °С. Місце відбору проб ґрунту та моху зазначено у таблиці 1.

Дослідження вказаних зразків проводились після доставки в Україну. Зразки для дослідження відбирались зі стерильних поліпропіленових фальконів в ламінарному боксі, для уникнення контамінації лабораторними штамми фагів та бактерій.

Виділення фагів зі зразків антарктичного моху: 5 г відібраного зразку гомогенізували в 50 мл 0,1 М буферу Tris-HCl (pH 7,0), ресуспендували на орбітальному шейкері протягом 20 хвилин. Отриману суспензію центрифугували на центрифугу PC-6 за низької швидкості протягом 20 хв при 4000 g і далі фільтрували через мембранний

фільтр з порами діаметром 0,45 мкм, отримуючи на виході 30 мл кінцевого фільтрату. Отриманий фільтрат центрифугували протягом 2 годин, з прискоренням 90000g (центрифуга OPTIMA L-90K (Beckman Coulter)). Осад з кожної пробірки ресуспендували у 0,5 мл того ж буфера.

У роботі використовували культури бактерій, люб'язно надані відділом фітопатогенних бактерій (колекція музею Інституту мікробіології і вірусології Національної академії наук України ім. Д.К. Заболотного), Науково-дослідної лабораторії Фармакології і експериментальної патології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини».

Ізоляти бактеріофагів тестували на індикаторних культурах бактерій: *Pseudomonas fluorescens* 8573, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *Clavibacter michignensis* sp., *Serratia marcescens* sp. та штамах бактерій виділених з антарктичного регіону: бактеріальний ізолят *Cq13*, який є консорціумом кількох бактерій *B2* та *B5*, *Bacillus* sp., *Sphingobacterium thalophilum* sp., *Paenibacillus* sp.

Електронномікроскопічні дослідження проводились з використанням трансмісійного електронного мікроскопу JEOL (JEM — 1400), центру колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного Національної академії наук України. У роботі використано метод негативного контрастування за допомогою 1–2% фосфорно-вольфрамової кислоти, розчин якої готують на дистильованій воді, рН 7–7,4 (доводять рН 1 н. КОН) (Атабекова, 1981). Виміри параметрів часток здійснювали за допомогою програм ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) та AdobePhotoshop CS5, статистичну обробку даних здійснювали в Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Електронномікроскопічні дослідження фагів

В результаті проведення досліджень та аналізу літературних даних, виявлено декілька особливостей, які раніше не були відомими при роботі з фагами помірних широт. Зокрема, відмічено,

висотно-залежний температурний режим поверхневих ґрунтів безпосередньо впливає на бактеріальний метаболізм і вірусні асоціації, оскільки вони потребують метаболічно активних хазяїв для їх реплікації. Автори Adriaenssens E. та ін. (2017) припускають, що головним чинником вірусного таксономічного складу, є вплив температури на швидкість обміну речовин. Цими науковцями було встановлено, що бактеріофаги порядку *Caudovirales* були домінуючими у всіх зразках, але присутність представників родини *Myoviridae* і *Siphoviridae* показала обернену кореляцію. Припускається, що віруси мікроорганізмів родин *Siphoviridae* і *Myoviridae* є прямими конкурентами за бактерії в одній екологічній ніші. Результати їхніх досліджень свідчать, що представники родини *Siphoviridae* присутні у високих кількостях в ґрунтах з високим вмістом кальцію, які мають нейтральний або слабколужний рН (7.0–8.5). Віруси родини *Siphoviridae* в основному є літичними (Roux, et al., 2015) і лише деякі представники є лізогенними, що пов'язано зі стратегіями виживання в умовах навколишнього середовища, які є несприятливими для їхніх хазяїв (Weinbauer, 2004). Бактеріофаги родини *Podoviridae*, навпаки, були присутні на аналогічних рівнях у всіх зразках і не виявили кореляції з іншими родинними або хімічними характеристиками ґрунту (Ackermann, and Prangishvili, 2012; Millard, et al., 2014). За результатами електронної мікроскопії даного дослідження виявлено присутність ікосаедричних, ниткоподібних, витягнутих та сферичних вірусоподібних часток та структурних елементів віріонів (уламки хвостових відростків, скорочені чохла хвостових відростків, відламані головки тощо). Виявлені вірусні частки, які були представлені різними морфотипами, притаманні вірусам таких родин: *Myoviridae*, *Podoviridae* та *Siphoviridae* порядку *Caudovirales* (Gong, et al., 2018).

На першому етапі роботи нами було проведено електронно-мікроскопічні дослідження, зважаючи на те, що зразки відібрані в умовах постійної мерзлоти, іншого атмосферного тиску, УФ-випромінювання та інших фізичних пара-

