

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

*На правах рукописи*

**Казанцева Олеся Андреевна**

**Молекулярно-генетическая и физиологическая характеристика новых  
умеренных и вирулентных вирусов бактерий, инфицирующих  
представителей группы *Bacillus cereus sensu lato***

1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация на соискание

ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель  
Кандидат биологических наук  
Шадрин Андрей Михайлович

Пушино – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1.    Бактериофаги и их разнообразие.....	14
1.1.1. Жизненные циклы бактериофагов.....	16
1.1.2. Классификация и номенклатура бактериофагов.....	19
1.1.3. Пангеном бактериофагов.....	21
1.1.4. Структура генома хвостатых бактериофагов.....	23
1.2.    Механизмы генетического разнообразия бактериофагов.....	29
1.2.1. Мутации в геномах бактериофагов.....	29
1.2.2. Мозаичная структура геномов бактериофагов.....	30
1.3.    Роль бактериофагов в эволюции бактерий.....	34
1.3.1. Бактериофаги – агенты горизонтального переноса генов между бактериями.	34
1.3.2. Бактериофаги – «орудие» в бактериальной адаптации и межвидовой конкуренции.....	36
1.4.    Бактерии <i>Bacillus cereus sensu lato</i> .....	40
1.5.    Бактериофаги, инфицирующие представителей группы <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
2.1.    Материалы.....	47
2.1.1. Объекты исследования.....	47
2.1.2. Реактивы, ферменты, коммерческие наборы.....	48
2.1.3. Состав растворов и сред для культивирования.....	49
2.1.4. Оборудование и приборы.....	50
2.2.    Методы исследования.....	51
2.2.1. Общие методики.....	51
2.2.2. Выделение, очистка и получение препаратов бактериофагов.....	52
2.2.3. Морфология бляшек бактериофагов.....	55
2.2.4. Трансмиссионная электронная микроскопия.....	55

2.2.5. Диапазон чувствительных к фаговой инфекции штаммов группы <i>Bacillus cereus</i> .....	55
2.2.6. Секвенирование, сборка и аннотация геномов бактериофагов .....	56
2.2.7. Определение стратегии упаковки ДНК.....	57
2.2.8. Сравнительный геномный анализ.....	58
2.2.9. Определение температурной и рН стабильностей бактериофагов.....	59
2.2.10. Анализ литической активности бактериофагов .....	60
2.2.11. Анализ адсорбции бактериофагов (для Sam46).....	60
2.2.12. Одноступенчатая кривая роста бактериофагов (для Sam46) .....	61
2.2.13. Тест на возникновение лизогенного штамма <i>B. cereus</i> ВКМ В-370 (для Sam46) .....	61
2.2.14. Выявление генетических различий между фагами с мутным и прозрачным морфотипом бляшек (для Sam46 и Sam112).....	62
2.2.15. Статистический анализ .....	63
2.2.16. Регистрационные номера геномов.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	64
3.1. Вирулентные бактериофаги Sam46-Т и Sam46-С .....	64
3.1.1. Выделение, спектр литического действия и морфология .....	64
3.1.2. Организация генома Sam46-Т и Sam46-С.....	66
3.1.3. Выявление генетических различий между Sam46-Т и Sam46-С.....	71
3.1.4. Определение стратегии упаковки ДНК.....	73
3.1.5. Сравнительный геномный анализ.....	75
3.1.6. Определение температурной и рН стабильностей.....	77
3.1.7. Анализ литической активности.....	79
3.1.8. Анализ адсорбции и одноступенчатая кривая роста.....	80
3.1.9. Тест на возникновение лизогенного штамма <i>B. cereus</i> ВКМ В-370 в ходе инфекции Sam46-Т.....	81
3.2. Умеренный бактериофаг Kirou .....	83
3.2.1. Выделение, спектр литического действия и морфология .....	83

3.2.2. Организация генома Kirov .....	84
3.2.3. Определение стратегии упаковки ДНК.....	87
3.2.4. Сравнительный геномный анализ.....	88
3.2.5. Определение температурной и рН стабильностей.....	91
3.2.6. Анализ литической активности.....	91
3.3. Умеренный бактериофаг В13 .....	93
3.3.1. Выделение, спектр литического действия и морфология .....	93
3.3.2. Организация генома В13 .....	94
3.3.3. Определение стратегии упаковки ДНК.....	96
3.3.4. Сравнительный геномный анализ.....	99
3.3.5. Определение температурной и рН стабильностей.....	101
3.3.6. Анализ литической активности.....	101
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	103
4.1. Структурная организация геномов бактериофагов. Метод RAGE.....	103
4.2. Характеристика исследуемых бактериофагов: основные физиологические параметры, геномный и филогенетический анализы .....	107
4.3. Вклад исследуемых бактериофагов в адаптацию и эволюцию бактерий группы <i>Bacillus cereus sensu lato</i> .....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	118
ВЫВОДЫ.....	121
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	122
СПИСОК ТЕРМИНОВ .....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	153
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	156
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	159
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	161
ПРИЛОЖЕНИЕ Д .....	163

ПРИЛОЖЕНИЕ Е.....	165
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ .....	168
БЛАГОДАРНОСТИ .....	171

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

С развитием технологий секвенирования нового поколения и глубоким пониманием молекулярных процессов, исследования в области вирусологии и микробиологии стали ключевым фактором для освоения новых методов контроля над бактериальными инфекциями и управления микробными популяциями. В этом контексте, активное исследование многообразия бактериофагов – вирусов, специализированных на инфицировании бактерий, приобретает большое значение. Разнообразие бактериофагов в природе является впечатляющим свидетельством сложности и приспособляемости микробной жизни. Многообразие генетической организации геномов фагов, их специфичность к определенным хозяевам, а также экологическая и генетическая роли подчеркивают критическое влияние этих вирусов на популяции бактерий и общее функционирование экосистем. Фаги участвуют в глобальных биогеохимических циклах, регулируя численность и состав микробных сообществ [164, 171, 185, 265, 308, 323, 357]. Бактериофаги являются важной частью генетического обмена в окружающей среде и влияют на микробную эволюцию [96, 149, 213, 240, 245, 343, 360].

Фаги представляют значительный интерес не только для фундаментальной биологии, но и имеют широкий спектр прикладных возможностей. Как естественные враги бактерий они могут быть использованы для борьбы с антибиотикорезистентными штаммами бактерий в различных областях, таких как здравоохранение, сельское хозяйство, животноводство и пищевая промышленность [129, 140, 194, 201, 320]. Этот факт открывает перспективы для разработки и дизайна препаратов на основе фагов и/или их литических белков [179, 263]. На сегодняшний день фаги и их белки уже нашли применение в качестве диагностических и генетических инструментов, а также стали основой для новых терапевтических средств [116, 186, 283, 320]. Однако важно подчеркнуть, что фаги не только выполняют роль эффективных антибактериальных агентов, но и могут являться потенциальными источниками факторов вирулентности, патогенности, устойчивости к антибиотикам и др. [78, 85, 331]. Анализ молекулярно-генетических и физиологических особенностей большего количества вирулентных и умеренных вирусов бактерий значительно расширяет возможности при создании новых «инструментов» на основе фагов. Кроме того, подобные исследования позволяют избегать различных осложнений при использовании фаго-препаратов, включая формирование антибиотикорезистентных популяций бактерий.

Одним из актуальных направлений в исследованиях вирусов бактерий является изучение фагов, заражающих группу бактерий *Bacillus cereus sensu lato* (*B. cereus* s. l.). Группа бактерий *B. cereus* s. l. включает в себя виды, способные формировать споры и адаптироваться к разнообразным условиям окружающей среды. Представители этой группы населяют различные

экосистемы: почвенные, водные, кишечные и др. [61, 93, 182, 247]. *B. cereus* s. l. играют важную роль в процессах поддержания биологического равновесия в почвенных экосистемах [39, 65, 276]. Однако некоторые представители могут быть патогенными для человека, вызывая пищевые отравления и серьезные инфекции, в том числе сибирскую язву [223, 325, 337]. Несмотря на широкое распространение этих бактерий в природе и опасность, которую они представляют для человека, на сегодняшний день существует крайне ограниченное количество охарактеризованных *Bacillus*-инфицирующих фагов. Исследования, направленные на изучение фагов, инфицирующих группу бактерий *B. cereus* s. l., обладают огромной научной и практической значимостью. Во-первых, они способствуют расширению наших знаний в области биологии бактериофагов, включая более глубокое понимание процессов взаимодействия фагов с клеткой и их влияния на генетическую изменчивость бактериальных популяций группы *B. cereus*. Во-вторых, такие исследования позволяют накапливать информацию о генетике и физиологии бактериофагов, которая является ценной при разработке потенциальных средств контроля патогенных штаммов *B. cereus* s. l.

#### **Степень разработанности темы исследования**

На июль 2023 года база данных NCBI «nucleotide» содержала более 18000 полных геномов бактериофагов, из которых только 441 относятся к *Bacillus*-инфицирующим фагам. Важно отметить, что далеко не все из секвенированных фагов были охарактеризованы. Этот факт демонстрирует, что фаги, специфически инфицирующие представителей рода *Bacillus*, остаются относительно малоизученными, несмотря на их важное значение. До 2019 года в базе данных National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI GenBank) насчитывалось только 4 генома фагов, выделенных на территории Российской Федерации: Fah (СССР), AR9 (СССР), SRT01hs и TsarBomba. Однако, благодаря работе группы исследователей из лаборатории биологии вирусов бактерий ИБФМ РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, база данных NCBI GenBank пополнилась данными еще о 10 фагах, которые имеют подробные молекулярно-генетическую и физиологическую характеристики [19, 35, 38, 195, 200, 201], включая 4 фага, описанных в данной работе. Согласно правилам и рекомендациям «Международного кодекса вирусной классификации и номенклатуры» этим фагам были присвоены наименования в соответствии с географическим положением обнаружения фагов: г. Самара – фаги *Samaravirus samarensis* vB\_BcM\_Sam46-T и *Samaravirus samarensis* vB\_BcM\_Sam46-C (сокращенно Sam46-T и Sam46-C, соответственно), г. Киров – фаг *Kirovirus kirovense* Kirov и в соответствии с наименованием бактериального штамма-хозяина *B. cereus* ВКМ В-13 – фаг *Bunatrivirus bunatris* В13.

Следует также обратить внимание на список видов бактериофагов, установленный Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) [International Committee on Taxonomy of Viruses (2023). Virus Taxonomy: 2022 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>].

Этот список включает 4079 официально установленных видов бактериофагов, принадлежащих к реалму *Duplodnaviria*, царству *Heunggongvirae*, филлуму *Uroviricota* и классу *Caudoviricetes*, среди которых 136 видов представляют фаги, заражающие бактерий рода *Bacillus*. На 2023 год, кроме известного TsarBomba фага, собранного на территории Российской Федерации (г. Саратов), в список официально принятых видов *Bacillus*-фагов были включены B83 и Kirov, исследованные в лаборатории биологии вирусов бактерий, а остальные 8 фагов находятся на стадии рассмотрения, включая фаги Sam46-T, Sam46-C и B13.

### **Цель и задачи исследования работы:**

Целью настоящей работы являлось изучение физиологических и генетических особенностей новых вирулентных и умеренных бактериофагов группы *Bacillus cereus sensu lato*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести поиск и выделение новых вирулентных и умеренных бактериофагов группы *Bacillus cereus sensu lato*.
2. Определить основные физиологические характеристики выделенных бактериофагов, заражающих бактерии группы *Bacillus cereus sensu lato*.
3. Провести полногеномное секвенирование выделенных бактериофагов и определить структурную организацию их геномов.
4. Провести сравнительный геномный и филогеномный анализы и установить таксономическое положение новых бактериофагов в современной систематике вирусов.
5. Определить генетические маркёры выделенных бактериофагов, которые могут вносить вклад в адаптацию и эволюцию бактерий группы *Bacillus cereus sensu lato*.

### **Научная новизна**

В результате исследований были открыты и охарактеризованы 3 новых вида бактериофагов: вирулентные бактериофаги *Samaravirus samarensis* vB\_VcM\_Sam46-T и *Samaravirus samarensis* vB\_VcM\_Sam46-C (два штамма одного вида) и умеренные бактериофаги *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13. Все исследуемые бактериофаги являются представителями и основателями новых таксонов высокого ранга: фаги vB\_VcM\_Sam46-T и vB\_VcM\_Sam46-C – род *Samaravirus*; фаг Kirov – род *Kirovirus*; фаг B13 – род *Bunatrivirus*. Таким образом, современная таксономия вирусов бактерий была расширена на 3 новых рода.

Полногеномные последовательности ДНК 3-х новых исследуемых штаммов бактериофагов были депонированы в базу данных NCBI GenBank: vB\_VcM\_Sam46 (штамм Sam46-T, MN604698), Kirov (MW084976; NC\_071041) и B13 (OP066531).

Впервые было описано применение метода RAGE (метод быстрой амплификации концов генома), модифицированного с учетом типов упаковки ДНК, для определения концов геномов фагов. Применение модифицированного метода RAGE позволяет точно определить позицию

концов геномов бактериофагов и выявить тип упаковки ДНК в ситуациях, когда биоинформатические инструменты сталкиваются с ограничениями.

Впервые обнаружена и описана малая субъединица терминазы с необычной двухдоменной структурной организацией, включающей типичный домен «Terminase\_2» и дополнительный домен «FtsK\_gamma». Лишь в некоторых редких фагах «FtsK\_gamma» домен кодируется отдельной открытой рамкой считывания, но до сих пор не был описан в составе малой субъединицы терминазы. Впервые была предложена роль фаговых белков, содержащих домен «FtsK\_gamma», включая белки, которые кодируются одиночными «FtsK\_gamma»-подобными генами в геноме бактериофагов.

### **Научно-практическое значение**

На основании полученных результатов были предоставлены заявки на формирование новых таксонов бактериофагов (видов и родов) в ICTV: *Samaravirus samarensis* vB\_BcM\_Sam46, род *Samaravirus*; *Kirovirus kirovense* Kirov, род *Kirovirus*; *Bunatrivirus bunatris* B13, род *Bunatrivirus*.

Кроме того, полученная в результате данного исследования информация позволила уточнить некоторые аспекты влияния бактериофагов на генетическую изменчивость чувствительных к инфицированию бактерий. В частности, была рассмотрена предполагаемая роль фаговых «FtsK\_gamma»-домен-содержащих белков в процессе горизонтального переноса генов. Эта информация имеет важное практическое значение как дополнительный критерий при отборе фагов-кандидатов для препаратов против бактериальных инфекций: в геноме фага-кандидата должны отсутствовать гены, кодирующие «FtsK\_gamma»-домен-содержащие белки.

### **Методы исследования**

Для достижения поставленной цели диссертации и решения задач исследования, а также для подтверждения достоверности результатов исследования в работе использовали комплекс методов: классические микробиологические методы, методы молекулярной биологии, генетические методы, в том числе методы секвенирования нового поколения, биоинформатические методы и статистические методы анализа.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Расширены представления о биоразнообразии вирусов, инфицирующих бактерии группы *B. cereus sensu lato* на территории Российской Федерации.
2. Физиологические свойства выделенных бактериофагов и анализ их полногеномных последовательностей с учетом современных требований систематики вирусов позволили предложить и узаконить три новых вида, формирующих три новых рода.
3. В ходе анализа геномов исследуемых бактериофагов выявлены гены, кодирующие белки, которые могут вносить вклад в адаптацию и эволюцию бактерий группы *B. cereus sensu lato*.

### **Обоснование соответствия диссертации паспорту специальности**

В соответствии с формулой специальности 1.5.3. – молекулярная биология, охватывающей такие области исследования как «Структура геномов», «Геномика» и «Молекулярная вирусология» диссертационное исследование посвящено изучению генетического разнообразия бактериофагов, инфицирующих группу *B. cereus s. l.* Диссертационное исследование охватывает ключевые аспекты, предусмотренные программой и целями специальности 1.5.3. – молекулярная биология и направлено на расширение знаний о генетических особенностях микроорганизмов и механизмах их взаимодействия. Анализ структуры геномов бактериофагов, функциональная аннотация генов и их влияние на жизнь фага и его бактериального хозяина, а также использование биоинформатических методов для глубокого анализа данных – все эти аспекты плотно переплетаются с областями, прописанными в паспорте специальности. В рамках данной работы подробно освещены теоретические аспекты, касающиеся биологического разнообразия бактериофагов и их взаимодействия с бактериями, что позволяет глубже понять молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе этого процесса. Данное исследование генетических и физиологических характеристик бактериофагов, специализирующихся на группе *B. cereus s. l.*, сопряжено с анализом их роли в генетической изменчивости и адаптации бактерий этой группы. Все вышеупомянутые аспекты не только придают данному исследованию высокую актуальность, но и вписывают его в рамки научной и практической деятельности в сфере молекулярной биологии.

### **Степень достоверности апробации результатов**

Работа выполнена в лаборатории биологии вирусов бактерий Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Полногеномное секвенирование фаговых геномов на платформе Illumina MiSeq было проведено в компании ООО «Биоспарк», г. Москва. Секвенирование фрагментов ДНК с

помощью метода Сэнгера проводилось в компании ЗАО «Евроген», г. Москва. Получение микрофотографий фагов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии было выполнено совместно с сотрудником Института белка РАН к.б.н. Рябовой Натальей Александровной на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100С (JEOL, Япония).

Достоверность результатов исследования подтверждена применением современных методов микробиологии, молекулярной биологии и методов статистического анализа, а также применением современных компьютерных программ для обработки полученных экспериментальных данных и использованием сертифицированного лабораторного оборудования.

### **Связь работы с научными программами**

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и РНФ в рамках следующих научных проектов: РНФ, № 22-15-00385, регистрационный номер в ЦИТИС (РосРид) 122053000051-7, «Поиск и конструирование новых бактериолитических ферментов бактериофагов с терапевтическими свойствами, действующими на антибиотико-резистентные *Enterococcus* и *Bacillus*», (2022–2024 гг.); РФФИ, 19-04-00300 А, АААА-А19-119042690036-3, «Поиск новых транскрипционных факторов бактериофагов *Bacillus cereus sensu lato*», (2019–2021 гг.); РФФИ, 17-44-500067 р\_а, АААА-А17-117051610057-6, «Поиск новых лизинов бактериофагов – перспективных антибактериальных агентов», (2017–2018 гг.); государственное задание, регистрационный номер в ЦИТИС (РосРид) АААА-А19-119120390010-1, «Использование генетического материала вирусов бактерий для контроля процессов в бактериальных клетках», (2019-2021 гг.); государственное задание, регистрационный номер в ЦИТИС (РосРид) 1021032424099-1-1.6.3, «Исследование антибактериального потенциала вирусов бактерий методами секвенирования нового поколения, компьютерного анализа и геномной инженерии» (2022-2025 гг.).