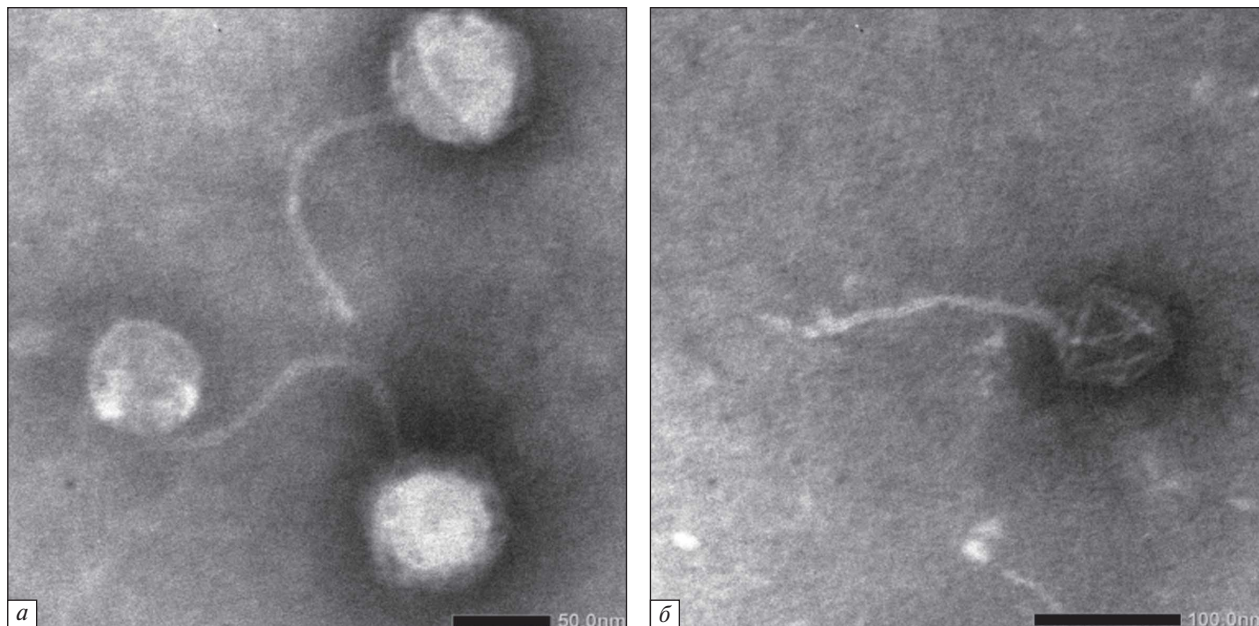


Рис. 1. Морфологія бактеріофагів, детектованих при електронномікроскопічному аналізі зразка № 1: *a, b* — фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (родина *Siphoviridae*)

Fig. 1. Bacteriophages morphology detected via electron microscopy in sample № 1: *a, b* — phages with long, non-contractile tail (*Siphoviridae*)

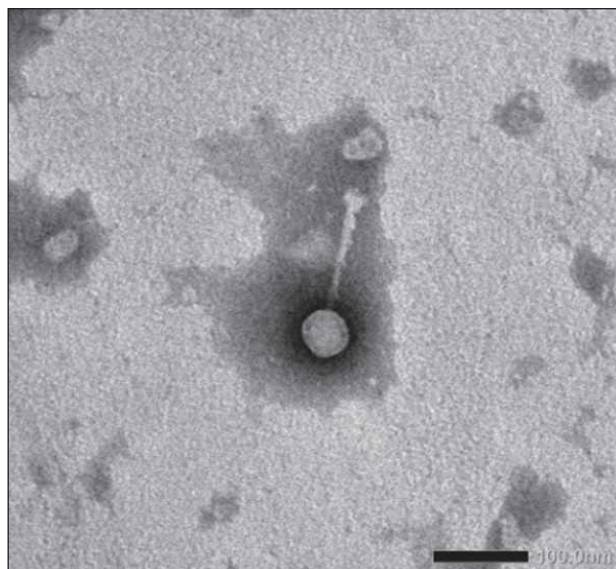


Рис. 2. Морфологія бактеріофагів, детектованих при електронномікроскопічному аналізі зразка № 2 — фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (родина *Siphoviridae*)

Fig. 2. Bacteriophages morphology detected via electron microscopy in sample № 2 — phages with long, non-contractile tail (*Siphoviridae*)

метрів, які значно відрізняються від параметрів середніх широт. Для попередження можливих мутацій, зміни морфологічних та біологічних особливостей фагів, зразки одразу ж після доставки в лабораторію були концентровані та досліджені методом електронної мікроскопії (Головань та ін., 2019).

Методом електронної мікроскопії досліджено 9 зразків, які надалі будуть описані, як зразок № 1 — № 9. В зразку № 1 (рис. 1) виявлені фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (довжина відростка 150—170 нм, розмір головки 60—70 нм), відростки закінчуються конусовидним звуженням (морфотип В1); фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком та видовженою головкою (довжина відростка 200—230 нм, розмір головки 90—100 × 50—55 нм), відростки закінчуються конусовидним звуженням — віднесені до родини *Siphoviridae* (морфотип В2), порядку *Caudovirales*.

В зразку № 2 (рис. 2) виявлені фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (довжина відростка 130—150 нм, розмір головки 50—60 нм),

відростки закінчуються базальною пластинкою з виростами та віднесені до родини *Siphoviridae* (морфотип В1).

В зразку № 3 виявлені фаги з коротким хвостовим відростком (розмір головки 45—50 нм), віднесені до родини *Podoviridae* (С1 морфотип) (рис. 3). Фаги даного зразка мають чітку гексагональну форму головки з характерним конусовидним відростком без базальної пластинки, який відходить від однієї з вершин.

В зразку № 4 виявлені фаги зі скоротливими хвостовими відростками родини *Myoviridae* (А1-морфотип), довжина відростку 60—63 нм, розмір головки 46—51 нм (рис. 4).

В зразку № 5 виявлені фаги з не скоротливими хвостовими відростками родини *Siphoviridae* (В1-морфотип) та фаги родини *Podoviridae* (С1-морфотип) (рис. 5).

В зразку № 6 (рис. 6, а) виявлені фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (довжина відростку 110—125 нм, розмір головки 68—73 нм), віднесені до родини *Siphoviridae* (морфотип В1). Фаги (рис. 6, б) родини *Podoviridae* (морфотип С1) мають короткий не скоротливий відросток, що закінчується базальною пластинкою та ікосаедричну головку (розмір головки 62—68 нм).

В зразку № 7 (рис. 7, а) виявлені фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (довжина відростка 125—153 нм, розмір головки 63—68 нм), віднесені до родини *Siphoviridae* (морфотип В1). Фаги (рис. 7, б) родини *Siphoviridae* (морфотип В2) мають довгий не скоротливий відросток, що закінчується базальною пластинкою та видовжену ікосаедричну головку (довжина відростка 65—73 нм, розмір головки 61—65 × 43—45 нм).

В зразку № 8 (рис. 8, а) виявлені фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (довжина відростку 57—65 нм, розмір головки 38—42 нм), віднесені до родини *Siphoviridae* (морфотип В1). Фаги (рис. 8, б) родини *Podoviridae* (морфотип С1) мають короткий не скоротливий відросток, що закінчується базальною пластинкою та ікосаедричну головку (розмір головки 50—55 нм).

В зразку № 9 виявлені фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (довжина від-

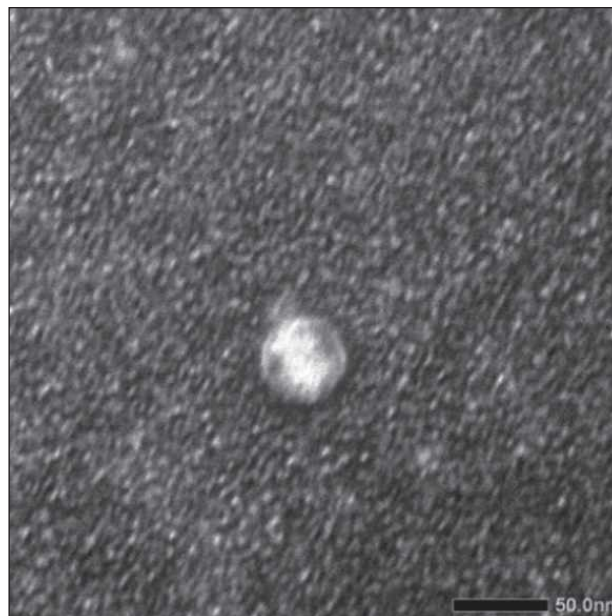


Рис. 3. Морфологія бактеріофагів зразка № 3 — фаги з коротким хвостовим відростком віднесені до родини *Podoviridae*

Fig. 3. Bacteriophages morphology detected via electron microscopy in sample № 3 — phages with short tail (*Podoviridae*)

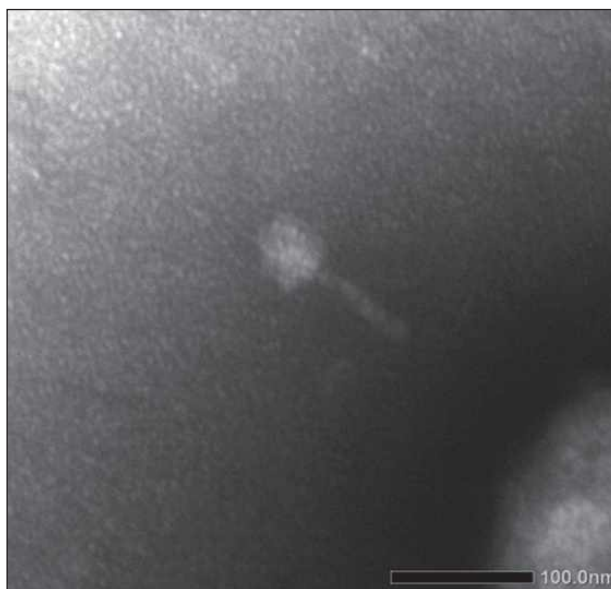


Рис. 4. Морфологія бактеріофагів детектованих при електронномікроскопічному аналізі зразка № 4 — фаги з довгим скоротливим хвостовим відростком (родина *Myoviridae*)

Fig. 4. Bacteriophages morphology detected via electron microscopy in sample № 4 — phages with long, contractile tail (*Myoviridae*)

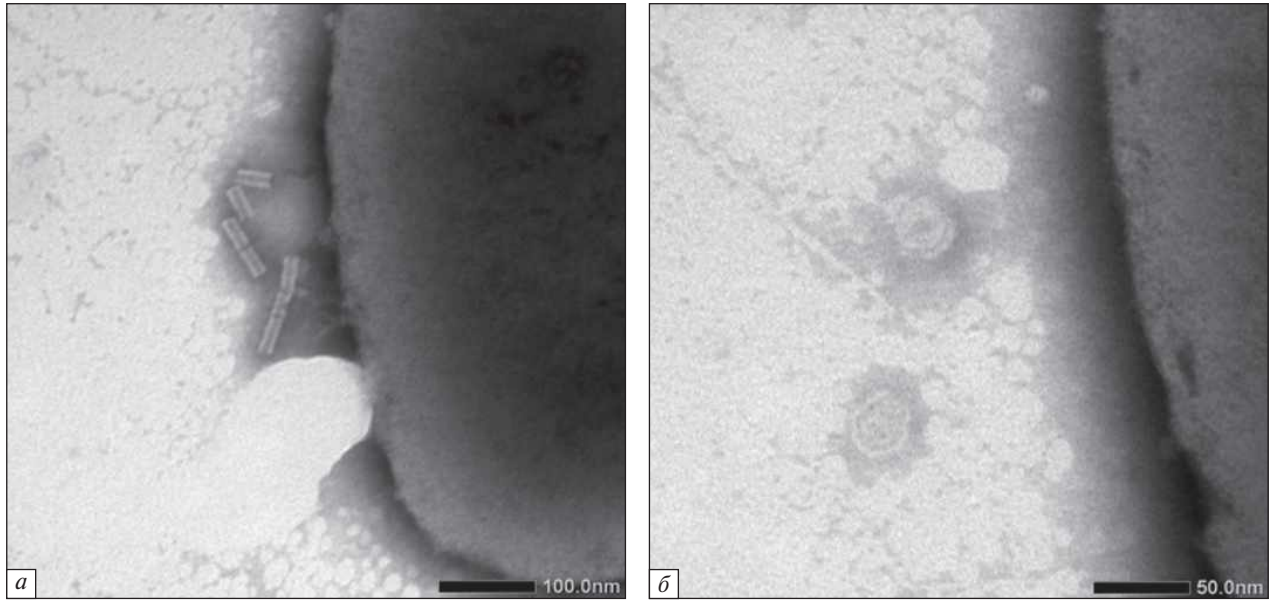


Рис. 5. Морфологія бактеріофагів, детектованих при електронномікроскопічному аналізі зразка № 5: *a* — фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (родина *Siphoviridae*); *б* — фаги з коротким хвостовим відростком (родина *Podoviridae*)

Fig. 5. Bacteriophages morphology detected via electron microscopy in sample № 5: *a* — phages with long, non-contractile tail (*Siphoviridae*); *b* — phages with short tail (*Podoviridae*)