### **Доклады результатов исследования на научных конференциях и конгрессах**

Основные результаты диссертации были представлены на 14-ти конференциях и конгрессах: 4-ом Российском микробиологическом конгрессе (24–29 сентября 2023 г., Томск, РФ); конференции «От микробиологии к генетическим технологиям» (22–25 сентября 2023 г., Новосибирск, РФ); XIII Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (6–9 июня 2023 г., Минск, Беларусь); VIII Пушкинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»/школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие» (06–08 декабря 2022 г., Пушкино, РФ); 10-ой Всероссийской научно-практической конференции «Геномное секвенирование и редактирование – NGS 2022» (19 мая 2022 г., Москва, РФ); III Всероссийской конференции

«Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (19–24 июня 2022 г., Новосибирск, РФ); конференции «Проблема антибиотикоустойчивости микроорганизмов и пути ее решения» (16–17 июля, Санкт-Петербург, РФ); 3-ем Российском микробиологическом конгрессе (26 сентября – 1 октября 2021 г., Псков, РФ); III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов / VII съезде биохимиков России. (3-8 октября 2021 г., Дагомыс, Сочи, РФ); 8-ой Всероссийской научно-практической конференции «Геномное секвенирование и редактирование – NGS 2020» (20-21 мая 2020 г., Москва, РФ); 2-ом Российском микробиологическом конгрессе (23–27 сентября 2019 г., Саранск, РФ); VI Пущинской школе-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (2–6 декабря 2019 г., Пущино, РФ); 23-ей Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (15–19 апреля 2019 г., г. Пущино, РФ); 22-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (23–27 апреля 2018 г., Пущино, РФ.); 4-ой научно-практической конференции с международным участием: к 70-летию профессора В.А. Алёшкина: «Бактериофаги. Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (24–26 сентября 2018 г., Нижний Новгород, РФ).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 20 работ, из них 4 статьи в международных изданиях, входящих в список рекомендованных ВАК и индексируемых в базах данных РИНЦ, Scopus и Web of science, и 16 тезисов конференций и конгрессов, 4 из которых входят в систему цитирования РИНЦ.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, список сокращений, список используемой литературы, список публикаций по теме диссертации и приложения к диссертации. Диссертационная работа изложена на 171 странице машинного текста и содержит одну таблицу, 34 рисунка и 6 приложений. Список литературы включает 362 наименования.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора заключается в анализе данных литературы, дизайне и планировании экспериментов, проведении исследований, внедрении новых экспериментальных методов в лабораторную практику, обработке полученных результатов, написании научных публикаций и представлении результатов исследования на конференциях и конгрессах. Основной объем экспериментальной работы выполнен лично соискателем. Отдельные этапы работы выполнены с участием сотрудников лаборатории, а также с привлечением коммерческих организаций ООО «Биоспарк» и ЗАО «Евроген».

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Бактериофаги и их разнообразие

Бактериофаги, также известные как фаги (от др. греч. «пожираю»), представляют собой вирусы, которые инфицируют бактерии и размножаются внутри них. Фаги образуют самую обширную и разнообразную группу биологических объектов на Земле, и, согласно оценкам, их глобальная популяция составляет более  $10^{30}$ , что на порядок превосходит численность бактерий [260].

Фаги обнаруживаются во всех средах обитания, которые были колонизированы бактериями, включая экосистемы водных сред, почв, кишечника животных и многих других [55, 270, 358]. Фаги играют важную роль в формировании микробного сообщества почвы и регуляции круговорота азота, углерода и питательных веществ [164, 171, 185, 308, 323]. Морские фаги играют решающую роль в контроле численности бактерий, что оказывает каскадное воздействие на морские пищевые сети и циклы [265, 357]. Фаги способствуют регенерации растворимой органической материи в мировом океане путём лизиса бактериальных сообществ и участвуют в круговоротах азота и углерода в водных экосистемах [321]. Кроме того, фаги широко распространены в сточных водах [55, 56]. Их присутствие имеет большое значение как для мониторинга загрязнений, так и для очистки сточных вод, поскольку фаги могут инфицировать патогенные бактерии, открывая потенциальную возможность для контроля инфекций, передающихся через воду [46, 56, 57]. В человеке и животных бактериофаги присутствуют как внутри, так и на поверхности организмов как часть их виромов [270]. Кишечник, кожа и слизистые оболочки являются одними из основных мест, где фаги сосуществуют с бактериями [47, 49, 304, 339]. В кишечнике человека фаги влияют на состав кишечной микробиоты, играющей важную роль в здоровье человека [18, 119, 250, 304, 338]. Способность фагов оказывать значительное влияние на структуру и функционирование микробных сообществ делает эти вирусы жизненно важными игроками в поддержании стабильности и биоразнообразия экосистем.

Несмотря на свои микроскопические размеры, бактериофаги демонстрируют удивительное разнообразие. Геномы фагов могут быть представлены в виде двухцепочечной ДНК (дцДНК), одноцепочечной ДНК (оцДНК), двухцепочечной РНК (дцРНК) или одноцепочечной РНК (оцРНК) [29]. Кроме того, размеры геномов бактериофагов могут значительно варьироваться – от нескольких тысяч пар оснований до сотен тысяч пар оснований [86, 147, 262]. Такая вариация – это результат эволюционных и адаптивных процессов, которые фаги прошли в результате естественного отбора. Разнообразие генетического материала

обеспечивает различные механизмы репликации вирусов и регуляции генов, которые в свою очередь, определяют стратегии заражения и размножения фагов в бактериальном хозяине.

Бактериофаги обладают специфичностью инфицирования, заражая лишь конкретные рода, виды или штаммы бактерий [64]. Это явление в первую очередь обусловлено специфическими взаимодействиями между белками фага, опосредующими его прикрепление к бактериальной клетке, и рецепторами на поверхности самой клетки [64]. Специфичность инфицирования может изменяться в зависимости от ряда факторов, таких как тип рецепторов на поверхности бактерий [64], мутации в генах рецепторов или других связанных с инфекцией компонентов [100, 214], наличие у бактерий различных механизмов антифаговой защиты (например, систем рестрикции модификации, исключения суперинфекции, системы CRISPR-Cas, системы abortивной инфекции и систем токсин-антитоксин и др.) [108, 205, 214, 311], экологических условий (параметры среды, такие как pH, температура, наличие конкурирующих организмов и др.) [189], а также посредством эволюции самих фагов [208, 287]. Эти факторы демонстрируют сложные и динамические ко-эволюционные взаимодействия между фагами и их хозяевами.

Помимо экологической важности, бактериофаги имеют большие перспективы в области медицины, особенно в фаготерапии. С появлением устойчивых к антибиотикам бактерий фаготерапия стала потенциальной альтернативой в борьбе с бактериальными инфекциями [53, 157, 220, 267]. Целью активных исследований многообразия бактериофагов является выявление тех из них, которые обладают способностью эффективно воздействовать на устойчивые к антибиотикам патогены и уничтожать их. Однако важно учесть, что фаги, помимо своей потенциальной роли в контроле бактериальных патогенов, также могут воздействовать на генетическую картину бактериальных сообществ. Горизонтальный перенос генов (ГПП) между бактериями – гораздо более быстрый процесс, чем мутационное накопление изменений в их геномах. Фаги, принимая непосредственное участие в генетическом обмене между разными видами и штаммами бактерий, могут способствовать распространению генов, отвечающих за антибиотикорезистентность, вирулентность, образование биопленок, метаболические пути и другие важные биологические характеристики бактерий (более подробно изложено в пункте 1.3.). Это может приводить к быстрому распространению антибиотикорезистентности в популяциях бактерий и, как следствие, к появлению новых антибиотикоустойчивых патогенов, что создает проблему для эффективного лечения бактериальных инфекций.

Таким образом, изучение биологии фагов и понимание их роли в природе имеет большое значение для экологических и биотехнологических исследований, а также для разработки новых методов регулирования микробных популяций и борьбы с бактериальными инфекциями.

### 1.1.1. Жизненные циклы бактериофагов

Фаги классифицируются как вирулентные или умеренные, в зависимости от того, какому из двух основных жизненных циклов они следуют: литическому циклу или лизогенному соответственно [29]. Понимание различий между этими двумя жизненными циклами имеет решающее значение для понимания механизмов влияния фагов на бактериальные популяции и экосистемы.

#### *Литический цикл*

В этом цикле бактериофаг заражает бактерию-хозяина, используя клеточные механизмы для репликации собственного генетического материала и производства многочисленных копий новых фаговых частиц. В итоге бактериальная клетка лизируется, высвобождая вирусное потомство для заражения новых бактериальных клеток [29].

Литический цикл является наиболее известным и изученным типом из жизненных циклов бактериофагов. Ключевые этапы литического цикла включают:

А. Прикрепление (адсорбция): фибриллы или/и шипы хвоста фага распознают специфические рецепторы на поверхности бактериальной клетки, позволяя фагу прикрепляться к бактерии-хозяину.

Б. Проникновение (инъекция): после прикрепления фаг вводит свой генетический материал (ДНК или РНК) в бактериальную клетку. Далее фаг берет под свой контроль бактериальный метаболизм и перенаправляет его на репликацию собственного генетического материала и производство фаговых белков.

В. Репликация и сборка: генетический материал фага реплицируется и новые фаговые белки синтезируются с использованием бактериальных ресурсов. Затем компоненты фага собираются в зрелые вирусные частицы внутри бактериальной клетки.

Г. Лизис: после завершения сборки вирионов бактериальная клетка лизируется или разрушается под действием специфических ферментов, вырабатываемых фагом. Высвобождение многочисленных фагов-потомков способствует дальнейшему инфицированию новых бактериальных клеток и повторению литического цикла.

#### *Лизогенный цикл*

Лизогенный цикл представляет собой альтернативный жизненный цикл бактериофагов и является более сложным и менее разрушительным для бактериальной клетки методом размножения фагов. Во время лизогенного цикла развития умеренный фаг заражает бактерию-хозяина и поддерживается в ней в состоянии профага [29]. Выделяют две формы профагов: (i) интегрированная форма, при которой геном умеренного фага интегрирован в хромосомную или плазмидную ДНК бактериальной клетки, и (ii) истинная плазмидная форма (плазмидные профаги), при которой генетический материал фага присутствует в виде экстрахромосомного

элемента в цитоплазме [279]. Профаг реплицируется вместе с бактериальным геномом во время клеточного деления и не производит новые фаговые частицы [29]. Ключевые этапы лизогенного цикла включают:

А, Б. Прикрепление и проникновение: подобно литическому циклу, лизогенный цикл начинается с адсорбции фага на поверхности клетки бактерии-хозяина и последующей инъекции вирусного генетического материала в бактериальную клетку.

В. Формирование состояния профага: на этом этапе генетический материал умеренного фага интегрируется в бактериальную ДНК (в хромосому или плазмиду), либо поддерживается в цитоплазме в виде независимой автономной плазмиды.

Г. Репликация профага: во время клеточного деления бактериальная ДНК, включая профаг, реплицируется, обеспечивая наследование профага в дочерних клетках.

Д. Индукция и переход к литическому циклу: при определенных стрессовых условиях, таких как воздействие факторов окружающей среды (УФ-излучение или химические агенты, например, митомицин С) [326], профаг переключается на литический цикл развития (в соответствии с этапом «В» литических фагов), что приводит к лизису бактериальных клеток и высвобождению новых вирионов фагов.

Лизогенный цикл позволяет фагам сохраняться в бактериальной популяции в течение нескольких поколений бактериальных клеток, не причиняя вреда своим хозяевам. При этом бактериальный лизоген может проявлять новые «характеристики», приобретенные благодаря присутствию профага. Изменение фенотипа и/или поведения бактерии вызванное профагом называют «лизогенной конверсией» или «фаговой конверсией» [79, 141]. Таким образом, генетический материал умеренного фага может придать бактериям новые свойства, способствуя их приспособляемости и потенциальным преимуществам в определенной экологической нише.

Помимо хорошо изученных и понятных классических циклов развития фагов, описанных выше, в ходе исследований было выявлено существование еще двух уникальных вариаций жизненного цикла, названных как псевдолизогенный и хронический циклы [326].

#### *Псевдолизогенный цикл*

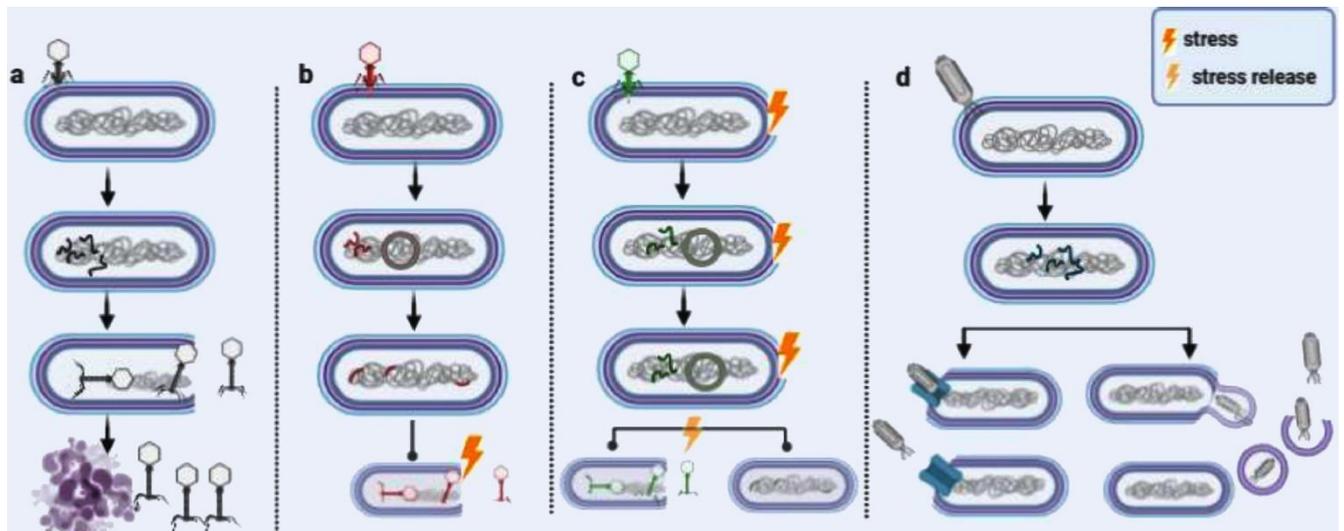
Псевдолизогенный цикл или псевдолизогенное состояние представляет собой отклонение от классической дихотомии поведения фагов. В этом состоянии фаги (как правило, вирулентные) формируют временный симбиотический союз с бактерией, чтобы пережить неблагоприятные условия, такие как ограничение питательных веществ, УФ-излучение, рН и температурные изменения или недостаток клеток бактериального хозяина [261, 289]. В псевдолизогенном состоянии процесс репликации ДНК фагов и сборка вирионов затруднены из-за недостатка энергии внутри бактериальной клетки и процесс лизиса отсутствует. Кроме того, процесс интеграции ДНК фага в ДНК бактерии, характерный для лизогенного цикла, также отсутствует.

Несмотря на неблагоприятные условия, бактериальные клетки в ходе псевдолизогенного цикла фага продолжают медленно расти и делиться. При появлении достаточного количества питательных веществ в клетке хозяина, псевдолизогенный цикл переключается на один из наиболее типичных циклов развития: литический или лизогенный [289, 326]. В итоге в ходе псевдолизогенного цикла скорость роста популяции фагов меньше, чем скорость роста популяции бактерий. Динамичное сосуществование бактерии-хозяина и фага в псевдолизогенном состоянии может сохраняться в течение длительного периода.

### *Хронический цикл*

Хронический цикл или состояние носительства — еще одно интересное явление в мире бактериофагов. При хроническом цикле развития высвобождение фагового потомства может происходить эпизодически или непрерывно, не вызывая гибели бактериальной клетки [326]. Зараженный бактериальный хозяин способен развиваться и размножаться, зачастую сохраняя в себе вирусный генетический материал. Хронический цикл развития был обнаружен у нитчатых и микоплазма-инфицирующих бактериофагов [68], которые демонстрируют два способа высвобождения фагового потомства: посредством специализированного белкового комплекса [136] или путем экстрезии (почкования) [222]. В состоянии носительства нитчатые фаги влияют на биологию бактериального хозяина, способствуя образованию биопленок, а также могут переносить гены токсинов и/или других вирулентных факторов [49, 168].

Схематично все четыре варианта жизненных стратегий фагов представлены на Рис. 1.



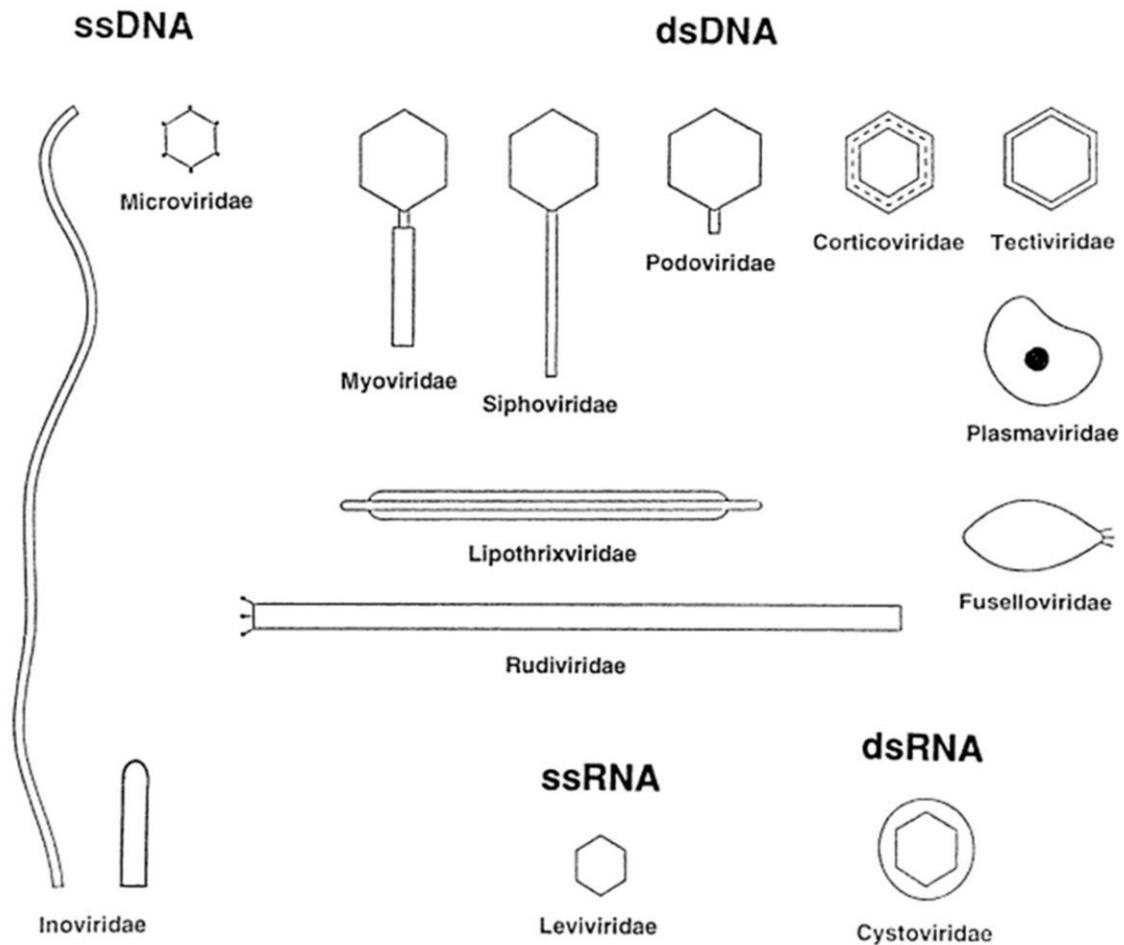
**Рисунок 1.** Стратегии развития бактериофагов. а) литический цикл; б) лизогенный цикл; в) псевдолизогенный цикл; г) хронический цикл: высвобождение через белковый комплекс или экстрезию. Рисунок из работы [326].