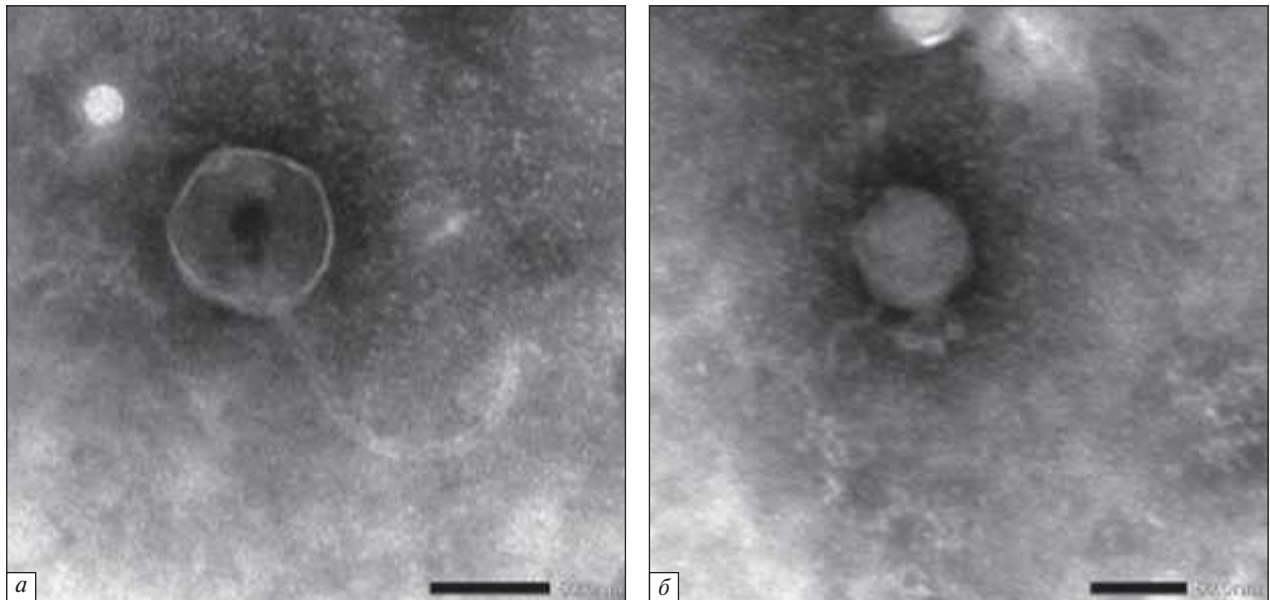


Рис. 6. Морфологія бактеріофагів, детектованих при електронномікроскопічному аналізі зразка № 6: *a* — фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (родина *Siphoviridae*); *б* — фаги з коротким хвостовим відростком (родина *Podoviridae*)

Fig. 6. Bacteriophages morphology detected via electron microscopy in sample № 6: *a* — phages with long, non-contractile tail (*Siphoviridae*); *b* — phages with short tail (*Podoviridae*)

Таблиця 2. Розміри фагів, за результатами електронної мікроскопії

Table 2. The size of phages, according to the results of electron microscopy

№	Матеріал	Місце відбору	Морфотип	Розміри, нм	
				головки	хвостового відростку
1	Ґрунт + мох	о-ви Барселот	B1	60—70	150—170
			B2	50—55х 90—100	200—230
2	Ґрунт (шар прилягаючий до ризоїдів моху)	мис Туксен	B1	50—60	130—150
3	Мох	о. Галіндез	C1	45—50	—
4	Ґрунт	мис Туксен	A1	46—51	60—63
			A3	20—25х 45—55	55—60
5	Ґрунт + мох	о. Бархани о. Скуа	B1	85—90	115—120
			C1	31—35	—
6	Мох	о-ви Барселот	B1	68—73	110—125
			C1	62—73	—
7	Ґрунт + мох	о. Галіндез	B1	62—68	125—153
			B2	55—61х 43—45	65—73
8	Ґрунт + мох	о-ви Барселот	B1	38—42	57—65
			C1	50—55	—
9	Ґрунт	о-ви Барселот	B1	42—53	290—305

Таблиця 3. Біологічна активність бактеріофагів на індикаторних штаммах бактерій

Table 3. Biological activity of bacteriophages on indicator strains of bacteria

	Зразок 5	Зразок 6	Зразок 7	Зразок 8	Зразок 9
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8573	1 негативна колонія пляма лізису	7 негативних колоній	—	1 негативна колонія	2 негативні колонії
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 7591					
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 4013	—	—	—	—	—
<i>Clavibacter michignensis</i> sp.	—	—	—	—	—
<i>Serratia marcescens</i> sp.	—	—	пляма лізису	пляма лізису	—
<i>Bacillus</i> sp.	—	—	—	—	—
<i>Sphingobacterium thalophilum</i> sp.	—	—	—	—	—
<i>Paenibacillus</i> sp.	—	—	—	—	—

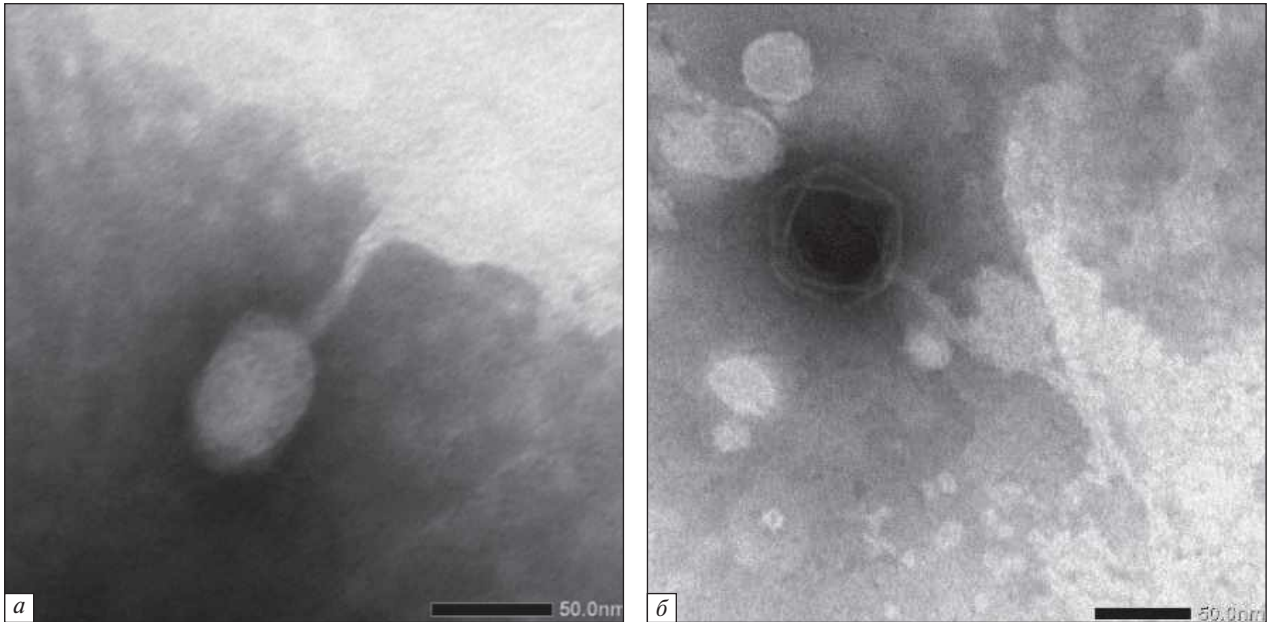


Рис. 7. Морфологія бактеріофагів, детектованих при електронномікроскопічному аналізі зразка № 7: *a* – фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (родина Siphoviridae, морфотип B1); *b* – фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (родина Siphoviridae, морфотип B2)