### 1.1.2. Классификация и номенклатура бактериофагов

Таксономическая классификация бактериофагов, как и в случае других организмов, представляет собой иерархическую систему, которая группирует фаги в различные категории на основе их характеристик и эволюционных взаимоотношений.

*Классификация по морфологии вирионов.* До внедрения современных молекулярных методов в лабораторную практику основным критерием классификации бактериофагов была морфология их вирионов, которую исследовали путем широко применяемой в то время электронной микроскопии. Классификация на основе морфологии фагов предполагала систематизацию по форме фагового капсида, наличию или отсутствию хвоста и другим морфологическим особенностям фаговых частиц. Фаги по морфологии вирионов классифицировались на две основные группы: хвостатые («tailed») и бесхвостые («non-tailed»), последняя, в свою очередь, подразделялась на многогранные («polyhedral»), нитчатые («filamentous») или плеоморфные («pleomorphic») [53]. Первая официально принятая классификация бактериофагов предполагает их разделение на несколько морфотипов: А (сокращающийся хвост), В (длинный, несокращающийся хвост), С (короткий, несокращающийся хвост), D (без хвоста, с крупными капсомерами), Е (без хвоста, с маленькими капсомерами) и F (без «головы», длинные филаменты – нитчатые) [76]. Следует подчеркнуть, что таксономические семейства *Myoviridae*, *Siphoviridae* и *Podoviridae*, которые официально были приняты ICTV в 1980-х годах и отражали А, В и С морфотипы по Бредли, в 2021 году были упразднены [347]. Морфологические признаки, ранее используемые для таксономической классификации бактериофагов, в настоящее время служат только для отнесения фагов к определенному морфотипу. Современные морфологические типы хвостатых бактериофагов включают: сифовирусы («siphovirus») с длинным гибким несокращающимся хвостом (наиболее распространенный тип), миовирусы («myovirus») с длинным негибким сокращающимся хвостом и подовирусы («podovirus») с коротким хвостом [347].

*Классификация по типу генетического материала.* Бактериофаги по типу нуклеиновой кислоты подразделяют на следующие категории: класс I с двухцепочечной ДНК (дцДНК), класс II с одноцепочечной ДНК (оцДНК), класс III с двухцепочечной РНК (дцРНК), класс IV с одноцепочечной РНК (оцРНК) [28, 76]. Классификация по типу генетического материала дополняет основную морфологическую классификацию Бредли, позволяя учитывать не только морфологические особенности фагов, но и природу их генетического материала (Рис. 2.).



**Рисунок 2.** Схематическое изображение основных групп фагов. Рисунок из работы [28].

*Классификация по типу жизненной стратегии.* Классификация фагов по типу жизненного цикла основана на их взаимодействии с бактериальными хозяевами и включает в себя вирулентные, умеренные, псевдолизогенные и хронические фаги (более подробно изложено в пункте 1.1.1.).

*Классификация по наименованию бактериального хозяина.* В данной классификации фаги группируются по наименованию вида или рода инфицируемых ими бактерий. Например, фаги, инфицирующие бактерий рода *Bacillus*, классифицируются как «*Bacillus phage*».

*Современная классификация по генетическому и филогеномному анализам.* Прогресс методов секвенирования и биоинформатики внес существенный вклад в расширение наших возможностей для более точной таксономии вирусов. Геномные данные приобрели статус ключевого инструмента, позволяющего раскрыть генетические особенности и родство между различными вирусами. Современная классификация бактериофагов в первую очередь основана на их генетическом родстве [347]. Таксономическая классификация хвостатых фагов включает следующие таксономические уровни: класс, порядок, семейство, подсемейство, род и вид. ICTV, определяющий действующую классификацию и номенклатуру вирусов, в 2021 году установил

новые критерии для разграничения таксонов фагов [347]. Фаги одного вида и одного рода должны обладать идентичностью нуклеотидных последовательностей по всей длине геномов не менее 95% и 70%, соответственно [347] (при расчёте этих % с помощью BLASTn необходимо «% identity» умножить на «% coverage»). Кроме того, для демаркации высоких таксонов фагов – родов, подсемейств и семейств филогенетический анализ играет решающую роль [347]. Фаги перечисленных таксонов должны образовывать монофилетическую группу на филогенетических деревьях. По мере секвенирования и анализа нарастающего количества геномов таксономия фагов постоянно пересматривается и уточняется. ICTV активно сотрудничает с вирусологами и другими исследователями, обеспечивая учет, валидацию и актуализацию таксономии бактериофагов.

*Номенклатура бактериофагов.* Номенклатура бактериофагов основана на «Международном кодексе вирусной классификации и номенклатуры» (International Code of Virus Classification and Nomenclature, ICVCN) [161], который определяет правила и рекомендации по наименованию и классификации бактериофагов. Ранее стандартное номенклатурное название бактериофагов формировалось путем комбинирования названия рода бактериального хозяина и слова «phage» или иногда «virus». Однако с 2021 года ICTV произвел пересмотр и обновление номенклатуры бактериофагов [161]. Эти изменения представляют собой новое руководство по созданию индивидуальных латинизированных бинomialных названий для видов фагов, состоящих из латинизированного названия рода и видового эпитета «в свободной форме», который может отражать географическое положение, имена людей, объектов, наименования организаций, учреждений, названия заболеваний и бактериальных хозяев и др. [161]. Данное руководство предоставляет исследователям более удобный и структурированный подход к наименованию различных видов бактериофагов. Несмотря на позитивные изменения наименований фагов в таксономическом списке на сайте ICTV с 2022 года, исследователи столкнулись с некоторыми неудобствами: трудность в идентификации хорошо известных фагов по новым наименованиям и отсутствие возможности провести поиск фагов по таксономическому названию их бактериальных хозяев.

### **1.1.3. Пангеном бактериофагов**

«Кор-геном» и «периферический геном» – это важные понятия в сравнительной геномике, которые используются для описания генетического состава и изменчивости как прокариот, так и бактериофагов, особенно в контексте популяций внутри вида. Эти понятия позволяют лучше понять уровень сохранности и разнообразия генетического материала внутри таксономических групп.

Пангеном представляет собой совокупность всех генов как ортологичных, так и уникальных, присущих только определенной группе организмов, зачастую имеют ввиду определенный вид. Пангеном состоит из «кор»-генома (или основного генома) и «периферического» генома. Также иногда в состав пангенома включают так называемые синглтон-гены (от англ. «singleton»), которые присутствуют только в одном геноме [137]. «Кор»-геном от англ. «Core» – ядро, основной геном, в нем подразделяют так называемые «hard-core» и «soft-core» геномы или по-другому «твердое ядро» и «мягкое ядро» соответственно [206]. Периферический геном или дополнительный состоит в свою очередь из «оболочки» и «облака» от англ. «shell» и «cloud» соответственно. Все эти четыре категории, аналогично с бактериями и археями, имеют дифференцированную степень представленности генов у бактериофагов: гены «твердого ядра» встречаются в более чем 99% геномов, гены «мягкого ядра» обнаруживаются в 95–99% геномов, гены «оболочки» присутствуют в 15–95% (иногда от 10% или 5%), а гены «облака» встречаются в менее чем 15% геномов (иногда менее 10% или 5%) [131, 206, 224].

*«Твердое ядро».* «Твердое ядро» бактериофагов представляет собой набор генов, которые являются общими для всех представителей вирусного вида. Эти гены часто кодируют белки с критически важными функциями, такие как репликация генома, сборка вирусных частиц, прикрепление к хозяину и др. [88, 90]. В связи с этим «твердое ядро» менее подвержено изменениям, вызванным мутациями или рекомбинацией [260], и менее чувствительно к естественному отбору в части функциональной адаптации к новым хозяевам или изменяющимся экологическим условиям [166]. Однако это не означает, что гены «твердого ядра» полностью стабильны. На них также могут действовать различные мутагенные факторы, но эти изменения чаще всего будут нейтральными или неблагоприятными и, следовательно, будут быстро исключены из популяции в ходе естественного отбора [133]. «Твердое ядро» – это общее генетическое «наследие» фага, которое отличает один вид вируса от другого и обеспечивает основу для понимания эволюционных отношений и таксономической классификации фагов.

*«Мягкое ядро».* «Мягкое ядро» бактериофагов включает гены, которые присутствуют у большинства представителей вирусных видов, но могут отсутствовать у небольшой части изолятов. «Мягкое ядро» демонстрирует более высокий уровень изменчивости по сравнению с «твердым ядром» [138]. Гены «мягкого ядра» могут подвергаться генетическим изменениям, таким как точечные мутации, вставки или делеции [138]. «Мягкое ядро» отражает уровень генетического разнообразия и гибкости внутри вирусного вида [79, 204]. Наличие или отсутствие генов в «мягком ядре» может влиять на специфические характеристики фагов, такие как круг хозяев, вирулентность или эффективность репликации [321].

*Периферический геном.* Периферический геном бактериофагов состоит из генов, не являющихся общими для всех представителей исследуемой группы организмов и

представляющих собой наиболее дивергентные и гибкие генетические элементы внутри вида. Периферический геном является резервуаром генетического разнообразия, которое позволяет бактериофагам адаптироваться к различным средам, хозяевам или селективным воздействиям. Например, гены «оболочки» могут кодировать белки, отвечающие за такие функции как устойчивость к антибиотикам, новые белки распознавания хозяина, факторы вирулентности и др. [71].

#### **1.1.4. Структура генома хвостатых бактериофагов**

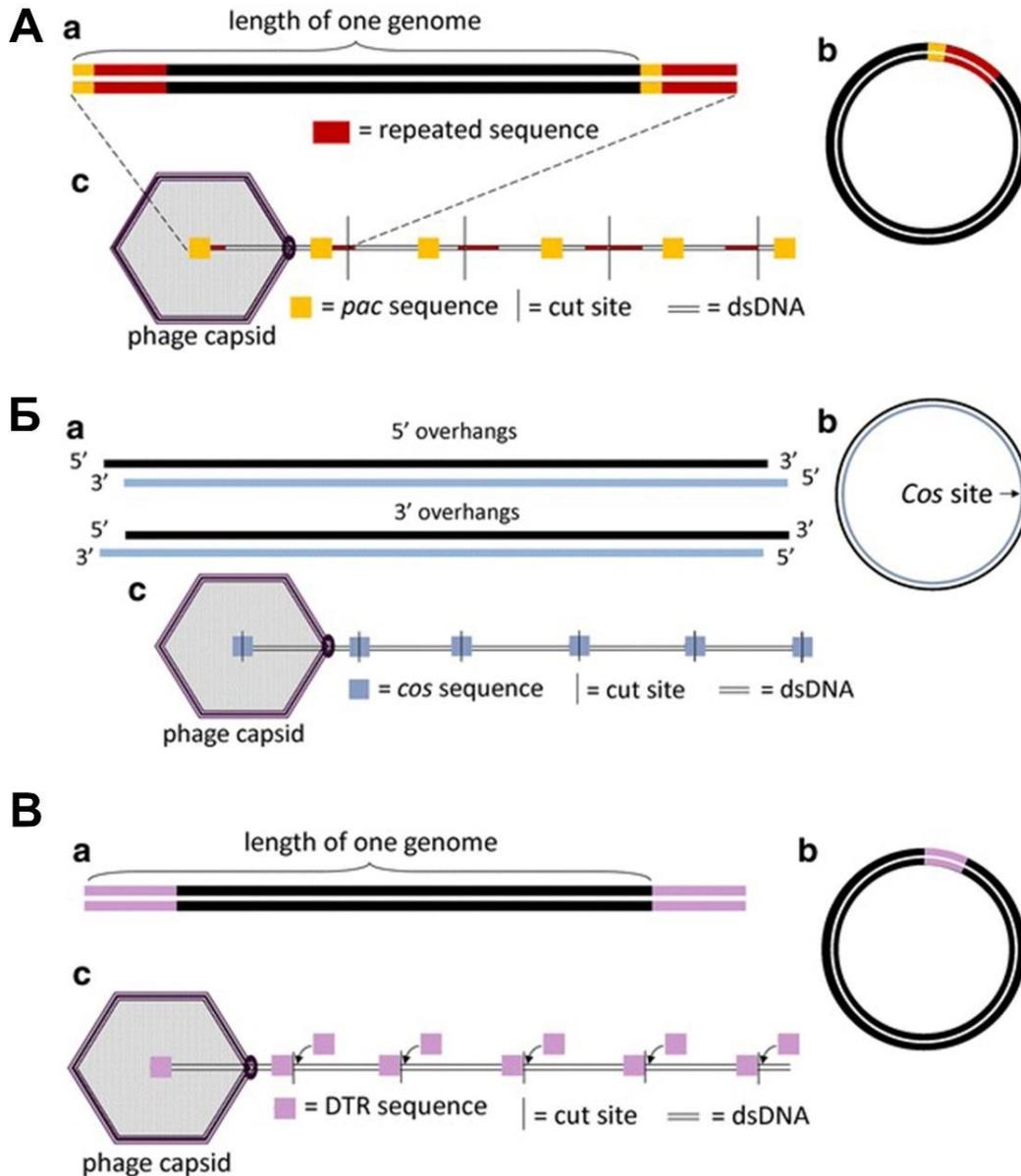
Структурная организация генетической информации бактериофагов представляет собой уникальное поле исследований в молекулярной биологии. Генетическая информация этих микроорганизмов содержит в себе ключевые инструкции, регулирующие весь жизненный цикл фагов, начиная от инфекции хозяйской клетки до высвобождения новых вирусных частиц. При этом расположение генов в геномах бактериофагов обычно отличается высокой степенью компактности, что является оптимальным использованием ограниченного геномного пространства. Такая плотная упаковка генов имеет несколько потенциальных преимуществ. Во-первых, она может ускорить процессы транскрипции, поскольку используется мРНК наименьшей длины. Во-вторых, позволяет уменьшить размер генома и, как следствие, может снизить вероятность мутаций, которые могут нарушить важные генетические функции.

Хвостатые бактериофаги, относящиеся к классу *Caudoviricetes*, чаще всего содержат двухцепочечную ДНК [27]. Особенностью структуры генома этих фагов является модульная организация. Кроме того, для геномов фагов свойственна вариабельность, возникающая за счёт «перетасовки» генетических модулей в результате рекомбинации и горизонтального переноса генов (более подробно изложено в пункте 1.2.2.).

Однако ключевой структурной особенностью геномов бактериофагов является наличие определенных концов генома или так называемых терминальных последовательностей, которые играют важную роль в репликации и упаковке ДНК в капсид при сборке фаговой частицы. Концы ДНК бактериофагов могут иметь различную структуру, включая одноцепочечные или двухцепочечные области, а также терминальные повторы. Механизм упаковки ДНК является критически важным аспектом структуры генома. ДНК хвостатых бактериофагов упаковывается в капсид с использованием комплекса терминазы, который обычно состоит из большой и малой субъединиц. Большая субъединица обычно отвечает за гидролиз АТФ и осуществляет механическую работу по упаковке ДНК, в то время как малая субъединица специфично связывается с некоторыми последовательностями на ДНК, служащими маркерами для начала процесса упаковки [282, 329]. Этот двухкомпонентный механизм обеспечивает высокую точность и эффективность процесса упаковки.

### Механизмы упаковки ДНК

У хвостатых бактериофагов обычно выделяют четыре основных механизма упаковки ДНК: «headful», «COS» («Cohesive Site»), «DTR» («Direct Terminal Repeat») и «Mu-like» (с хозяйской ДНК на концах генома фага).



**Рисунок 3.** Схематическое изображение трех часто встречаемых механизмов упаковки ДНК фагов: **А** – «headful», **Б** – «COS» и **В** – «DTR». Под латинскими буквами: а) структура ДНК внутри вириона фага до момента заражения.; б) после заражения происходит формирование кольцевой молекулы ДНК внутри бактериальной клетки-хозяина; в) линейный конкатемер формируется путем репликации по типу «Катящегося кольца» и упаковывается в капсид согласно механизму упаковки. Данное изображение было скомбинировано из нескольких рисунков из работы [307].

«*Headful*». Этот механизм упаковки ДНК является одним из наиболее распространенных у хвостатых бактериофагов. Терминальный комплекс начинает процесс упаковки с определенного участка на фаговой ДНК, называемого *pac*-сайтом (от англ. «*pack*ing»), и продолжает

упаковывать ДНК в капсид до момента его полного заполнения, что и отражено в названии «headful», подразумевающим «с полной головой» или «полный капсид». В итоге этот механизм приводит к упаковке «избыточного» генома, количество «избытка» которого может варьироваться в зависимости от конкретного фага и его капсида. Длина упакованной ДНК обычно превышает исходную длину генома фага на 2-10%, что отражается в длине упакованной фаговой хромосомы, составляющей от 102% до 110% длины последовательности генома [86]. Эти избыточные последовательности представляет собой циклически пермутированные прямые терминальные повторы. При инфекции бактериальной клетки эти повторы обеспечивают гомологичную рекомбинацию, в результате которой линейный геном фага преобразуется в кольцевую форму, служащая матрицей для репликации вирусной ДНК в хозяйском организме [86]. Схематическое изображение «headful» механизма упаковки ДНК представлено на Рис. 3, А. Одними из наиболее известных примеров фагов, использующих «headful» механизм упаковки, являются *Salmonella*-инфицирующий фаг P22, *Escherichia*-фаг P1 и *Bacillus*-фаг SPP1 [40, 107, 332, 349].

Для некоторых бактериофагов наблюдается отклонения, связанные с активностью терминазы. Например, в некоторых случаях фаги могут начинать упаковку ДНК в произвольных местах без специфического *pac*-сайта для инициации, или, наоборот, в нескольких начальных сайтах инициации подобных *pac*-сайту. Среди таких фагов наиболее известен фаг T4, заражающий *E. coli*, малая субъединица терминазы которого распознаёт гомологичные *pac*-подобные сайты на ДНК [69, 221].

«COS». Упаковка ДНК начинается с конкретной последовательности ДНК, известной как *cos*-сайт. Эти *cos*-сайты служат точками присоединения для комплекса терминазы, который иницирует упаковку. ДНК упаковывается в капсид фага до тех пор, пока в конкатемере не будет достигнут следующий *cos*-сайт. Затем происходит разрезание этой последовательности терминазным комплексом и далее может заполняться следующий капсид [86]. После расщепления ДНК в *cos*-сайтах образуются когезивные концы, которые могут иметь 5'- или 3'-выступающие одноцепочечные последовательности или «свесы» [86, 127, 170, 253, 256, 319]. Длина этих «свесов» может варьироваться от 7 до 19 нуклеотидов в зависимости от большой субъединицы терминазы, которая осуществляет разрез ДНК [253, 256]. После попадания ДНК фага в клетку-хозяина когезивные концы соединяются между собой в результате отжига. Затем, как правило, с помощью ДНК-лигазы хозяина каждая цепь ДНК замыкается, формируя ковалентно замкнутую кольцевую молекулу. Эта кольцевая структура служит матрицей для последующей репликации ДНК фага внутри хозяйской клетки. Схематическое изображение «COS» механизма упаковки ДНК представлено на Рис. 3, Б.