Fig. 7. Bacteriophages morphology detected via electron microscopy in sample № 7: *a* – phages with long, non-contractile tail (Siphoviridae, B1 morphotype); *b* – phages with long, non-contractile tail (Siphoviridae, B2 morphotype)

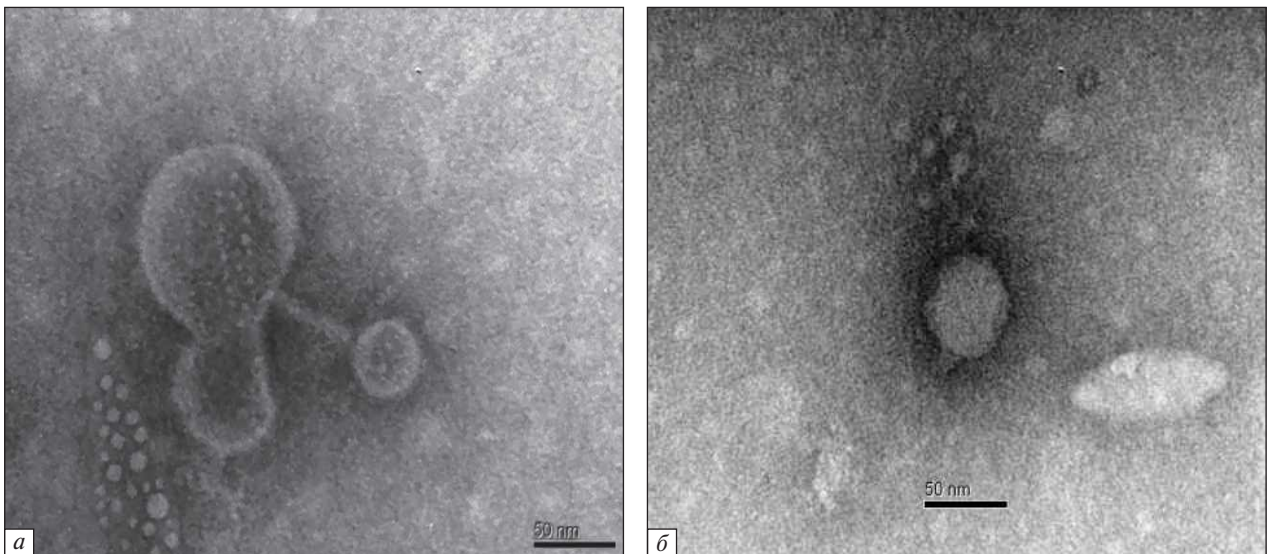


Рис. 8. Морфологія бактеріофагів, детектованих при електронномікроскопічному аналізі зразка № 8: *a* – фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (родина Siphoviridae); *b* – фаги з коротким хвостовим відростком (родина Podoviridae)

Fig. 8. Bacteriophages morphology detected via electron microscopy in sample № 8: *a* – phages with long, non-contractile tail (Siphoviridae); *b* – phages with short tail (Podoviridae)

ростку 290—305 нм, розмір головки 42—53 нм), віднесені до родини *Siphoviridae* (морфотип B1).

Зразки містять велику кількість бактеріофагів різної морфології та розмірів, що свідчить про біорізноманіття вірусного світу, навіть в умовах вічної мерзлоти. Розміри фагових часток наведено в таблиці 2.

Отже, в результаті досліджень було виділено велику кількість фагів. Ізольовані бактеріофаги різняться за морфологією, а отже можемо стверджувати, що у кожному зразку наявні різні фаги. Класифікувавши виявлені фаги встановлено, що вони належать до родини *Podoviridae* (C1 морфотип), родини *Siphoviridae* (B1, B2-морфотип), родини *Myoviridae* (A1, A3-морфотип), порядку *Caudovirales*.

Деякі біологічні особливості фагів

Електронно-мікроскопічні дослідження дають можливість продемонструвати морфологічні особливості, але для фундаментальних досліджень невід'ємною складовою є біологічні показники, які були досліджені на наступному етапі роботи.

Наступним етапом роботи було дослідження плям лізису. Отримані плями лізису, що були досліджені в лабораторії, розрізнялись за розмірами, особливостями морфології та швидкості формування плям. При дослідженні фагів методом агарових шарів на чутливій культурі, час утворення зон був різний. В одних він спостерігався через 6—8 годин від початку інкубації, в інших через 24 години, деякі зони формувалися протягом 48 годин від початку інкубації. Бактеріальний ізолят *Cq13* є чутливим до фагів зразків № 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9. Бактеріальний ізолят *B5* чутливий до зразка № 2, ізолят *B2* — до зразка № 3. Методом «накапування» фільтрату показано, що всі зразки утворюють прозорі плями лізису на газонах чутливої культури (рис. 10).

В результаті проведеної роботи деякі бактеріальні ізоляти виявилися чутливими до фагів виділених зі зразків моху та ґрунту Антарктичного регіону. Але фаги деяких зразків проявляли літичну активність не завжди. При утворенні плям лізису розмноження фагу не завжди мало місце,

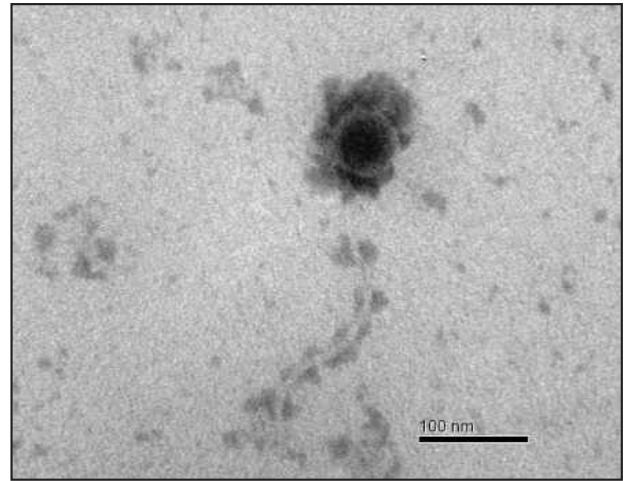


Рис. 9. Морфологія бактеріофагів, детектованих при електронномікроскопічному аналізі зразка № 9 — фаги з довгим не скоротливим хвостовим відростком (родина *Siphoviridae*, морфотип B1)