Таким образом, «COS» механизм обеспечивает более точную упаковку, в отличие от «headful» механизма, и исключает наличие «избыточных» фрагментов генома. Примерами фагов, использующих «COS» механизм упаковки, являются *Escherichia*-инфицирующие фаги  $\lambda$  с 5'-COS-концами и фаг HK97 с 3'-COS-концами [170, 318, 319]. Механизмы упаковки ДНК этих фагов хорошо изучены и служат классическими примерами использования *cos*-сайтов для инициации упаковки ДНК в капсид.

**«DTR».** Фаги, использующие механизм упаковки «DTR», характеризуются наличием прямых двухцепочечных повторов на терминальных концах их хромосом. В зависимости от длины терминальных повторов различают два типа: короткие длиной примерно 100-300 н.п. («short DTR» механизм) и длинные, которые могут достигать до 15 т.н.п. («long DTR» механизм) [86, 334]. Как правило, после инъекции фаговой ДНК в хозяйскую клетку, содержащей DTRs, инициируется процесс рекомбинации. В результате этого образуется кольцевой геном, что запускает основную программу репликации и экспрессии генов фага. DTRs-участки фактически функционируют как регуляторные маркеры для комплекса терминазы, детерминируя начальную и конечную точки процесса упаковки геномной ДНК. Схематическое изображение «DTR» механизма упаковки ДНК представлено на Рис. 3, В. Среди наиболее известных фагов с «DTR» механизмом упаковки стоит выделить две категории в зависимости от длины терминальных повторов. Например, *Escherichia*-инфицирующие фаги T3 и T7 имеют короткие терминальные повторы, составляющие 131 н.п. и 160 н.п., соответственно [122, 271]. В отличие от них, *Escherichia*-фаг T5 и *Bacillus*-фаг SPO1 обладают длинными терминальными повторами, длина которых 10139 н.п. и 13185 н.п., соответственно [104, 334].

**«Mu-like».** Кроме трех часто встречающихся механизмов упаковки ДНК, описанных выше, существует ещё один специфичный тип, который характерен для Му-подобных фагов. Эти фаги используют транспозиционный механизм для репликации (по типу «копия-вставка») путем почти хаотичной интеграции своего генома с помощью DDE-транспозаз в геном хозяина с последующим вырезанием и упаковкой [48, 134, 238, 302, 355]. Следовательно, процесс упаковки их ДНК тесно связан с транспозиционными событиями. Терминазный комплекс у Му-подобных фагов инициирует упаковку, распознавая *pac*-подобный сайт возле одного из концов геномной последовательности фага, и делает разрез в некоторой близости от него, но уже в последовательности ДНК, принадлежащей хозяину (образуется левый конец хромосомы фага). Затем происходит упаковка по типу «headful», включающая не только геном самого фага, но и последующую бактериальную последовательность ДНК (образуется правый конец хромосомы фага). В результате хромосома Му-фага, упакованная в капсид, несет разное количество хозяйской ДНК на свои концах: на левом около 50-150 н.п. и на правом до 2 т.н.п. [81, 82, 86]. В итоге каждый вирион Му-подобного фага содержит ДНК бактерии-хозяина на обоих концах

хромосомы, последовательности которой различаются в разных вирионах [302]. Таким образом, Ми-подобный процесс упаковки значительно отличается от других механизмов и представляет собой уникальную стратегию, позволяющую фагу специфично интегрироваться и реплицироваться внутри хозяйской клетки. Кроме того, Ми-подобный механизм упаковки, перенося часть хозяйской ДНК, способствует ГПГ.

Таким образом, структура генома хвостатых бактериофагов не является случайной, а оптимизирована для выполнения конкретных функций, включая рекомбинацию, транскрипцию, репликацию и упаковку ДНК.

### ***Способы определения механизмов упаковки ДНК и типа концов***

Изучение механизмов упаковки ДНК и типа концов геномов фагов являются важным элементом в фундаментальных исследованиях по молекулярной биологии, генетике и биологии бактериофагов. Этот анализ не только улучшает наше понимание механизмов репликации, рекомбинации и интеграции фагов, но также может найти применение в геномной инженерии и синтетической биологии. Кроме того, сравнительный анализ больших субъединиц терминаз, отвечающих за образование разных типов концов, может раскрыть филогенетические связи между разнообразными фагами и предоставить ценные данные об их эволюционной истории. В дополнение, детальное изучение этих особенностей помогает обеспечить точность аннотации и загрузки фаговых геномов в публичные базы данных.

На сегодняшний день существует несколько достоверных способов для определения механизма упаковки ДНК фагов, основные из которых рассмотрены ниже.

*Рестрикционный анализ фаговой ДНК.* Один из устоявшихся методов определения механизма упаковки ДНК фагов является рестрикционный анализ. Этот метод представляет собой обработку ДНК фага эндонуклеазами рестрикции. Анализируя фрагменты ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле, можно установить структурную организацию генома, верифицировать корректность его сборки, а также в большинстве случаев предположить механизм упаковки. Этот метод особенно полезен, когда геном фага уже секвенирован и собран, поскольку он позволяет сравнить рестрикционные профили, полученные экспериментально (*in vitro*) и с помощью компьютерного моделирования (*in silico*).

При проведении рестрикционного анализа ДНК различных фагов можно наблюдать появление уникальных электрофоретических паттернов, характерных для каждого из механизмов упаковки. В случае использования фагом «headful» механизма упаковки, электрофореграмма будет демонстрировать дополнительную полосу (*pac*-фрагмент) в субэквимольярных концентрациях, содержащую *pac*-сайт [86, 201]. Для фага, использующего «COS» механизм упаковки, может наблюдаться от одного до трех рестрикционных ДНК-фрагментов, содержащих концевые последовательности фагового генома. При гидролизе

хромосомы фага эндонуклеазами рестрикции образуется два концевых фрагмента ДНК (левый и правый), которые на одной стороне содержат остаток сайта эндонуклеазы рестрикции, а на другой стороне – «COS»-конец. В некоторых случаях, за счёт отжига «COS»-концов эти два фрагмента могут объединяться в одну молекулу, что, в конечном итоге, приводит к образованию дополнительной полосы на электрофореграмме. Соотношение между левым-, правым-концевыми и объединенным фрагментами ДНК зависит от термодинамических характеристик взаимодействия COS-«свесов». Так, после прогрева и медленного охлаждения соотношение будет сдвинуто в сторону образования объединенного фрагмента, а в случае быстрого охлаждения – в сторону отдельных, левого и правого фрагментов [86, 200]. У фагов с «DTR» механизмом упаковки после гидролиза хромосомы эндонуклеазами рестрикции будут наблюдаться два концевых фрагмента (левый и правый), которые на одной стороне содержат остаток сайта эндонуклеазы рестрикции, а на другой стороне – прямой терминальный повтор. Поскольку каждый из концевых фрагментов содержит DTR-последовательность, сумма длин этих фрагментов будет всегда больше биоинформатически предсказанной – на размер длины повтора. В отличие от «COS» механизма, при «DTR» механизме формирование объединенного фрагмента не происходит [19, 45, 86].

#### *Филогенетический анализ больших субъединиц терминаз*

Другой подход — это филогенетический анализ больших субъединиц терминаз, ферментов, которые отвечают за упаковку фаговой ДНК. Путём построения филогенетического древа на основе сравнения аминокислотных последовательностей этих белков у фагов с неустановленным типом упаковки и у фагов с хорошо изученными механизмами упаковки можно получить дополнительную информацию об их эволюционной истории и о механизме упаковки [86, 200, 328]. Этот метод особенно полезен при исследовании новых или недостаточно охарактеризованных фагов.

#### *Использование биоинформатических программ для предсказания упаковки ДНК фага*

С развитием биоинформатики появляются программы, которые могут предсказать механизм упаковки ДНК на основе анализа геномных данных, например, хорошо зарекомендовавшая себя программа «PhageTerm» и ее модификация «PhageTermVirome» [172, 271]. Подобные программы используют алгоритмы машинного обучения и/или статистические методы для анализа последовательностей геномов фагов и данных-прочтений, полученных в результате секвенирования. Они могут быть полезны для быстрого скрининга больших наборов данных и предсказания механизма упаковки.

Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения, поэтому их часто комбинируют для более точного определения механизма упаковки ДНК фагов [19, 200, 328].

## **1.2. Механизмы генетического разнообразия бактериофагов**

Эволюция вирусных геномов обусловлена различными механизмами, которые позволяют вирусам адаптироваться к различным хозяевам в условиях меняющейся окружающей среды. Эти механизмы, работающие миллионы лет, способствуют огромному генетическому разнообразию, наблюдаемому у вирусов. Механизмы эволюции генома фагов представляют собой сложный набор взаимосвязанных процессов, объединяющих элементы дивергентной эволюции, модульных механизмов, переключения бактериальных хозяев и ко-эволюции [133, 167].

### **1.2.1. Мутации в геномах бактериофагов**

Дивергентная эволюция — это процесс, при котором две или более популяций одного вида претерпевают генетические изменения, в результате которых они становятся всё более различными друг от друга. Дивергентная эволюция является одним из механизмов эволюционных изменений генома бактериофагов и происходит за счет накопления мутаций.

В отличие от клеточных организмов фаги обладают ускоренными циклами репликации и зачастую лишены механизмов коррекции ошибок, что способствует более высокой частоте возникновения мутаций в их геномах [120]. Мутации могут возникать случайно во время репликации генома или в результате воздействия экзогенных мутагенов (химические вещества и УФ-излучение). По изменениям в ДНК мутации могут быть классифицированы как точечные, вставки, делеции и перестройки [21, 301, 310]. По влиянию на функциональность организма мутации могут быть классифицированы как нейтральные, неблагоприятные и адаптивные (полезные). Неблагоприятные мутации обычно удаляются в ходе естественного отбора, в то время как нейтральные и адаптивные мутации могут накапливаться [132].

В процессе дивергентной эволюции геномы фагов изменяются под воздействием разнообразных факторов, таких как давление естественного отбора, воздействие мутагенов и ко-эволюция с хозяевами. Появление мутаций в геноме бактериофага может приводить к адаптации вируса к новым бактериальным штаммам – процесс, известный как «переключение хозяина», смене стратегии жизненного цикла, преимуществу при фаговой конкуренции в ходе естественного отбора и др. [21, 132, 301] Стоит также отметить, что бактерии обладают различными механизмами защиты от бактериофагов, такими как системы рестрикции-модификации, CRISPR/Cas и др., что приводит к постоянному процессу «вооруженного сосуществования» фага и его хозяина [108, 163, 310]. Таким образом, хозяйские механизмы защиты могут стимулировать эволюцию вирусов, а вирусы, в свою очередь, могут оказывать давление на эволюцию хозяев [310].

### 1.2.2. Мозаичная структура геномов бактериофагов

Модульный механизм эволюции является одним из ключевых факторов, обуславливающих генетическую пластичность и генетическое разнообразие бактериофагов. В основе этого механизма лежит представление о том, что геном бактериофагов можно рассматривать как собрание дискретных генетических «модулей» или «сегментов» [73, 133]. В контексте бактериофагов термин «генетический модуль» обычно относится к участку генома, который кодирует отдельные или связанные функционально и/или структурно гены, а также части генов и регуляторные элементы. Гены из фаговых модулей часто работают вместе для выполнения определенных биологических функций, таких как репликация, транскрипция, инфекция или лизис хозяйской клетки и др. [133, 167]. Таким образом, структура генома бактериофагов часто описывается как «мозаичная» [73, 255]. «Мозаичность» заключается в том, что разные «модули» встречаются в различных комбинациях среди различных фаговых геномов и могут иметь разное происхождение [73, 87, 89]. Примеры такого мозаичного строения генома можно обнаружить методами сравнительной геномики. Например, фаги  $\lambda$  и НК97 имеют схожие хвостовые гены, но гены капсида у них существенно различаются [152]. Хвостовые белки фагов P22 и T7, обладающих морфотипом подовирус, заметно различаются по своей структуре, что также указывает на их полифилию [110, 244]. Фаги  $\lambda$  и N15 имеют похожие гены сборки вирионов и высокую идентичность последовательности ДНК, при этом их гены, кодирующие факторы репликации, негомологичны [151]. В разных фагах можно также обнаружить различные С-концевые домены, которые были объединены с N-концевыми доменами в рекомбинантных белках, например, в белке Erf при рекомбинации между фагами P22 и НК97 [152] и в случае белков хвоста фага P2 и P22 [105, 162].

*Мороны.* В геноме бактериофагов помимо генов, отвечающих за основные функции, существует специфический вариант генетических модулей, названный «моронами» от англ. «morons». Название «могон» подразумевает как «дополнительно включённый» от англ. «more on», однако само слово «могон» носит юмористический оттенок, прямой перевод которого звучит как «чокнутый» или «идиот». Мороны кодируют функции, которые не связаны напрямую с жизненным циклом фага, но могут предоставлять определённые преимущества либо хозяйской бактерии, либо самому фагу [331]. Эти гены обычно снабжены собственными регуляторными элементами, такими как промоторы и терминаторы, что позволяет им экспрессироваться независимо от основного генома фага. Мороны могут кодировать РНК и разнообразные белки: ферменты, модифицирующие хозяйскую клетку, токсины, антитоксины, белки, влияющие на иммунный ответ носителя бактерии, и регуляторные белки, влияющие на экспрессию других генов [109, 114, 148, 264, 331]. Такие гены могут быть активированы в хозяйской клетке во время лизогенного или литического цикла в зависимости от конкретных условий. Хорошо известным

примером морона является белок из фага НК97, кодируемый геном gp15 и ответственный за исключение суперинфекции [327]. Наличие моронов в геноме бактериофагов является интересным примером генетической пластичности.

Таким образом, явление «мозаичности» генома позволяет бактериофагам быстро адаптироваться к изменяющимся условиям путем «сборки» новых комбинаций модулей [133, 165]. Генетические модули могут быть переданы между различными штаммами или видами бактериофагов через процесс горизонтального переноса генов.

*Горизонтальный перенос генов.* «Горизонтальный перенос генов» (ГПГ, или HGT от англ. Horizontal Gene Transfer), синонимом которого является другой применяемый термин «латеральный перенос генов» (ЛПГ или LGT от англ. lateral gene transfer) – это механизм, при котором один организм передает генетический материал (в виде ДНК или РНК) не своему потомству, а другому организму. У фагов ГПГ играет критически важную роль в их эволюции, позволяя им приобретать новые гены [133, 345]. Главные механизмы ГПГ для бактериофагов включают рекомбинацию и трансдукцию (процесс трансдукции будет подробно рассмотрен в пункте 1.3.). Это объясняется тем, что ГПГ через трансдукцию несущественно влияет на генетическую вариабельность самих фагов, а его основное воздействие направлено на геномы бактерий.

*Рекомбинация.* Рекомбинация может происходить как между различными фагами, так и между фагом и его бактериальным хозяином [73]. У бактериофагов описано несколько типов рекомбинации: гомологичная, негомологичная и сайт-специфическая.

Гомологичная (общая) рекомбинация происходит между двумя последовательностями ДНК, которые имеют высокий уровень сходства. Этот процесс играет ключевую роль в репарации поврежденной ДНК, а также может происходить при заражении одной и той же бактериальной клетки разными штаммами фага или при интеграции фага в геном хозяина.

Негомологичная (незаконная или неконсервативная) рекомбинация происходит между несхожими последовательностями ДНК. В этом случае одни сегменты генома могут быть удалены или заменены, внося вариативность и значительные структурные перестройки генома фагов. Однако механизмы такой рекомбинации у фагов менее понятны, по сравнению с гомологичной рекомбинацией.

Сайт-специфичная рекомбинация требует наличия конкретных хорошо узнаваемых последовательностей или «сайтов» на ДНК для инициации процесса, а также специализированных ферментов – рекомбиназ, которые распознают эти сайты и катализируют реакцию. Сайт-специфическая рекомбинация обычно участвует в процессах интеграции и эксцизии бактериофагов в хромосомы или плазмиды хозяина. Например, фаги  $\lambda$  и P1 используют этот тип рекомбинации для интеграции своих геномов в хромосому *E. coli* [173, 212].

Как было сказано выше, в процессе рекомбинации два фага, находящиеся в одной инфицированной бактериальной клетке одновременно, могут обмениваться участками своих геномов [83, 84]. Однако стоит подчеркнуть, что обмен генами возможен как между двумя вирулентными фагами, так и между вирулентным фагом и профагом, находящимся в геноме хозяина [84]. Данные секвенирования бактерий показывают, что в каждом геноме свободноживущих бактерий находятся в среднем от 2 до 6 профагов [237]. При этом рекомбинация между вирулентным и умеренным фагами возможна в двух направлениях: 1) резидентные профаги, выступающие как генетические доноры, могут передавать гены вирулентным фагам (реципиентам), но при условии, что образованный рекомбинантный фаг обязательно должен быть функциональным и иметь подходящий размер генома для упаковки в капсид; 2) в свою очередь «входящий» фаг-донор может передать гены профагу-реципиенту без каких-либо ограничений. В этом случае возможны сложные обмены, включая множественные инсерции и делеции генов. Эти механизмы способствуют более высокому обмену генами среди умеренных бактериофагов, что не столь значительно наблюдается при сравнительном анализе геномов вирулентных фагов. Подтверждение этой гипотезы найдено в исследованиях умеренных и вирулентных фагов, инфицирующих род *Lactococcus* [32].

Классическим примером рекомбинации между бактериофагами является эксперименты по «скрещиванию» штаммов фага  $\lambda$ , в результате которых образуются новые штаммы  $\lambda$ , способные обходить механизмы защиты некоторых штаммов *E. coli* [73, 285, 324]. Также было продемонстрировано, что при кроссинговере фагов T4 и T2 в процессе гомологичной рекомбинации может происходить появление новых комбинаций генов, отвечающих за структуру капсида и защитные механизмы против бактерий-хозяев [254, 258, 316]. Возникшие в результате скрещивания фагов T5 и BF23 гибридные фаги демонстрировали измененную специфичность к хозяину и кинетику адсорбции [169]. P2-подобные фаги также известны своей способностью к сайт-специфичной интеграции в геном хозяина и к гомологичной рекомбинации с другими фагами, что приводит к их генетическому разнообразию [251].