Fig.9. Bacteriophages morphology detected via electron microscopy in sample № 9 — phages with long, non-contractile tail (*Siphoviridae*, B1 morphotype)

ймовірно, це може бути пов'язано з тим, що лізис можуть спричинювати не лише повноцінні вірусні частки, а й їх хвостові відростки - бактеріоцини. Бактеріоцини не здатні до розмноження, можливо під час інфекції збирання віріону відбувається не повністю, що спричинює утворення окремо головок, окремо — хвостових відростків. Оскільки лабораторні умови не відповідають умовам природного існування антарктичних фагів, стверджувати, що бактеріоцидна дія є закономірним явищем для фагів Антарктиди неможливо. Дане питання потребує подальшого дослідження.

При формуванні плям лізису, можемо стверджувати, що бактерії чутливі до фагів, але чи відбувається синтез білків та повний цикл репродукції фагів невідомо. При повторній інокуляції бактерії утвореним лізатом, формування негативних колоній не завжди відбувається. Це може бути пов'язане з тим, що кліматичні оптимуми лабораторних умов неідентичні умовам антарктичного регіону та фаги втрачають повністю, або частково свою інфекційність на певному етапі

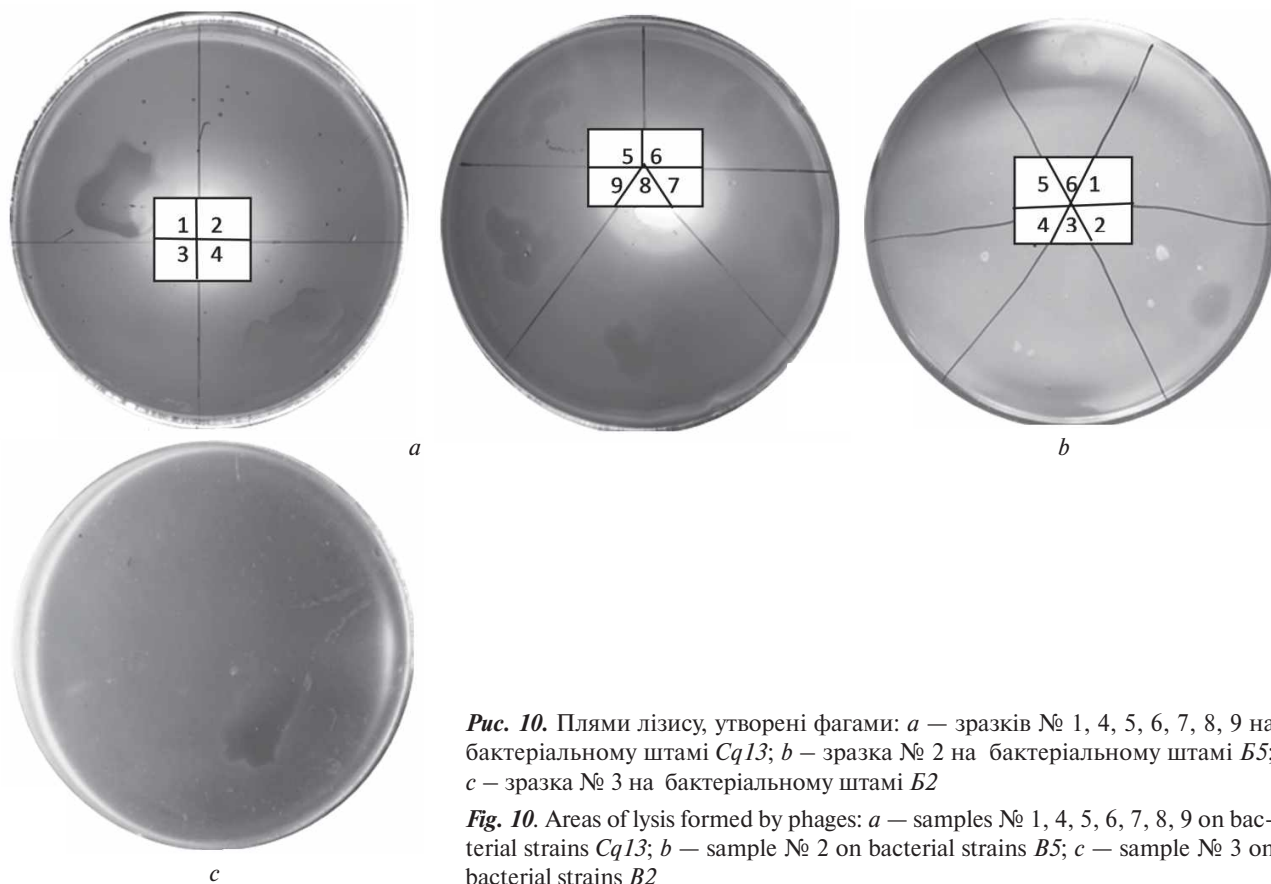


Рис. 10. Плями лізису, утворені фагами: *a* — зразків № 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 на бактеріальному штамі *Cq13*; *b* — зразка № 2 на бактеріальному штамі *B5*; *c* — зразка № 3 на бактеріальному штамі *B2*

Fig. 10. Areas of lysis formed by phages: *a* — samples № 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 on bacterial strains *Cq13*; *b* — sample № 2 on bacterial strains *B5*; *c* — sample № 3 on bacterial strains *B2*

розвитку. При відтворенні досліду у 20 повторях для кожного зразка на чутливих бактеріальних ізолятах, лише у 50% спостерігалася повторна інфекція, яка проявлялася в утворенні плям лізису.

Наступним етапом досліджень було визначення спектра літичної активності бактеріофагів на індикаторних штаммах бактерій. При вивченні репродукції вірусів бактерій в екосистемах важливою властивістю є спектр їх літичної активності, встановлення якого дозволяє враховувати можливі шляхи переносу генетичної інформації в природі.