#### *Роль хоминг эндонуклеаз в модульном механизме эволюции фагов*

Хоминг эндонуклеазы – это тип эндонуклеаз, которые способны распознавать специфические, длинные последовательности ДНК и вносить в них разрывы с последующим процессом репарации. В конечном итоге происходит перенос сегмента ДНК, включающего открытую рамку считывания хоминг эндонуклеазы и прилегающих к ней фланкирующих участков ДНК, от донора к реципиенту [215]. В контексте бактериофагов, хоминг эндонуклеазы участвуют в нескольких важных процессах: первый – перестройка генома фага путем инцизии (разрезания) ДНК, что может привести к последующей рекомбинации и интеграции новых генетических последовательностей; второй — внутривидовая конкуренция, где эндонуклеазы

обеспечивают фагу конкурентное преимущество путем разрезания ДНК в определенных местах генома конкурентных фагов; и третий — модульный механизм, поскольку хоминг эндонуклеазы часто являются частью больших функциональных модулей в геноме фага, включая модули, отвечающие за стадии жизненного цикла фага, такие как адсорбция, интеграция и лизис. Например, в геноме фага T4 закодировано несколько хоминг эндонуклеаз, из которых можно перечислить следующие: I-TevI, I-TevII, SegA, SegE, SegF, SegG и SegB семейства GIY-YIG, способные перестраивать геном T4 [124, 266].

Таким образом, модульный механизм эволюции генома посредством горизонтального переноса генов представляет собой динамичный процесс, позволяющий приобретать новый генетический материал и формировать мозаичные геномы, тем самым способствуя генетическому разнообразию и адаптации фагов.

### 1.3. Роль бактериофагов в эволюции бактерий

Бактериофаги играют важную роль в эволюции бактерий и оказывают влияние на формирование генетического разнообразия бактериальных популяций. При заражении и последующем размножении внутри бактериальных хозяев, некоторые фаги могут не только интегрировать свою генетическую информацию в геном хозяина (в случае умеренных фагов), но и осуществлять ГПГ. Этот процесс может обогатить бактерии новыми свойствами, такими как устойчивость к антибиотикам, повышенная вирулентность, специализированные метаболические функции и др. Подобное воздействие фагов на бактерии ухудшает ситуацию с антибиотикорезистентностью и создает препятствия для эффективного применения антимикробной терапии.

#### 1.3.1. Бактериофаги – агенты горизонтального переноса генов между бактериями

Бактериофаги могут осуществлять ГПГ между своими бактериями-хозяевами через механизм трансдукции. В процессе трансдукции фаги могут ошибочно упаковать в капсид часть генома бактерии-хозяина и передавать его другому штамму или виду бактерий. Сразу стоит отметить, что трансдукция, как правило, не приносит прямой выгоды бактериофагу. Этот процесс является скорее побочным эффектом несовершенства механизмов репликации и упаковки фагов. Генерализованная трансдукция может влиять на адаптивные возможности бактериальных популяций, создавая условия, при которых бактерии становятся более уязвимыми или устойчивыми к фагам.

У фагов различают три типа трансдукции: генерализованную (общая), специализированную и латеральную.

**Генерализованная трансдукция.** При генерализованной трансдукции в капсид фага ошибочно упаковывается часть бактериальной ДНК (хромосомной или плазмидной) вместо ДНК фага. Такая «ошибочная» фаговая частица имеет два основных свойства: во-первых, она не содержит набора генов, необходимых для сборки вирионов, и поэтому этот процесс не способствует дальнейшему размножению фага; во-вторых, она может инфицировать другую клетку и, при определенных условиях, интегрировать бактериальную ДНК предыдущего хозяина в геном зараженной клетки. Генерализованная трансдукция изучалась на примере фагов типа P22, инфицирующих представителей рода *Salmonella* [231]. В этих случаях фаговые терминазы ошибочно упаковывают хозяйскую ДНК, распознавая псевдо-*pac*-сайты [231]. Псевдо-*pac*-сайты отличаются степенью идентичности с оригинальным фаговым *pac*-сайтом, а их число и локализация на бактериальной хромосоме разнятся в зависимости от вида бактерии, что в конечном счете влияет на частоту трансдукции разных геномных участков бактерии. В основном такая трансдукция характерна для фагов «*pac*-типа» с механизмом упаковки «headful», поскольку

для этого нужен всего один псевдо-*pac*-сайт. С другой стороны, псевдо-*cos*-сайты также могут встречаться на бактериальной хромосоме, однако шансы на то, что два подходящих сайта окажутся в нужной пространственной близости, крайне малы. Это объясняет, почему фаги «COS» типа обычно не участвуют в генерализованной трансдукции [96]. Следует отметить, что эффективность процесса генерализованной трансдукции зависит от различных факторов, таких как специфичность фаговых терминалов к сайтам на ДНК (*pac*-сайты и их псевдо-*pac*-гомологи) и способность нового хозяина интегрировать и экспрессировать «чужеродные» гены. Генерализованная трансдукция потенциально может затронуть любую часть генома, что и отражено в названии этого процесса. Фаг SPP1 с «headful» механизмом упаковки является одним из фагов, которые могут участвовать в генерализованной трансдукции [330, 360]. При этом SPP1 способен трансдуцировать 1% бактериальной хромосомы хозяина [360]. Кроме того, хорошо изученный фаг P1 с «headful»-механизмом упаковки является не только примером фага с генерализованной трансдукцией, но и имеет применение в молекулярной биологии как инструмент для клонирования и манипуляции генетическим материалом [96, 314]. Он может служить основой при создании векторов для клонирования, которые могут вмещать сравнительно крупные участки ДНК [22, 117]. Один из интересных аспектов фага P1 – это наличие у него рекомбиназы Cre [50]. Этот фермент широко применяется в молекулярной биологии для целенаправленной рекомбинации геномных участков, фланкируемых специфическими loxP сайтами, откуда и получил свое название Cre-LoxP системы [210, 246]. Особое внимание заслуживают трансдуцирующие фаги, способные активно участвовать в переносе генов, связанных с устойчивостью к антимикробным агентам. Например, фаг φJB, инфицирующий *Staphylococcus aureus*, обладает способностью переносить плазмиду устойчивости к тетрациклину pT181, а также плазмиду пенициллиназы [240]. При этом частота такого переноса значительно превышает аналогичные показатели у большинства других известных фагов, таких как φ11, φ53, φ80, φ80α и φNM4 [240].

**Специализированная трансдукция.** В случае специализированной трансдукции, при инициации процесса «вырезания» интегрированного генома профага из хромосомы хозяина, возникает возможность случайного «захвата» бактериальных генов, локализованных вблизи профага. Эта нецелевая «упаковка» хозяйских генов облегчает их горизонтальный перенос в другие бактериальные клетки в рамках новых инфекционных циклов [96].

Примером специализированной трансдукции является умеренный *Escherichia*-фаг λ [245]. При переходе фага λ из лизогенного цикла в литический иногда может наблюдаться аномальное вырезание профага, которое включает сегменты хромосомы бактериального хозяина. Получившаяся гибридная молекула способна к репликации как обычный вирусный геном и может быть упакована, но только при наличии *cos*-сайта. Специализированная трансдукция

встречается и у фагов с «headful» механизмом, например, у *Salmonella*-фага P22 [213]. Стоит отметить, что для успешной упаковки гибридного фагового генома здесь необходимо наличие функционального *pac*-сайта. Из-за необходимости сохранения специфических сайтов для упаковки фаговой ДНК специализированная трансдукция считается относительно редким событием и представляет собой ограниченный способ передачи генов.

**Латеральная трансдукция.** Считается, что генерализованная и специализированная трансдукции являются ошибочным «поведением» фагов, приводящими к упаковке хозяйской ДНК. Однако в противоположность двум вышеописанным типам трансдукции существует третий – латеральная трансдукция, открытый у фагов, заражающих *S. aureus*, который, по-видимому, является естественной частью жизненного цикла фага [96, 113, 149]. Эти фаги нарушают традиционный порядок «эксцизии-репликации-упаковки», откладывая процесс «вырезания» интегрированного генома фага и начиная упаковку ДНК пока профаг находится в составе бактериальной хромосомы. Латеральная трансдукция обеспечивает передачу больших участков бактериальной ДНК, расположенных в непосредственной близости от генома интегрированного профага. Этот процесс происходит с поразительной частотой, превышающей в 1000 раз уровень, характерный для участков из других частей бактериального генома, перенос которых ограничен и имеет гораздо более низкие частоты, составляющие от  $10^{-5}$  до  $10^{-6}$  от общего числа фаговых частиц в лизате [96, 113, 149].

### **1.3.2. Бактериофаги – «орудие» в бактериальной адаптации и межвидовой конкуренции**

Лизогения представляет собой фундаментальный процесс, важность которого для эволюционной динамики бактерий подтверждается наличием профагов в бактериальных геномах. Согласно генетическому анализу, приблизительно 50% рассмотренных бактериальных геномов характеризуются наличием минимум одного профага, в то время как некоторые лизогены содержат до 16 профагов [346]. В отношении патогенных бактерий, интеграция фага в бактериальный геном является довольно распространенным явлением. Так, примерно у 80% всех клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* наблюдается наличие профагов [281]. Что касается бактерий рода *Bacillus*, анализ данных геномного секвенирования показывает, что в каждом их геноме может присутствовать до пяти профагов [237]. Во время лизогении бактериальный хозяин и фаг устанавливают симбиотические отношения, где фаг получает зачастую временное «убежище» в клетке-хозяина (при условии, что его возможность переключиться из лизогенного цикла в литический сохранится). Исходя из этого, профагам стратегически выгодно передавать гены, способствующие выживанию бактериального хозяина

[75]. Такие гены могут обеспечивать бактериальным организмам преимущества, улучшая их экологическую адаптацию и конкурентоспособность в микробном сообществе.

Фаги могут кодировать и переносить гены, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, что делает бактерии менее уязвимыми к антибиотикотерапии. Эксперименты по изучению микрофлоры мышей, подвергшихся антибиотикотерапии с последующей обработкой фагопрепаратом *ex vivo* и анализом результатов, отчетливо показали, что фаги могут активно участвовать в модуляции антимикробной резистентности микробных сообществ [34].

Кроме того, фаги могут переносить гены вирулентности, что может значительно усилить патогенный потенциал бактерий [75, 354]. Этот феномен не только обогащает генетический пул бактерий, но и может способствовать появлению более вирулентных и антибиотикорезистентных штаммов. Примером хорошо известных фагов, связанных с бактериальной вирулентностью, являются фаги Н-19А, Н-19В и 933W [300, 303]. Эти бактериофаги кодируют шига-токсины (Stx1, Stx2), которые после интеграции профага в бактериальный геном начинают экспресироваться в клетке *E. coli* [300]. В результате относительно безвредные штаммы *E. coli* преобразуются в высоковирулентные формы [303]. Нитчатый фаг СТХphi, который может быть либо интегрированным в хромосому хозяина, либо плазмидным профагом, содержит в геноме оперон *ctxAB*, кодирующий субъединицы А и В холерного энтеротоксина, ответственного за основные клинические симптомы холеры [292, 303]. Некоторые фаги, инфицирующие *Corynebacterium diphtheriae*, могут переносить *tox* оперон, кодирующий дифтерийный токсин [143, 160].

Под влиянием некоторых фагов может происходить изменение антигенных свойств бактериального хозяина. Такие фаги обычно кодируют компоненты, модифицирующие антигенный профиль бактерий, включая капсульные полисахариды и поверхностные белки [75, 354]. Изменения в антигенном профиле бактерий позволяют им «маскироваться» от иммунной системы человека. Одним из характерных примеров является фаг P22, ассоциированный с *Salmonella enterica*, который участвует в гликозилировании бактериальных О-антигенных факторов 1 и 12 [232]. Другим наглядным примером является процесс О-ацетилирования О-антигена у *Shigella flexneri* под влиянием бактериофага Sf6 [97, 241]. Умеренные фаги, инфицирующие *Salmonella spp.* и *Shigella flexneri*, способны изменять О-антиген с помощью добавления глюкозила и/или О-ацетильной группы [30, 75, 97, 156, 241]. Такое влияние фагов на патогенные бактерии имеет важные клинические последствия, так как это может затруднить эффективность вакцинации и других методов иммунной профилактики. Исследование подобных механизмов модуляции антигенности может служить отправной точкой для разработки новых терапевтических стратегий против инфекционных заболеваний.

Фаги также способны переносить гены, которые помогают бактериям прикрепляться и проникать в эукариотические клетки, что улучшает их способность вызывать инфекции [75]. Например, фаг  $\lambda$  переносит ген *lom*, кодирующий белок внешней мембраны клеток *E. coli*, и таким образом увеличивает адгезию к буккальным эпителиальным клеткам в ротовой полости [350]. Фаг SM1 кодирует белки PblA и PblB, находящиеся на поверхности клеток *Streptococcus mitis*, что способствуют их адгезии к тромбоцитам [63]. Фаг SopE $\phi$  трансдуцирует эффектор системы секреции типа III, который способствует проникновению в эпителиальные клетки [196].

Профаги также могут способствовать становлению и развитию бактериальных инфекций, подавляя иммунный ответ хозяина или изменяя метаболизм бактерий [354].

Помимо всего вышперечисленного, профаги могут кодировать гены, усиливающие устойчивость бактерий к другим фагам через разнообразные механизмы, включая системы суперинфекции [214]. Например, у *Salmonella*-фага P22 присутствует ген исключения суперинфекции *sieA*, кодирующий белок внутренней мембраны, подобно другим исследованным фагам, таким как описанный выше *E. coli*-фаг HK97 (см. пункт 1.2.2.) или *Streptococcus*-фаг TP-J34, несущий ген *ltp* липопroteина [51, 174, 327, 341]. Эти белки, связываясь с цитоплазматической мембраной бактерии, блокируют введение ДНК родственных фагов или взаимодействие фагового рецептора с рецептором на поверхности бактерии. Другой пример стратегии исключения суперинфекции: *Pseudomonas*-фаг D3112 с геном *gr05*, кодирующий белок Tip. Tip белок уменьшает мобильность бактерий рода *Pseudomonas*, взаимодействуя с АТФазой, отвечающей за сборку пилей типа IV («type IV pilus» или TFPs). При этом Tip белок обеспечивает защиту от заражения фагом MP22 [23]. Подобный механизм особенно важен, учитывая, что многие *Pseudomonas*-фаги используют пили типа IV для инфицирования бактерий. Несмотря на многочисленные примеры фагов, кодирующих гены для предотвращения заражения другими фагами, вопрос о распространенности и разнообразии этих защитных механизмов остается открытым.

Научные исследования последних лет также подтверждают, что взаимодействие как вирулентных, так и умеренных фагов с бактериальными популяциями может активно способствовать формированию биопленок [141, 226, 272]. Например, инфекция *B. anthracis* штамма  $\Delta$ Sterne бактериофагами Vsp1, Wip1, Wip4 и Frp2 и последующая интеграция этих фагов в хозяйский геном приводит к образованию биопленок [141], которое обусловлено влиянием фаговой РНК-полимеразы на экспрессию генов бактерий. Такое влияние подчеркивает важную роль бактериофагов в регуляции фенотипических характеристик и приспособленности своих бактериальных хозяев в разнообразных экологических нишах.

Фаги могут способствовать процессу споруляции у бактерий или наоборот ингибировать его. Так, фаги PMB12 и SP10 при лизогении *B. subtilis* способны преобразовать неспорулирующие штаммы в спорулирующие [305]. При этом эти фаги способны обходить катаболитное ингибирование споруляции и экспрессии  $\alpha$ -амилазы, что демонстрирует их влияние на регуляцию метаболических процессов у *B. subtilis* [305].

Умеренные фаги могут быть полезны для популяции бактерий даже при индукции профага. Индукция профага может быть вызвана клеточными сигналами, сигналами окружающей среды или происходить спонтанно. Однако именно спонтанная индукция фагов представляет собой механизм, при котором популяция бактерий может оказывать давление на своих конкурентов [249]. В этом процессе фаги, находящиеся внутри бактериальных лизогенов, автономно индуцируются и начинают атаковать соседние клетки, не обладающие этим фагом. Хозяйская популяция защищена от действия «вышедших» фагов благодаря механизму «исключения суперинфекции». В результате спонтанная индукция фагов приводит к снижению численности конкурирующих бактерий. При этом уровень спонтанной индукции фагов может варьировать в зависимости от множества факторов, включая вид фагов, характер окружающей среды и состояние бактериальной популяции. Частота возникновения спонтанной индукции обычно низка, но она может приводить к выходу фагов в количестве от  $10^{-8}$  до  $10^{-5}$  фагов на клетку [190]. Однако стоит отметить, что со временем умеренные фаги могут интегрироваться в геном конкурирующей бактерии, что приводит к прекращению давления в пользу изначального хозяина. В таких случаях бактерии используют полилизогению, интегрируя в свой геном несколько фагов [346] и таким образом повышая свои шансы на выживание.

#### 1.4. Бактерии *Bacillus cereus sensu lato*

*B. cereus sensu lato* (s. l.) представляет собой группу грамположительных спорообразующих бактерий, принадлежащих к филлуму *Firmicutes* (синоним *Bacillota*) [126]. *B. cereus* s. l. включает экологически разнообразные виды и подвиды с широким спектром патогенности, несмотря на их высокое филогенетическое родство [126, 150]. Таксономическая классификация группы *B. cereus* s. l. известна своей запутанностью, которая возникла еще до широкого применения полногеномного секвенирования. Однако идеи, возникшие в «постгеномную» эру, не улучшили сложившуюся ситуацию, а лишь привели к совершенно противоречивым предложениям таксономических изменений в группе *B. cereus* s. l. и возникновению большего числа несоответствий и неясностей [118, 150]. В свете резкого увеличения в 2017 году числа геномных данных *B. cereus* s. l., стало ясно, что нехватка унифицированной таксономической системы и стандартизованных методов для идентификации новых геномных видов создаёт серьезные препятствия для эффективного взаимодействия между научными исследователями, медицинскими специалистами и экспертами в областях пищевой промышленности и сельского хозяйства. Эти проблемы увеличивают риск недооценки или неправильной оценки вирулентного потенциала этих бактерий, что может иметь серьезные последствия для здравоохранения [118].

Номенклатура группы *B. cereus* s. l. прошла долгий путь от описания нескольких видов на основе фенотипических характеристик до применения современных генетических методов для более точной идентификации и классификации. До 1998 года в состав группы *B. cereus* s. l. входило всего четыре вида: *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* (s. s.), *B. mycoides* и *B. thuringiensis*.

**Вид *B. anthracis*** (от лат «Anthrax», что переводится как «уголь») широко известен как облигатный патоген и возбудитель сибирской язвы. Характерной чертой этого смертельно опасного заболевания является появление черных язв, что и нашло свое отражение в наименовании данного вида бактерии. Вид *B. anthracis* впервые был официально описан еще в конце XIX века в работах таких исследователей как Пьер Райер, Казимир-Жозеф Давен, Роберт Кох и Луи Пастер [313]. Сибирская язва является острым инфекционным заболеванием, поражающим в основном домашний скот и диких копытных, однако вспышки сибирской язвы среди людей происходят ежегодно и требуют постоянного наблюдения и оценки риска [201, 337]. Патогенез сибирской язвы связывают с двумя факторами вирулентности: трехкомпонентным экзотоксином (фактора отека, летального фактора и защитного антигена) и антифагоцитарной капсулой, которые кодируются генами, расположенными на двух плаزمидах pXO1 и pXO2, соответственно [58, 223, 299]. Вирулентность может значительно снижаться или полностью отсутствовать у вакцинных штаммов *B. anthracis* при падении копийности вышеупомянутых плазмид или их потере [183]. Было показано, что уровень экспрессии таких генов как *atxA*, *pagR*,

*aspA* и *aspB* играет определяющую роль в контроле над производством факторов вирулентности [31, 175, 187, 290]. При этом плейотропный активатор PlcR не влияет на патогенность *B. anthracis* из-за наличия нонсенс-мутации в гене *plcR*, однако взаимодействие между регуляторными системами PlcR и AtxA, по-видимому, способствовало эволюционному отбору и развитию патогенности *B. anthracis* [340].