За спектром літичної активності, зразки 5—9 були перевірені на 8 штаммах бактерій, які відносились до шести родів *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Serratia*, *Sphingobacterium*, *Paenibacillus* та *Bacillus* (табл. 3).

Оскільки музейні штамми бактерій мають широкий спектр рецепторів, більшість бактерій проявляли чутливість до фагів антарктичного регіону, а саме *Pseudomonas fluorescens* 8573, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *Serratia marcescens* sp., *Bacillus* sp., *Sphingobacterium thalophilum* sp. та *Paenibacillus* sp.

Антарктичні фаги схильні до швидкої інактивації за умов їх збереження, порівнюючи з ізолятами бактеріофагів, які були виділені з агроценозів України. Швидка втрата активності антарктичних вірусів також може бути пов'язана з відсутністю постійного періодичного пасування, через що активність втрачається досить швидко.

Циркуляція фагів у природі може відбуватися зі зміною чутливих хазяїв. Не виключено, що в результаті генетичної рекомбінації утворюються нові форми фагів, які проявляють літичну актив-

ність до раніше нечутливих до них бактеріальних культур. Активність бактеріофагів до фітопатогенних бактерій зон помірного клімату може свідчити про наявність на континенті близькопоріднених мікроорганізмів або про те, що в жорстких умовах віруси адаптуються до розповсюдження та збереження в біоценозах, утворюючи в результаті генетичної рекомбінації нові форми фагів, які можуть проявляти літичну активність щодо раніше нечутливих до них бактеріальних культур.

ВИСНОВКИ

Таким чином, отримані результати свідчать про таксономічну різноманітність бактеріофагів в наземних біотопах архіпелагу Аргентинських островів в Антарктиці, а також на західному узбережжі Антарктичного півострова. За попередньою оцінкою, незважаючи на географічну ізоляваність островів Антарктики і специфічні кліматичні умови на них, більшість ізольованих нами бактеріофагів відносяться до традиційних класичних таксонів, широко розповсюджених в різних регіонах Землі з помірним кліматом.

Дані дослідження дадуть можливість продовжити глибинний аналіз вивчення складу вірусних популяцій в умовах Антарктиди, встановлення джерел вірусних інфекцій, оцінки розповсюдження та визначення їхньої ролі в екологічному аспекті та мікробіологічних асоціацій в унікальних умовах.

Одержана колекція бактеріофагів може бути придатна для використання в наукових дослідженнях, спрямованих на комплексне вивчення структури та функцій антарктичних організмів, створення узагальнених моделей екосистем.

Подяки. Автори висловлюють подяку: Державній установі Національний антарктичний науковий центр МОН України — за надання зразків для досліджень та підтримку, особливо співробітникам Д. Г. Луценко та О. Л. Савицькому за відбір та транспортування зразків з Антарктичного регіону, Центру колективного користування при Інституті мікробіології і вірусології імені

Д. К. Заболотного Національної академії наук України — за проведення досліджень з використанням трансмісійного електронного мікроскопу JEOL (JEM — 1400), Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна — за можливість користуватися центрифугою OPTIMA L-90K (Beckman Coulter).

ЛІТЕРАТУРА

1. Атабекова И. *Практикум по общей вирусологии*. М.: МГУ, 1981. с. 191
2. Головань В. Вивчення різноманіття вірусів бактерій, виділених із біотопів моху та ґрунту антарктичного регіону. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. 2019. № 1(77). С. 10—16.
3. Ackermann, H. and Prangishvili, D. 2012. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology*, 157(10), 1843—1849.
4. Adriaenssens, E., Kramer, R., Van Goethem, M., Makhalyane, T., Hogg, I. and Cowan, D. 2017. Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics. *Microbiome*, 5(1).
5. Anesio, A. and Bellas, C. 2011. Are low temperature habitats hot spots of microbial evolution driven by viruses? *Trends in Microbiology*, 19(2), 52—57.
6. Brum, J., Hurwitz, B., Schofield, O., Ducklow, H. and Sullivan, M. 2015. Seasonal time bombs: dominant temperate viruses affect Southern Ocean microbial dynamics. *The ISME Journal*, 10(2), 437—449.
7. Gong, Z., Liang, Y., Wang, M., Jiang, J., He, J., Shao, H. and McMinn, A. 2018. Viral Diversity and Its Relationship With Environmental Factors at the Surface and Deep Sea of Prydz Bay, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, 9, 79—59.
8. Lopez-Bueno, A., Tamames, J., Velazquez, D., Moya, A., Quesada, A. and Alcamí, A. 2009. High Diversity of the Viral Community from an Antarctic Lake. *Science*, 326 (5954), 858—861.
9. Meiring, T., Marla Tuffin, I., Cary, C. and Cowan, D. 2012. Genome sequence of temperate bacteriophage Psymv2 from Antarctic Dry Valley soil isolate Psychrobacter sp. MV2. *Extremophiles*, 16(5), 715—726.
10. Millard, A., Hands-Portman, I. and Zwirgmaier, K. 2014. Morphotypes of virus-like particles in two hydrothermal vent fields on the East Scotia Ridge, Antarctica. *Bacteriophage*, 4(3), 28732. doi: 10.4161/bact.28732.
11. Paul, J. 2008. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *The ISME Journal*, 2(6), 579—589.
12. Roux, S., Hallam, S., Woyke, T. and Sullivan, M. 2015. Viral dark matter and virus–host interactions resolved from publicly available microbial genomes. *eLife*, 4. doi: 10.7554/eLife.08490.