Сибирская язва может возникать в трех основных формах, определяемых способом попадания патогена в организм хозяина: кожной, ингаляционной и кишечной [223]. Кожная форма является наиболее распространенной (более 90%) и характеризуется образованием черных язв на коже, при этом уровень выздоровления пациентов при соответствующем и своевременном лечении препаратами, содержащими антибиотики и антитоксины, составляет более 98% [91, 223]. Ингаляционная форма инфекции возникает при вдыхании спор *B. anthracis* и характеризуется быстрым развитием заболевания и высокой смертностью даже при интенсивной терапии (более 45%) [91, 223]. Кишечная форма сибирской язвы связана с употреблением зараженной пищи и проявляется в форме сепсиса и гастроэнтерита, при этом процент летальности составляет более 40% [91].

**Вид *B. cereus sensu stricto* (s. s.)** (от лат. «сега» – «воск») был впервые описан в 1887 году в работе двух микробиологов Грейс Кольридж Франкленд и Перси Фарадей Франкленд [142, 312]. Типовой штамм *B. cereus* s. s. ATCC 14579 (VKM В-504<sup>T</sup>) обладает характерной узнаваемой «восковой» морфологией колоний при рассмотрении в микроскоп или на чашках Петри с кровяным агаром [312]. *B. cereus* s. s. характеризуется широким распространением в окружающей среде, включая почву, воду и растительные материалы [74, 312]. *B. cereus* s. s. может присутствовать в различных пищевых продуктах, таких как рис, мясо, молочные продукты, специи, а также в консервах и выступать как агент порчи продукции на различных стадиях технологического процесса производства и при её хранении [61, 93, 182, 247]. *B. cereus* s. s. включает в себя штаммы, имеющие клиническую значимость в контексте пищевых отравлений. Эти штаммы способны синтезировать различные токсины (четыре гемолизина, три фосфолипазы, токсин цереулид и три энтеротоксина: гемолизин BL (Hbl), негемолитический энтеротоксин (Nhe) и цитотоксин (CytK)), что ведет к разнообразным симптомам у инфицированных людей [93, 159, 227, 228, 312]. Два основных типа желудочно-кишечных заболеваний, индуцированных *B. cereus* s. s., различаются по клиническим проявлениям: эметический и диарейный синдромы [74, 93]. Эметическое отравление является результатом выработки эметического токсина – цереулида и сопровождается рвотой, наступающей обычно в течение нескольких часов после приема контаминированной пищи. Диарейное отравление обусловлено секрецией энтеротоксинов и проявляется в виде острой диареи с болями в животе. Этот синдром обычно развивается в течение нескольких часов после употребления зараженной

пищи и может длиться несколько дней. Кроме того, следует подчеркнуть генетическую вариабельность *B. cereus* s. s., а также наличие различных генетических факторов, определяющих его патогенный потенциал. Таким образом, *B. cereus* s. s. представляет собой значимый фактор риска в контексте пищевых отравлений.

**Вид *B. mycooides***, впервые описанный в 1889 году, получил своё наименование благодаря морфологии своих колоний, напоминающей корни (изначальное наименование *würzelbacillus* от нем. «wurzeln» – корень) [202]. *B. mycooides* обладает способностью образовывать «мицелиальные» структуры, которые приводят к образованию характерных колоний с ветвящейся морфологией. Этот вид широко распространен в почве, компостирующем материале и других природных средах. *B. mycooides* может выступать в роли ризосферных бактерий, где продуцирует фитогормоны и другие метаболиты, которые способствуют росту растений и повышению их устойчивости к стрессовым условиям, например индол-3-уксусную кислоту и гиббереллиновую кислоту [37, 211]. Кроме того, *B. mycooides* обладает потенциалом в области биоремедиации, проявляя способность разлагать различные типы загрязнений, например, тяжелые металлы, такие как кадмий [67]. Это открывает перспективы для разработки новых препаратов на основе *B. mycooides* и его метаболитов. Таким образом, *B. mycooides* имеет потенциал применения в областях сельского хозяйства и биотехнологии.

**Вид *B. thuringiensis*** был назван в честь немецкой провинции Тюрингия, где он впервые был выделен [128]. Эта бактерия обладает высокой патогенностью в отношении насекомых, в частности, для различных видов сельскохозяйственных вредителей. *B. thuringiensis* производит δ-эндотоксины: кристаллические (Cry) и цитолитические (Cyt) токсины, которые являются селективными инсектицидами, специфически действующими на пищеварительную систему насекомых [66]. Токсины, продуцируемые разными штаммами *B. thuringiensis*, могут быть эффективными против определенных групп вредителей, при этом не оказывая влияния на полезных насекомых и другие организмы [66]. Например, Cry токсины подразделяются на множество различных семейств в зависимости от их специфичности к различным видам насекомых: Cry1Ac токсичен для видов чешуекрылых, Cry2Ab – для различных чешуекрылых и некоторых видов жесткокрылых, Cry3Bb1 – для жуков, таких как западный кукурузный жук [41]. Cyt токсины в основном действуют против комаров [66]. Это делает препараты на основе *B. thuringiensis* ценным средством для биологического контроля насекомых-вредителей в сельском хозяйстве и защите растений [41, 66, 273]. Большинство известных генов *cry* находится на плазмидах, хотя некоторые локализованы на хромосомах [42]. Помимо сельского хозяйства, этот вид также привлекателен для исследований в области биотехнологии и медицины. Его токсины рассматриваются как потенциальные компоненты медицинских препаратов [42], а также

могут быть использованы для исследования молекулярных механизмов пищеварения и иммунитета насекомых.

В 1998 году к группе *B. cereus* s. l. были добавлены еще два вида на основе молекулярных методов исследования: *B. pseudomycooides* и *B. weihenstephanensis* [43, 248]. В 2013 году было опубликовано еще два новых вида на основе анализа их полных геномов и оценки средней нуклеотидной идентичности геномов (ANI): *B. toyonensis* и *B. cytotoxicus* [36, 115]. В 2016 г был классифицирован и описан как отдельный вид *B. wiedmannii* [44].

Таким образом, на июль 2023 г. в базе данных NCBI «taxonomy» группа *B. cereus* s. l. имеет 28 опубликованных видов: 23 видов официально принятых *B. anthracis*, *B. cereus* s. s., *B. mycooides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*, *B. cytotoxicus*, *B. wiedmannii*, *B. albus*, *B. gaemokensis*, *B. hominis*, *B. luti*, *B. manliponensis*, *B. mobilis*, *B. nitratireducens*, *B. pacificus*, *B. paramobilis*, *B. paramycooides*, *B. paranthracis*, *B. proteolyticus*, *B. sanguinis*, *B. tropicus* и 5 предложенных видов, которые на данный момент не являются официально принятыми видами согласно Международному кодексу номенклатуры прокариот [278]: *B. bombysepticus*, *B. cf. cereus V4.BE.30*, *B. clarus*, *B. samanii*, *B. shihchuchen*.

Однако существуют проблемы с классификацией геномовидов *B. cereus* s. l. в рамках таксономической структуры NCBI, поскольку в этих данных может быть недостаточно информации о методах определения видов, а вид может быть определен ошибочно. Для минимизации риска ошибок в классификации видов с использованием таксономии NCBI необходимо быть осторожными при принятии названий видов *B. cereus* s. l. в рамках NCBI. Для обеспечения точности лучше применять стандартизированные методы таксономического разграничения, основанного на ANI и маркерных генах, с использованием унифицированной номенклатуры.

### 1.5. Бактериофаги, инфицирующие представителей группы *Bacillus cereus sensu lato*

Количество исследований фагов продолжает расти, что приводит к постоянному обновлению информации о геномах бактериофагов, включая геномы *Bacillus*-фагов. На август 2023 года в базе данных NCBI было зарегистрировано 18332 полных геномов фагов (при запросе «"phage complete genome" and "viruses" [porgn: txid10239]»), среди которых 441 геном фагов, способных заражать бактерии рода *Bacillus*. В свою очередь в списке таксонов NCBI («NCBI taxonometry») фигурировало 20576 видов фагов, из которых 522 приходится на *Bacillus*-фаги. Однако стоит обратить внимание, что некоторые из фагов в таксономической базе могут быть зарегистрированы без доступных геномных данных, что объясняет разницу в цифрах. Из 441 генома *Bacillus*-фагов 14 принадлежат фагам, выделенным на территории Российской Федерации, 10 из которых были описаны научной группой лаборатории биологии вирусов бактерий [19, 35, 38, 195, 200, 201].

Помимо этого, в рамках составленной ICTV электронной таблицы текущей таксономии на июнь 2023 года имеется 4079 официально признанных видов фагов. Важно заметить, что лишь 136 из них инфицируют бактерий рода *Bacillus*. *Bacillus*-фаги включены в таксономическую иерархию, представляя собой часть реалма *Duplodnaviria*, царства *Heunggongvirae*, филлума *Uroviricota* и класса *Caudoviricetes*. Из 136 официально принятых видов *Bacillus*-фагов три фага были выделены на территории Российской Федерации: TsarBomba (г. Саратов) [130], B83 (профаг штамма *B. thuringiensis* ВКМ В-83) [38] и Киров (г. Киров) [19]. Оставшиеся 8 фагов, исследованные в лаборатории биологии вирусов бактерий, находятся на стадии заявки на новые виды и рода, включая фаги Sam46-T, Sam46-C и B13 [200, 201].

Существует специализированная база данных «*Bacillus* Phage Database» (BPD), в которой содержится информация о 168 геномах *Bacillus*-фагов. Стоит отметить, что BPD частично пересекается с NCBI по набору геномов. В то же время, BPD включает в себя 80 геномов *Bacillus*-фагов, которые не учтены в базе данных NCBI.

Новые фаги обнаруживаются все более быстрыми темпами, а число таксонов фагов растет с каждым годом [344, 347]. Несмотря на значительный объем знаний, накопленный научным сообществом о разнообразии бактериофагов, эксперты сходятся во мнении, что большинство таксонов фагов еще предстоит охарактеризовать [259, 344]. Бактериофаги, инфицирующие представителей группы *B. cereus*, имеют различные морфологические особенности, структуру и размеры генома, а также стратегии жизненного цикла [25]. Однако отсекуированные и таксономически классифицированные *Bacillus*-фаги, по-видимому, составляют лишь небольшую часть существующего разнообразия фагов. Геномы новых *Bacillus*-фагов зачастую имеют низкий процент полногеномной идентичности с геномами ранее известных фагов (менее 70%), что позволяет не только создавать новые таксономические рода [38, 153, 200, 201, 269], но и

значительно расширяет наши знания о генетике фагов, что способствует более эффективной и безопасной разработке препаратов на их основе.

Несмотря на существующее на данный момент ограниченное количество описанных таксономических видов *Bacillus*-инфицирующих фагов, недавние исследования демонстрируют примеры применения этих фагов и их литических белков для диагностики и лечения инфекций, вызванных *Bacillus*-патогенами как в клинических, так и в экспериментальных условиях [35, 116, 203, 230, 268, 283, 342]. Кроме того, было описано применение *Bacillus*-инфицирующих фагов в пищевой промышленности для диагностики бактериальных патогенов, а также в процессе производства и консервации пищевых продуктов для предотвращения бактериальной контаминации с целью увеличения сроков хранения [19, 25, 54, 192, 193].

Наиболее известный фаг, инфицирующий представителей рода *Bacillus* – фаг W $\beta$ . W $\beta$  и его литический вариант  $\gamma$ -фаг (Gamma) обладают способностью инфицировать штаммы *B. anthracis*. Этот фаг был использован для более глубокого изучения механизмов инфекции и влияния бактериофагов на бактерии, что позволило лучше понять патогенность этих микроорганизмов [296]. Кроме того, были созданы модифицированные фаги W $\beta$ ::luxAB и W $\beta$ ::luxAB-2, способные передавать биолюминесценцию инфицированным клеткам. Эти фаги могут быть использованы для обнаружения жизнеспособных спор в загрязненных образцах воды и продуктах питания [116, 283]. Такой метод обнаружения может иметь большое значение как для экологических исследований и обеспечения безопасности водных ресурсов, так и для контроля качества пищевых продуктов. Интересно отметить, что анализ, основанный на использовании  $\gamma$ -фагов в качестве метода идентификации *B. anthracis*, в 2005 году был одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (от англ «Food and Drug Administration», сокращенно FDA) [26, 295]. Таким образом, применение различных фагов в борьбе с *B. anthracis* и другими патогенными бактериями группы *B. cereus* s. l. играет важную роль в медицинских и ветеринарных исследованиях, а также способствует обеспечению безопасности общества от потенциальных биотеррористических угроз [274].

Фаг  $\Phi$ 29, также известный как phi29, обладает уникальным механизмом упаковки ДНК, поскольку упаковочный ДНК комплекс phi29 включает упаковочную РНК, также известную как pRNA (от англ «ATP-binding packaging RNA»). Изучение мотора упаковки ДНК phi29 и его сборки *in vitro* имеют важное значение, поскольку этот механизм может применяться в медицине и биотехнологии, включая возможную доставку лекарств, распознавание отдельных молекул, создание систем хранения данных сверхвысокой плотности на основе биомолекул и даже использование в качестве потенциальных пор для секвенирования [218]. Кроме того, ДНК-полимераза фага phi29 используется в методе амплификации с множественным смещением (от англ. «Multiple Displacement Amplification», сокращенно MDA), который является

предпочтительным при исследованиях однонуклеотидного полиморфизма (от англ. «Single Nucleotide Variations», сокращенно SNV) в одиночных клетках. Это связано с уникальными свойствами ДНК-полимеразы phi29, такими как высокая процессивность и точность [186].

Исследования показывают, что не только фаги, но и их белки, такие как эндолизины, могут быть использованы в качестве агентов против бактериальных инфекций. Например, эндолизин LysB4 вирулентного фага B4, эндолизин Ply57 фага Izhevsk и эндолизин LysPBC1 фага PBC1 могут потенциально использоваться для борьбы с бактериями группы *B. cereus* s. l. [35, 92, 94, 203].

Некоторые *Bacillus*-инфицирующие фаги могут оказывать негативное воздействие на биотехнологически важные штаммы *B. cereus* s. l. Например, умеренный фаг BMBtp2 может заражать полезные штаммы *B. thuringiensis*, которые используются в биопрепаратах для биологического контроля насекомых-вредителей в сельском хозяйстве. Действие этих умеренных фагов может привести к серьезным убыткам, вызывая гибель штаммов *B. thuringiensis*, что приводит к снижению урожайности до 50-80% в некоторых партиях сельскохозяйственной продукции [103]. Фаги JL, Shanette и Basilisk известны своей способностью атаковать представителей группы *B. cereus* s. l., включая *B. thuringiensis* и *B. cereus*. Однако в геномах этих фагов было выявлено несколько потенциальных факторов вирулентности, таких как белки TerD и TerC, связанные с устойчивостью к теллуру [336].

Таким образом, на данный момент *Bacillus*-фаги и их белки представляют значительный интерес для научных и прикладных исследований, с потенциалом успешного применения их в различных областях, включая сельское хозяйство, биотехнологию и медицину. Тем не менее, фаги, специфически инфицирующие представителей группы *B. cereus*, остаются малоизученными, несмотря на их важность. В Российской Федерации описано и охарактеризовано ограниченное количество таких фагов, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований в этой области для полного раскрытия потенциала *Bacillus*-фагов и их применения в различных сферах.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы

#### 2.1.1. Объекты исследования

##### *Штаммы бактериофагов*

В данной работе в качестве объектов исследования были использованы четыре штамма бактериофагов: *Samaravirus samarensis* vB\_VcM\_Sam46-T, *Samaravirus samarensis* vB\_VcM\_Sam46-C, *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13. Три из четырех фагов были выделены из почвенных образцов (фаги Sam46-T, Sam46-C, и Kirov) и один был индуцирован из формы профага (фаг B13) из лизогенного бактериального штамма *B. cereus* ВКМ В-13 с помощью митомицина С.

##### *Штаммы бактерий*

Большинство штаммов бактерий, использованных в данном исследовании, были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Более подробная информация содержится в Таблице 1.

**Таблица 1.** Бактериальные штаммы *B. cereus* s. l., использованные в данном исследовании

№	Вид	Штамм	Источник*
1	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-13	ВКМ
2	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-15	ВКМ
3	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-370	ВКМ
4	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-373	ВКМ
5	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-374	ВКМ
6	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-383	ВКМ
7	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-445	ВКМ
8	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-473	ВКМ
9	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-491	ВКМ
10	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-504 <sup>T</sup>	ВКМ
11	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-681	ВКМ
12	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-682	ВКМ
13	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-683	ВКМ
14	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-684	ВКМ
15	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-686	ВКМ
16	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-687	ВКМ
17	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-688	ВКМ
18	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-771	ВКМ

19	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-810	ВКМ
20	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-811	ВКМ
21	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-812	ВКМ
22	<i>B. tropicus</i>	АТСС 4342	АТСС
23	<i>B. cereus</i>	АТСС 14893 (IP 5832)	«Бактисубтил» Галеника, Белград, Югославия Контр. № 47660887 (до VIII 1990)
24	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-83	ВКМ
25	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-84	ВКМ
26	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-85	ВКМ
27	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-440	ВКМ
28	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-443	ВКМ
29	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-446	ВКМ
30	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-447	ВКМ
31	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-450	ВКМ
32	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-453	ВКМ
33	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-454	ВКМ
34	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-1555	ВКМ
35	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-1557	ВКМ
36	<i>B. thuringiensis</i>	АТСС 35646	Лабораторная коллекция
37	<i>B. weihenstephanensis</i>	КВАВ4	Лабораторная коллекция
38	<i>B. flexus</i>	V1	Лабораторная коллекция

\* Аббревиатура источников штаммов: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов; АТСС – American Type Culture Collection (Коллекция американских типовых культур).

### 2.1.2. Реактивы, ферменты, коммерческие наборы

#### Реактивы:

Хлорид магния, Альдоса, Москва, Россия. Хлорид кальция, Дальхимфарм, Хабаровск, Россия. Уксусная кислота, соляная кислота, хлорид натрия, КупавнаРеактив, Старая Купавна, Россия. Хлорид цезия, бромфеноловый синий, Реахим, Старая Купавна, Россия. Трихлорметан, ЭКОС-1, Москва, Россия. Агароза, Bio-Rad, Ричмонд, Калифорния, США. Триптон, дрожжевой экстракт, агар-агар бактериологический европейский, фенол, Dia-M, Москва, Россия. Желатин, Difco, Детройт, Мичиган, США. Сульфат магния, Labochem international, Рейнхаузен, Германия. Глицерин, полиэтиленгликоль 8000 (ПЭГ), одноосновный фосфат натрия, дигидрофосфат

натрия, гидроксид натрия, ацетат натрия, ацетат калия, изопропанол, ледяная уксусная кислота, митомицин С, PanReac Applichem, Германия. Натрия додецилсульфат (SDS), этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), глицин Serva Electrophoresis, Гейдельберг, Германия. Трис(гидроксиметил)аминометан (Tris-base), Sigma-Aldrich, Берлингтон, Массачусетс, США. Уранилацетат, любезно предоставлен Васильевым В. Д.

*Ферменты:*

PacI, терминальная трансфераза, New England Biolabs (NEB), Ипсуич, Массачусетс, США. ДНКаза I, РНКаза А, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США. HindIII, XbaI, BamHI, PstI, BglII, TaqSE, SibEnzyme, Новосибирск, Россия.

*Коммерческие наборы:*

Набор для выделения ДНК «DNeasy Blood & Tissue Kit», Qiagen, Хильдене, Германия. Набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «Cleanup Mini», Евроген, Москва, Россия. Набор КАРА HyperPlus для подготовки библиотеки ДНК для секвенирования на платформе MiSeq Illumina, Roche Sequencing Solutions, Роткройц, Швейцария. Набор TruSeq для подготовки библиотеки ДНК для секвенирования на платформе MiSeq Illumina, Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США.

### **2.1.3. Состав растворов и сред для культивирования**

*Вода разной степени очистки:*

dH<sub>2</sub>O (дистиллят) – вода, очищенная путем дистилляции, применялась для приготовления буферов для электрофореза и питательных сред.

Milli-Q H<sub>2</sub>O – вода, очищенная с помощью прибора для фильтрации (Millipore, США), применялась для приготовления реакционных смесей с участием ДНК и РНК.

*Питательные среды:*

Lysogeny Broth, LB: 10,0 г/л триптона, 5,0 г/л дрожжевого экстракта, 10,0 г/л хлорида натрия, pH 7,5.

1,5% LB-агар: 10,0 г/л триптона, 5,0 г/л дрожжевого экстракта, 10,0 г/л натрия хлорида, 15,0 г/л бактоагара, pH 7,5, с добавлением 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>.

0,75% LB-агар: 10,0 г/л триптона, 5,0 г/л дрожжевого экстракта, 10,0 г/л натрия хлорида, 7,5 г/л бактоагара, pH 7,5, с добавлением 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>.

0,5% LB-агар: 10,0 г/л триптона, 5,0 г/л дрожжевого экстракта, 10,0 г/л натрия хлорида, 5,0 г/л бактоагара, pH 7,5, с добавлением 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>.

*Буферы и Растворы:*

SM буфер: 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,01% желатин.

SM+ буфер: 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,01% желатин, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>.

Стоковый раствор митомицина С: 50 мкг/мл митомицин С, 0,1 М MgSO<sub>4</sub>. Для экспериментов по индукции профага из лизогенного штамма финальная концентрации митомицина С в растворе составила 0,5 мкг/мл.

*Буферные растворы с рН от 2,2 до 12,0* готовили согласно справочнику биохимика [16]: Глицин-HCl буфер (рН 2,2 и рН 3,0), натрий-ацетатный буфер (рН 4,0 и рН 5,0), фосфатный буфер (рН 6,0, рН 7,0 и рН 8,0), глицин-NaOH буфер (рН 9,0 и рН 10,0), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH буфер (рН 11,0 и рН 12,0).

*Буферные растворы для электрофореза в агарозном геле:*

Стоковый 50× Трис-ацетатный буфер (ТАЕ) рН 8,5 – 242,2 г Tris-base, 18,615 г EDTA, примерно 89,61 мл ледяной уксусной кислоты (следить за рН при добавлении), довести dH<sub>2</sub>O до 1 л. Приготовление 1× ТАЕ – 20 мл 50× ТАЕ буфера довести dH<sub>2</sub>O до 1 л.

Загрузочный 10× буфер для внесения ДНК-образцов в агарозный гель: 0,1 М EDTA, 0,5% бромфеноловый синий, 0,5% SDS, 50% глицерин. Для получения 5× и 2× буферов 10× буфер разводили Milli-Q H<sub>2</sub>O.

#### **2.1.4. Оборудование и приборы**

Автоматические пипетки для дозирования: для работы с бактериофагами и клеточными культурами использовали набор пипеток Ленпипет Лайт (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия), для работы с ДНК использовали набор пипеток Research Plus (Eppendorf, США); весы настольные: Sartorius laboratory L610D (Sartorius Group, Германия) и Sartorius handy H110 (Sartorius Group, Германия); мини-центрифуга-вортекс Microspin модель FV-2400 (BioSan, Латвия); вортекс модель Paramix II (Julabo Labortechnik GmbH, Германия); универсальный вортекс Multi Speed модель MSV-3500 (BioSan, Латвия); центрифуги настольные: без охлаждения MiniSpin (Eppendorf, США) и с охлаждением MicroCL 17R (Thermo Fisher Scientific, США), центрифуга 5810R (Eppendorf, США), ультрацентрифуга L7-55 (Beckman Coulter Inc., США); программированный ДНК-амплификатор Mastercycler PRO (Eppendorf, Германия); рН-метр стационарный (OHAUS, Швейцария): измерительный блок Starter 5000, рН-электрод модель ST310 и отдельный держатель электрода; термостат BioSan CH-100 (BioSan, Латвия); микропланшетный ридер FilterMax F5 (Molecular Devices, США); камеры для горизонтального электрофореза модели Sub Cell GT и модели Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США); источник питания Эльф-8 (ДНК-технология, Россия); система гель-документирования, состоящая из трансиллюминатора ультрафиолетового модель TPC-20.C (Vilber Lourmat, Франция) и непосредственно системы документации и анализа результатов электрофореза в агарозном геле Kodak EDAS 290 (Eastman Kodak Company, США); отдельный трансиллюминатор ультрафиолетовый модель TSP-20.MC (Vilber Lourmat, Франция), спектрофотометр Эксперт-003

(Эконикс-Эксперт, Россия), спектрофотометр NanoPhotometer Pearl P-360 (Implen GmbH, Германия), термостатируемая водяная баня модель WB100-2 (JOANLAB, Китай); орбитальный шейкер модель PSU-10i (BioSan, Латвия); орбитальный шейкер VXR basic VibraX (IKA, Германия); мульти-ротатор модель Multi Bio RS-24 (BioSan, Латвия); магнитные мешалки: модель MMS-3000 (BioSan, Латвия) и модель MS-3000 (BioSan, Латвия); магнитная мешалка с нагреванием модель MM 2A (Laboratorní přístroj, Чехия); автоклав модель Prestige Medical Classic 2100 (Prestige Medical, Великобритания); льдогенератор модель KF85 (PORKKA, Финляндия); холодильник на +2-+8°C (Haier, Китай); морозильник до -20°C (Libherr, Германия); низкотемпературный морозильник до -80°C модель Premium U410 (Eppendorpp, США); сканер HP Scanjet G4050 (HP, Китай); настольный принтер для печати этикеток Godex G530 (Godex, Тайвань); просвечивающий электронный микроскоп JEM-100C (JEOL, Япония); секвенатор Illumina MiSeq (Illumina Inc, США).

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Общие методики**

*Метод инокулирующего штриха (метод штриха или метод посева штрихом):* посев бактериального штамма с помощью бактериологической петли на чашку Петри с 1,5% LB-агаром, с последующей ее инкубацией в течение 16 ч при 28 или 37°C.

*Культивирование бактериальных культур и бактериофагов:* бактериальные культуры и бактериофаги выращивали при температурах от 28 до 37°C (в зависимости от протокола исследуемого бактериофага и физиологических свойств чувствительного бактериального штамма) при встряхивании со скоростью примерно 120 об/мин.

*Получение замороженных бактериальных культур:* для сокращения времени, затрачиваемого на проведение экспериментов (метод агаровых слоев и метод спот-теста) и получения стабильных бактериальных газонов на чашках Петри, бактериальные культуры предварительно культивировали и замораживали. Для этого в 5 мл LB культивировали бактериальные культуры при 28°C в течение 16 ч с последующим пересевом в 250-мл колбы Эрленмейера с 50 мл LB в соотношении 1:100. Колбы инкубировали при 28°C с периодическим измерением мутности бактериальных культур при 590 нм ( $OD_{590}$ ), до достижения  $OD_{590}=1 - 1,2$  (поздняя экспоненциальная фаза). Далее культуры центрифугировали при 5000 g, в течение 10 мин, при 16°C. Жидкость после осаждения удаляли, а осадок клеток ресуспендировали в LB, содержащей 20% глицерина. Полученную смесь распределяли по 100 мкл в 1,5-мл эппендорфы и замораживали при -80°C. Перед использованием пробирки размораживали в течение 20 мин при температуре 25°C.

*Метод агаровых слоев (посев двухслойным методом или метод титрования по Грациа):* использовали для детекции отдельных бляшек, определения их морфологии, а также для точного подсчета титра фагов (БОЕ/мл). Аликвоту лизата после индукции или аликвоту препарата бактериофага смешивали с 25-30 мкл размороженной бактериальной культуры чувствительного штамма и 3-мя мл 0,5% LB-агара с добавлением 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Полученную смесь после кратковременного встряхивания на вортексе помещали на чашки Петри диаметром 9 см с предварительно приготовленным 1,5% LB-агаром и инкубировали в течение 16 ч при 28 или 37°C (в зависимости от протокола культивирования фага).

*Метод спот-тест:* использовали для быстрого определения титра препарата фага и тестирования митомициновых лизатов. Для этого 25-30 мкл размороженных бактериальных культур смешивали с 3 мл расплавленного мягкого 0,5% LB агара с добавлением 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Смесь перемешивали на вортексе и выливали в чашки Петри с предварительно подготовленным 1,5% LB-агаром. Чашки оставляли на 0,5 – 1 ч при комнатной температуре. Для определения титра препарата фага готовились серийные разведения с шагом 10, в качестве буфера для разведений брали SM+ буфер. Далее на чашку с формирующимся газоном бактериальных штаммов наносили по 3 мкл из каждого серийного разведения препарата фага (для определения титра) или по 10 мкл в случае тестирования митомициновых лизатов на наличие индуцированных фагов. Чашки инкубировали в течение 24 ч при 28°C или 37°C (в зависимости от протокола культивирования фага).

## **2.2.2. Выделение, очистка и получение препаратов бактериофагов**

### ***Бактериофаги Sam46-T и Sam46-C***

В качестве штамма для детекции фага и получения его в высоком титре был использован чувствительный штамм *B. cereus* ВКМ В-370 (номер доступа GenBank: NZ\_CP070339.1) [102]. Штамм *B. cereus* ВКМ В-370 культивировали в 10 мл среды LB с добавлением 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub> до OD<sub>590</sub> = 0,6. К культуре клеток добавляли 1 г образца почвы и смесь инкубировали в течение 2 ч при 37°C до видимого снижения оптической плотности. Полученную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g. Для детекции присутствия фагов в полученном супернатанте использовали метод агаровых слоев (см. пункт 2.2.1.). Далее одиночные бляшки переносили в 1,5-мл пробирки эппендорф с 750 мкл буфера SM+ и 75 мкл хлороформа, после чего смесь инкубировали в течение ночи при 4°C при встряхивании (выставленное значение 300) на шейкере VXR basic Vibrax для экстракции фага. Экстракты бляшек центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и 50 мкл супернатантов переносили в 48-луночный планшет, содержащий 500 мкл LB (с добавлением 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>) и 5 мкл культуры *B. cereus* ВКМ В-370 (OD<sub>590</sub> = 0,6) и инкубировали 16 ч при 37°C до снижения оптической плотности.

Культуры с наименьшими оптическими плотностями переносили в 1,5-мл пробирки эппендорф с 50 мкл хлороформа. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием в течение 10 мин при 12000 g при 16°C. Полученные лизаты титровали на присутствие фагов с помощью метода агаровых слоев (см. пункт 2.2.1.). Для исключения присутствия других фагов с морфологически идентичными бляшками циклы экстракции-культивирования повторяли пять раз. Титр финальной фаговой суспензии определяли методом спот-тест (см. пункт 2.2.1.).

#### *Получение препарата фага высокого титра*

Для получения препаратов фагов Sam46-T и Sam46-C в высоком титре 100 мкл культуры ВКМ В-370 ( $OD_{590} = 1,2$ ) переносили в колбу на 250 мл с 50 мл LB, содержащей 10 mM  $CaCl_2$  и 10 mM  $MgCl_2$ , и инкубировали при 28°C при встряхивании до достижения оптической плотности 0,2 (для штамма ВКМ В-370 при  $OD_{590}=0,2$  количество колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл составляет примерно  $1-2 \times 10^7$ ). Затем добавляли полученную суспензию фага, чтобы множественность инфекции (МИ) составила 0,01. Фаго-бактериальную смесь инкубировали в течение 5-6 ч с периодическим контролем оптической плотности. После этого добавляли 2,8 г NaCl и 500 мкл хлороформа и продолжали инкубацию еще 30 мин. Затем смесь центрифугировали при 10000 g в течение 10 минут при 16°C для удаления клеточного дебриса с последующим добавлением ПЭГ 8000 до конечной концентрации 10% для осаждения фага. После инкубации в течение ночи при 4°C смесь снова центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин 16°C, осадок растворяли в 5 мл SM+ буфера и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм, с последующим определением титра с помощью метода спот-теста (см. пункт 2.2.1.). Полученные концентрированные с помощью осаждения ПЭГ препараты Sam46-T и Sam46-C хранили при 4°C.

#### *Бактериофаг Киров*

В качестве штамма для детекции фага и получения его в высоком титре был использован чувствительный штамм *B. tropicus* ATCC 4342. Выделение фага Киров из почвенного образца, а также последующее культивирование и очистка производилась по аналогичному протоколу, описанному для бактериофагов Sam46-T и Sam46-C. Исключение составляет время инкубации (4 ч) фаго-бактериальной смеси для получения препарата фага Киров в высоком титре.

#### *Бактериофаг В13*

Бактериофаг В13 был индуцирован из лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-13 с использованием митомицина С в качестве индуктора. Для этого бактериальный штамм культивировали в лунках 48-луночного микропланшета: ночные культуры добавляли в соотношении 1:100 к 495 мкл LB, содержащий 10 mM  $CaCl_2$  и 10 mM  $MgCl_2$ . Микропланшет инкубировали при встряхивании при 28°C, измеряя оптическую плотность при 595 нм каждые 10 минут. После того как культуры достигали  $OD_{595}=0,2 - 0,3$ , в лунки добавляли 5 мкл митомицина

С (50 мкг/мл) до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Для того, чтобы оценить влияние митомицина С на кинетику роста бактериальных культур, в контрольные образцы (без митомицина С), содержащие культуру штамма *B. cereus* ВКМ В-13, добавляли 5 мкл 0,1 М MgSO<sub>4</sub>. При этом в качестве контролей выступали образцы, содержащие LB с добавлением 5 мкл митомицина С (50 мкг/мл) и без (добавляли 5 мкл 0,1 М MgSO<sub>4</sub>). Далее бактериальные культуры продолжали инкубировать при 28°C до значимого снижения оптической плотности. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 3000 g в течение 12 мин при 4°C. Контрольные образцы, содержащие LB с митомицином и без, также подвергались центрифугированию. Супернатанты всех образцов переносили в новые 1,5-мл эппендорфы и добавляли 3 мкл хлороформа, далее полученные лизаты хранили при 4°C не более 3-х дней.

Полученный митомициновый лизат штамма ВКМ В-13 тестировали спот-тестом (см. пункт 2.2.1.) на бактериальных газонах 38 штаммов рода *Bacillus* (Таблица 1). Положительным результатом теста на присутствие бактериофагов в препарате считали наличие зоны лизиса в месте нанесения лизата. В случае контрольного раствора (LB с добавлением митомицина С) лизиса бактериального газона не наблюдалось. Для детекции бактериофага был выбран штамм *B. cereus* ВКМ В-370, на газоне которого митомицин-индуцированный лизат показал наибольший положительный эффект. Для этого сначала митомициновый лизат штамма В-13 был протестирован с помощью серийных разведений на газоне чувствительного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 методом агаровых слоев (см. пункт 2.2.1.) для получения одиночных бляшек. Далее для экстракции фага одиночную бляшку переносили в 1,5-мл эппендорф с 750 мкл SM+ буфера и 75 мкл хлороформа с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C на орбитальном шейкере. Полученный фаговый экстракт центрифугировали при 3000 g в течение 12 мин при 4°C. Для культивирования фага 50 мкл фагового экстракта смешивали с 5 мкл размороженной бактериальной культурой и 445 мкл LB с 10 mM CaCl<sub>2</sub> и 10 mM MgCl<sub>2</sub> в лунке 48-луночного микропланшета. В качестве контроля для оценки активности фага использовали неинфицированную бактериальную культуру (с добавлением 50 мкл SM+ буфера вместо фагового экстракта). Микропланшет инкубировали при встряхивании при 28°C 16 ч. После образцы из планшета вновь центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин при 4°C и добавляли к супернатантам 10 мкл хлороформа. Полученную суспензию фага использовали для детекции бляшек с помощью метода агаровых слоев с последующей повторной экстракцией. Циклы экстракции-культивирования повторяли три раза, с целью избежать контаминации фаговой суспензии В13 другими бактериофагами.

Для получения препарата фага В13 в высоком титре использовали аналогичный протокол, что и для бактериофагов Sam46-T и Sam46-C, с некоторыми изменениями: температура

инкубации (28°C) и время инкубации фаго-бактериальной смеси (6-7 ч) для получения препарата в высоком титре.

### **2.2.3. Морфология бляшек бактериофагов**

Для определения морфологического типа бляшек фагов использовали метод агаровых слоев (см. пункт 2.2.1.).

### **2.2.4. Трансмиссионная электронная микроскопия**

Приготовление фаговых препаратов для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) проводили по единому протоколу: 2-3 мл препарата фага с высоким титром использовали для получения очищенной суспензии фага центрифугированием в градиенте плотности CsCl (с предварительно сформированным градиентом: 1 мл – CsCl: 1,3 г/мл, 2 мл – 1,4 г/мл, 2 мл – 1,5 г/мл, 2 мл – 1,6 г/мл и 2 мл – 1,7 г/мл). Центрифугирование проводили при 10°C, 110862,3 g, в течение 2,5 ч в ультрацентрифуге L7-55 Beckman Coulter с использованием ротора SW 40 Ti. После центрифугирования фаговую фракцию аккуратно отбирали и определяли титр полученного препарата фага в хлористом цезии методом спот-теста (см. пункт 2.2.1.). Далее очищенные фаговый препарат использовали для ТЭМ: суспензию фага наносили на медные сетки 400 mesh, покрытые углерод-формваром, и отрицательно окрашивали 1% уранилацетатом, после чего анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-100C (JEOL, Япония) при напряжении 80 кВ. Изображения были получены на пленку Kodak SO-163 (Kodak, кат. № 74144, Хатфилд, Пенсильвания, США). Средние значения размерности фагового вириона получали при измерении 10 фаговых частиц по отношению к линейке масштаба, полученной с помощью микроскопа. Для анализа и обработки изображений использовали ImageJ версии 1.53e (<https://imagej.nih.gov/ij/notes.html>).