13. Sävström, C., Lisle, J., Anesio, A., Priscu, J. and Laybourn-Parry, J. 2008. Bacteriophage in polar inland waters. *Extremophiles*, 12(2), 167–175.
14. Swanson, M., Reavy, B., Makarova, K., Cock, P., Hopkins, D., Torrance, L., Koonin, E. and Taliansky, M. 2012. Novel Bacteriophages Containing a Genome of Another Bacteriophage within Their Genomes. *PLoS ONE*, 7(7), e40683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040683>.
15. Weinbauer, M. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 127–181.
16. Williamson, K., Radosevich, M., Smith, D. and Wommack, K. 2007. Incidence of lysogeny within temperate and extreme soil environments. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2563–2574.
17. Yau, S., Lauro, F., DeMaere, M., Brown, M., Thomas, T., Raftery, M., Andrews-Pfannkoch, C., Lewis, M., Hoffman, J., Gibson, J. and Cavicchioli, R. 2011. Virophage control of antarctic algal host-virus dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), 6163–6168.
7. Gong, Z., Liang, Y., Wang, M., Jiang, Y., Yang, Q., Xia, J., Zhou, X., You, S., Gao, C., Wang, J., He, J., Shao, H. and McMin, A. 2018. Viral Diversity and Its Relationship With Environmental Factors at the Surface and Deep Sea of Prydz Bay, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, 9, 79–59.
8. Lopez-Bueno, A., Tamames, J., Velazquez, D., Moya, A., Quesada, A. and Alcamí, A. 2009. High Diversity of the Viral Community from an Antarctic Lake. *Science*, 326(5954), 858–861.
9. Meiring, T., Marla Tuffin, I., Cary, C. and Cowan, D. 2012. Genome sequence of temperate bacteriophage Psvmv2 from Antarctic Dry Valley soil isolate Psychrobacter sp. MV2. *Extremophiles*, 16(5), 715–726.
10. Millard, A., Hands-Portman, I. and Zwirgmaier, K. 2014. Morphotypes of virus-like particles in two hydrothermal vent fields on the East Scotia Ridge, Antarctica. *Bacteriophage*, 4(3), e28732. doi: 10.4161/bact.28732.
11. Paul, J. 2008. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *The ISME Journal*, 2(6), 579–589.
12. Roux, S., Hallam, S., Woyke, T. and Sullivan, M. 2015. Viral dark matter and virus–host interactions resolved from publicly available microbial genomes. *eLife*, 4. doi: 10.7554/eLife.08490.
13. Sävström, C., Lisle, J., Anesio, A., Priscu, J. and Laybourn-Parry, J. 2008. Bacteriophage in polar inland waters. *Extremophiles*, 12(2), 167–175.
14. Swanson, M., Reavy, B., Makarova, K., Cock, P., Hopkins, D., Torrance, L., Koonin, E. and Taliansky, M. 2012. Novel Bacteriophages Containing a Genome of Another Bacteriophage within Their Genomes. *PLoS ONE*, 7(7). e40683. doi: 10.1371/journal.pone.0040683.
15. Weinbauer, M. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 127–181.
16. Williamson, K., Radosevich, M., Smith, D. and Wommack, K. 2007. Incidence of lysogeny within temperate and extreme soil environments. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2563–2574.
17. Yau, S., Lauro, F., DeMaere, M., Brown, M., Thomas, T., Raftery, M., Andrews-Pfannkoch, C., Lewis, M., Hoffman, J., Gibson, J. and Cavicchioli, R. 2011. Virophage control of antarctic algal host-virus dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 6163–6168.

REFERENCES

1. Atabekova Y. 1981. *Praktykum po obshchei virusologii* [General virology practicum]. Moscow: Moscow University Press, 191.
2. Holovan V. 2019. Vychennia riznomanittia virusiv bakterii, vydilenykh iz biotopiv mokhu ta gruntu antarktychnoho rehionu [Investigation of diversity of bacterial viruses, isolated from moss and soil biotops of Antarctic region]. *Visnyk Kyivskoho natsionalnoho universytetu imeni Tarasa Shevchenka* [Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv]. 1(77). 10–16.
3. Ackermann, H. and Prangishvili, D. 2012. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology*, 157(10), 1843–1849.
4. Adriaenssens, E., Kramer, R., Van Goethem, M., Makhalanyane, T., Hogg, I. and Cowan, D. 2017. Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics. *Microbiome*, 5(1).
5. Anesio, A. and Bellas, C. 2011. Are low temperature habitats hot spots of microbial evolution driven by viruses? *Trends in Microbiology*, 19(2), 52–57.
6. Brum, J., Hurwitz, B., Schofield, O., Ducklow, H. and Sullivan, M. 2015. Seasonal time bombs: dominant tem-

V.V. Holovan*, O.M. Andriichuk, I.H. Budzanivska

Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine

* Corresponding author: holovanviktoria@gmail.com

MORPHOLOGY AND BIOLOGICAL FEATURES OF PHAGES EXTRACTED FROM MOSS AND SOILS OF ANTARCTIC REGION

ABSTRACT. Isolation of bacteriophages from ecosystems which function in low temperatures represents a huge scientific interest, although it has certain difficulties in methodology. One of the tasks, that solves this question, is the definition of the geographic range of phages distribution, investigation of their properties and evolutionary characteristics in different climatic conditions. **The aim** of the survey was to identify the presence of bacteriophages in moss and soil samples, which were taken at the Argentine Islands archipelago, to find structural elements of the virion and evaluate a variety of bacteriophages morphotypes in terrestrial biotope of Antarctica. **Methods:** analyzed samples moss and soil, selected during seasonal work in 2017 on the Akademik Vernadsky station. The sterile material (5 g) was collected and put into 50 ml 0.1 M Tris-HCl buffer. The filtrate was centrifuged for 2 hours, 90000g (OPTIMA L-90K (Beckman Coulter)). The sediment from each tube was resuspended in 0.5 ml 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0). Bacterial cultures were grown on nutrient agar and liquid broth (1.5% and 0.7%). The phages were detected by direct inoculation. The titers were measured in plaque-forming units per ml (PFU/ ml) via Gratia agar technique. The concentrated phage preparations were analyzed by electron microscopy. Contrasting was performed with 1–2% Tungsten Phosphoric Acid, pH 7–7.4. **Results:** also there were made conclusion about the activity of isolated phages. Due to the results of the EM, phages were divided into four taxonomic groups, according to the structural features: the family *Podoviridae*, C1 morphotypes, order *Caudovirales*; the family *Siphoviridae*, B1–B2 morphotypes, order *Caudovirales*; the family *Myoviridae*, A1, A3 morphotypes, order *Caudovirales*. The research revealed, that a phages are sensitive to various bacterial cultures, which differ in morphological and biochemical characteristics. **Conclusions:** the detection of lithic activity of phages against bacteria (*Pseudomonas fluorescens* 8573, *P. syringae* pv. *lachrymans* 7591 *Serratia marcescens* sp., Cq13) suggests the probability of the presence of specific mechanisms that allow them to acquire the ability to adapt to new hosts.

Keywords: bacterial viruses (bacteriophages), electron microscopy, moss and soil, Akademik Vernadsky station, viral particles.