### **2.2.5. Диапазон чувствительных к фаговой инфекции штаммов группы *Bacillus cereus***

Определение диапазона чувствительных штаммов для всех исследуемых бактериофагов проводили единообразно. Спектр специфичности для каждого фага оценивали на 38 штаммах группы *B. cereus* s. l. методом спот-теста с использованием серийных разведений тестируемого препарата (см. пункт 2.2.1.).

### 2.2.6. Секвенирование, сборка и аннотация геномов бактериофагов

Выделение ДНК из препаратов бактериофагов проводили с использованием двух методов: классического фенол-хлороформного метода и метода с использованием коммерческого набора для экстракции ДНК. ДНК из препаратов бактериофагов Sam46-T ( $2 \times 10^{11}$  БОЕ/мл), Sam46-C ( $3 \times 10^{10}$  БОЕ/мл) и Kirou ( $4 \times 10^{11}$  БОЕ/мл) экстрагировали с использованием стандартного протокола экстракции фенолом-хлороформом, описанного Sambrook et al. [294] (без предварительной обработки ДНКазой I и РНКазой А препаратов фагов). Препарат фага B13 ( $8 \times 10^8$  БОЕ/мл) сначала инкубировали с ДНКазой I (#M033S) и РНКазой А (EN531) в соответствии с протоколом производителя, а затем фаговую ДНК экстрагировали с использованием набора «DNeasy Blood & Tissue Kit» (Qiagen, США) в соответствии с протоколом, модифицированным специально под выделение ДНК бактериофагов [197].

Библиотеки секвенирования были получены с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК TruSeq (Illumina Inc, США) и секвенированы на платформе Illumina MiSeq (Illumina Inc, США). Контроль качества полученных прочтений проводили с помощью программы FastQC v.0.11.9 [33]. Выбор подмножества исходных данных (subsampling) из двух больших парных файлов FASTQ проводили с использованием Seqtk v.0.5.0 [219]. Тримминг чтений (ридов) производили с помощью Trimmomatic v0.39 [72].

Сборка геномов *de novo* осуществлялась с помощью программного обеспечения SPAdes v.3.11.0 – SPAdes v.3.12.0 [309]. Для анализа сборки и визуализации графов сборки использовалась программа Bandage v. 0.8.1 [59]. Открытые рамки считывания (ОРС) идентифицировали с помощью программы RASTtk v.2.0 [284]. Предполагаемые функции ОРС были предсказаны с помощью BLASTp (NCBI) [62] и HHPred [306]. ARAGORN v1.2.41 [217] использовали для идентификации генов тРНК и транспортно-мессенджерных РНК. Карты геномов бактериофагов были визуализированы с помощью BRIG v.0.95 [70]. При визуализации карты геномов гены (согласно функциям белков, которые они кодируют) были разделены на несколько функциональных модулей: модуль упаковки ДНК, структурный модуль, литический модуль, модуль репликации и рекомбинации ДНК, модуль регуляции транскрипции, модуль поддержания состояния профага и модуль метаболизма нуклеиновых кислот. При описании функциональных модулей бактериофагов (пункты 3.1.2., 3.2.2. и 3.3.2) для каждой белок-кодирующей последовательности в круглых скобках указан «protein\_id».

Кроме того, для изучения необычной структуры малой субъединицы терминазы бактериофагов Sam46-T и Sam46-C был выполнен сравнительный анализ последовательностей N-терминального «FtsK\_gamma» домена малой субъединицы терминазы исследуемых фагов и хорошо изученных «FtsK\_gamma» доменов, имеющих бактериальное происхождение. Для аминокислотного выравнивания использовали следующие последовательности: Sam46:

ID\_protein QIQ61202.1, 11–70 a.o.; *B. cereus*: SME41550.1, 727–786 a.o.; *B. subtilis*: WP\_003231869, 721–780 a.o.; *E. coli*: NP\_415410.1, 1266–1325 a.o.; *L. lactis*: WP\_003129457.1, 693–752 a.o.; *P. aeruginosa*: ARG86759.1, 747–806 a.o. Филогенетическая сеть была построена из выравнивания последовательностей «FtsK\_gamma» доменов (длиной 60 а.о.) в MAFFT версии 7 (с параметрами по умолчанию) [199] с помощью «Neighbor-Net» анализа (основанного на алгоритме Neighbor-Joining) [80, 293] и визуализирована с помощью SplitTree4 v.4.16.1 с параметром «bootstrap» равным 1000 [178].

### 2.2.7. Определение стратегии упаковки ДНК

Для определения стратегии упаковки ДНК и концов генома исследуемых бактериофагов использовали биоинформатический (PhageTerm и филогенетический анализы) и экспериментальные методы исследования (рестрикционный анализ и метод RAGE) [10].

Тип концов генома предсказывали вычислительным путем с использованием подхода, основанного на «High Occurrence Read Termini» [297, 362], реализованного в инструменте PhageTerm (на сервере Galaxy Pasteur, <https://galaxy.pasteur.fr/>) [271]. В основе данного метода предсказания концов фагового генома заложен поиск отклонений в покрытии при выравнивании прочтений на собранную геномную последовательность [291]. Важно отметить, что для этого анализа имеются некоторые ограничения использования (см. пункт 4.1.), поэтому поиск концов генома с помощью PhageTerm подходит не для всех бактериофагов.

Для предсказания стратегии упаковки геномов исследуемых фагов был проведен филогенетический анализ больших субъединиц терминаз [307]. Для этого аминокислотные последовательности больших субъединиц терминаз (Приложение А, Таблица П1) были выровнены с помощью MAFFT v7.490 [199] с использованием настроек по умолчанию. Филограмма была построена из выравнивания в MEGA X [236] с использованием метода Neighbor-Joining с параметром «bootstrap», равным 1000. Филогенетическое дерево белков было визуализировано в программе FigTree v1.4.4 [280] с укоренением.

Тип концов генома был также детектирован экспериментально методом рестрикционного анализа с использованием соответствующего набора эндонуклеаз рестрикции, подобранного для каждого конкретного бактериофага: в случае Sam46 – HindIII и XbaI; Kirov – HindIII, XbaI и PacI; B13 – HindIII, BamHI, BglII и PstI. Электрофорез проводили в 0,75% агарозном геле. Рестрикционный анализ *in silico* проводили на веб-сервере «NEBCutter» версий 2.0 – v3.0.16 [352] (<https://nc3.neb.com/NEBCutter/>).

Точную позицию концов геномов исследуемых фагов определяли путем секвенирования терминальных фрагментов ДНК, полученных методом быстрой амплификации геномных концов (Rapid Amplification of Genomic Ends или сокращенно RAGE). Принимая во внимание наличие

разных механизмов упаковки ДНК у исследуемых фагов и как следствие образования разных концов геномов, метод RAGE был модифицирован для каждого конкретного типа упаковки ДНК фага. В случае фага Sam46 («headful» механизм) для определения *pac*-сайта сначала проводили рестрикционный анализ ДНК, а затем специфические рестрикционные *pac*-фрагменты экстрагировали с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля (Евроген, Россия). Очищенные фрагменты использовали для реакции удлинения гомополимерных хвостов (присоединение дезоксинуклеотидов dATP) на 3'-концах ДНК с помощью терминальной трансферазы (кат. № M0315L). В случае фагов Kirov («Short DTR» механизм) и B13 («3'-COS» механизм) для реакции маркировки 3'-концов ДНК использовали в качестве матриц очищенную геномную ДНК этих фагов. Стоит подчеркнуть, что субстратом для терминальной трансферазы могут служить «выступающие», «утопленные» или «тупые» 3'-цепи на концах двух- или одноцепочечных молекул ДНК. После маркировки 3'-цепей в геноме B13 (только для этого фага), чтобы увеличить количество одноцепочечных ампликонов для 3'-цепи-мишени, дополнительно проводили реакцию асимметричной ПЦР (аПЦР) со специфичными праймерами (Приложение Б, Таблица П2). Далее для всех исследуемых фагов протокол одинаков: обработанные терминальной трансферазой фрагменты Sam46, геномная ДНК Kirov и 3'-одноцепочечные ампликоны B13 выступали в качестве ДНК-матрицы в первой из двух последовательно проведенных ПЦР с использованием ДНК-полимеразы (кат. № E314) и пар специфичных олигонуклеотидов (Приложение Б, Таблица П2). Конечные продукты ПЦР проверяли с помощью метода электрофореза в агарозном геле, оценивая длину получившихся фрагментов по сравнению с биоинформатически рассчитанной. Далее получившиеся продукты ПЦР экстрагировали из агарозного геля и использовали для секвенирования по Сэнгеру со специфическими праймерами (Приложение Б, Таблица П2). Хроматограммы полученных после секвенирования последовательностей были визуализированы с помощью программы Unipro UGENE v.44.0. Все использованные праймеры в методе RAGE были предварительно проверены на эффективность (Приложение Б, Таблица П3).

### 2.2.8. Сравнительный геномный анализ

Для оценки филогенетического родства исследуемых бактериофагов с известными фагами был использован сервер VipTree версий 3.5 – 3.6 для создания протеомного дерева на основе сходства последовательностей генома, рассчитанного с помощью tBLASTx [353]. В базе данных VipTree отсутствовали некоторые родственные геномы известных фагов, доступные в базе данных NCBI GenBank (таксон: «Viruses»; 10239) и базе данных фагов *Bacillus* (*Bacillus* phages database или BPD; <http://bacillus.phagesdb.org/>), поэтому к анализу VipTree были добавлены дополнительные геномы фагов (Приложение В, Таблица П4; Приложение Г, Таблица П5 и

Приложение Д, Таблица П6), обнаруженных при поиске BLASTn в NCBI GenBank и BPD, где в качестве запроса для сравнения были выбраны полногеномные последовательности исследуемых фагов. Процент нуклеотидной идентичности по полным длинам геномов рассчитывали как произведение двух параметров BLASTn: «процент идентичности» («% identity») и «процент охвата» («% coverage») [347]. Линейная диаграмма, иллюстрирующая уровень идентичности между полными геномами исследуемых и близкородственных фагов, также была построена с использованием сервера ViPTree версий 3.5 – 3.6 [353]. Процент общих белков рассчитывали с помощью программы GET\_HOMOLOGUES версии 3.3.3 с алгоритмом COGtriangles [20] с порогом 75% для покрытия и  $1 \times 10^{-5}$  для значения E: (-t 0 -C 75 -e).

Для фага Sam46 дополнительно было построено филогенетическое дерево на основе пан-геномной матрицы, полученной с помощью скрипта compare\_clusters.sh из программного пакета GET\_HOMOLOGUES и показывающей наличие/отсутствие отдельных кластеров генов/белков в каждом геноме. На основе матрицы было сгенерировано дерево с помощью метода максимального правдоподобия («maximum likelihood», ML), с помощью программного пакета GET\_PHYLOMARKERS версии 2.2.8.1 [20]. Дерево было визуализировано с помощью FigTree v1.4.4 с укоренением в средней точке.

### 2.2.9. Определение температурной и pH стабильностей бактериофагов

Определение температурной и pH стабильностей всех исследуемых бактериофагов проводили единообразно. Стабильность фагов при различных значениях температур оценивали с помощью инкубации аликвот препаратов фагов в SM+ буфере при температурах 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 и 90°C в течение 1 ч (в зависимости от полученного препарата фага использовали разные конечные значения БОЕ/мл). Стабильность фагов при различных значениях pH (в диапазоне от 2,2 до 12,0) оценивали с использованием пяти буферов: глицин-HCl-буфера (значения pH 2,2 и pH 3,0), натрий-ацетатного буфера (pH 4,0 и pH 5,0), фосфатного буфера (pH 6,0, pH 7,0 и pH 8,0), глицин-NaOH буфера (pH 9,0 и 10,0) и Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH буфера (pH 11,0 и 12,0). В качестве контроля использовали препарат фага в SM+ буфере. К буферам с различным значением pH добавляли аликвоты препарата фага (в зависимости от полученного препарата фага использовали разные конечные значения БОЕ/мл) и инкубировали при 37°C (для Sam46-T, Sam46-C и Kirov) или 30°C (для фага B13) в течение 1 ч.

Для каждого фага количество жизнеспособных вирионов определяли на газонах чувствительных штаммов *B. cereus* ВКМ В-370 (для фагов Sam46-T, Sam46-C и B13) или *B. tropicus* ATCC 4342 (для фага Kirov) с помощью метода спот-теста (см. пункт 2.2.1.). Для всех фагов было проведено пять независимых повторов внутри каждого из экспериментов по определению температурной и pH стабильностей, соответственно. Результаты экспериментов

были графически визуализированы в программе GraphPad Prism 8.4.3 [322] и представлены в виде диаграммы «ящик с усами» с доверительным интервалом 5–95%.

#### **2.2.10. Анализ литической активности бактериофагов**

Для оценки литической активности фагов бактериальные культуры чувствительных штаммов заражали фагами при разных значениях МИ. Для этого 50 мкл препаратов фагов с различными титрами (БОЕ/мл) добавляли по отдельности к 450 мкл культуры с определенным значением OD (определенные КОЕ/мл), чтобы конечные значения МИ были равны 0,01, 0,1, 1, и 10. Фаго-бактериальные смеси инкубировали в 48-луночном микропланшете при встряхивании при 28°C (для В13) или 30°C (для Sam46-Т, Sam46-С и Kirov) в течение 7-10 ч в микропланшетном ридере FilterMax F5 (Molecular Devices, США), измеряя OD<sub>595</sub> каждые 10 мин. Неинфицированные культуры *B. cereus* ВКМ В-370 и *B. tropicus* ATCC 4342 использовали в качестве контроля для оценки литической активности. Было проведено по три независимых повтора в экспериментах для каждого исследуемого фага. Результаты были представлены в виде среднего значения трех повторов ± стандартное отклонение и визуализированы в виде кривых роста с использованием GraphPad Prism 8.4.3 [322].

#### **2.2.11. Анализ адсорбции бактериофагов (для Sam46)**

Анализ адсорбции фагов проводился только для вирулентных фагов Sam46-Т и Sam46-С. Для определения времени, необходимого фагам Sam46-Т и Sam46-С для прикрепления к клеткам *B. cereus* ВКМ В-370, был проведен анализ адсорбции в соответствии с протоколом, описанным Кропински [209]. Для этого в 1,5 мл пробирки эппендорф добавляли 0,95 мл LB с тремя каплями хлороформа и помещали на лед для охлаждения в течение 10 мин. Культуру *B. cereus* ВКМ В-370 (OD<sub>590</sub>=0,4) в средней логарифмической фазе, выращенной в LB с добавлением 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, разбавляли до OD<sub>590</sub>=0,2 ( $2 \times 10^7$  КОЕ/мл). Далее 9 мл полученной культуры переносили в колбу Эрленмейера объемом 100-мл и термостатировали ее на водяной бане-качалке при температуре 37°C при 60 об/мин. Девять миллилитров LB с 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и 10 мМ MgCl<sub>2</sub> использовали в качестве контроля. После 10 минут термостатирования среды в колбе 1 мл суспензии фага Sam46-Т или Sam46-С в концентрации  $2 \times 10^5$  БОЕ/мл (предварительно инкубируемый в течение 5 мин при 37°C) добавляли в экспериментальную и контрольную колбы. Из колб через каждую минуту отбирали 50-мкл аликвоты в предварительно подготовленные пробирки эппендорф, содержащие LB и хлороформ, и перемешивали на вортексе. Смеси анализировали на наличие неадсорбированных фагов с помощью метода агаровых слоев (см. пункт 2.2.1.). Полученные титры фагов сравнивали с титрами, полученными для контрольных образцов (без бактериальных клеток). Эксперимент был проведен в трех повторах. Результаты

были представлены в процентах от исходного числа фагов и визуализированы в GraphPad Prism 8.4.3 [322] с планками погрешностей, представляющими стандартное отклонение для трех повторов. Скорость адсорбции рассчитывали по уравнению, описанному Кропински [209].

#### **2.2.12. Одноступенчатая кривая роста бактериофагов (для Sam46)**

Одноступенчатая кривая роста бактериофагов проводилась только для вирулентных фагов Sam46-T и Sam46-C. Для умеренных бактериофагов рассчитать время, требуемое для созревания вириона, и размер потомства фага из одной бактериальной клетки невозможно, поскольку эти фаги после заражения бактерии выбирают преимущественно лизогенный цикл развития, ведущий к образованию профага.

Чтобы определить латентный период и средний размер потомства фагов Sam46-T и Sam46-C, был проведен одноэтапный эксперимент по культивированию фага, как было описано ранее [181]. Для этого 1 мл фагового препарата (предварительно проинкубированный в течение 5 мин при 37°C) в концентрации  $2 \times 10^7$  БОЕ/мл смешивали в 100-мл колбе с 9 мл культуры *B. cereus* ВКМ В-370 с  $OD_{590}=0,2$  ( $2 \times 10^7$  КОЕ/мл), чтобы обеспечить МИ 0,1. После инкубации на водяной бане-качалке при температуре 37°C при 60 об/мин в течение 10 мин для адсорбции фага аликвоту объемом 1 мл отбирали и центрифугировали при 3500 g в течение 10 мин при 4°C для осаждения клеток. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл свежей среды LB, снова центрифугировали и ресуспендировали в 1 мл LB. Далее 0,1 мл смеси (бактерии с адсорбированными фагами) переносили в 9,9 мл LB в 100-мл колбу, тщательно перемешивали и инкубировали на водяной бане-качалке при 37°C и 60 об/мин. Аликвоты по 150 мкл собирали с интервалом 5 мин в течение 1 ч. Фаги подсчитывали путем титрования методом агаровых слоев (см. пункт 2.2.1.) для каждой отобранной временной точки, включая 0. Эксперимент проводили в трех повторах для каждого фага. Полученные значения наносили на график в соответствии со временем отбора аликвоты. Латентный период и размер фагового потомства рассчитывали по кривой, визуализированной в GraphPad Prism 8.4.3 [322], с планками погрешностей, представляющими стандартное отклонение для трех повторов.

#### **2.2.13. Тест на возникновение лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 (для Sam46)**

Для проверки предположения о возникновении лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 при инфекции фагом Sam46-T и как следствие приобретения у него «иммунитета» к повторному заражению фагами Sam46-C и Sam46-T, из центральной части мутных бляшек (состоящих из предполагаемых лизогенных бактерий), образованных на газоне *B. cereus* ВКМ В-370 при инфекции фагом Sam46-T, были отобраны пять образцов бактериальных культур. Далее отобранные культуры высевались на чашку с 1,5% LB-агаром методом истощающего штриха и

инкубировали при 37°C в течение ночи. Отдельные колонии переносили в 5 мл жидкой среды LB и культивировали в течение ночи при 37°C при встряхивании. Ночные культуры пересеивали в 3 мл свежей среды LB и вновь инкубировали при тех же условиях, что и ранее до достижения  $OD_{590}=0,2$  ( $2 \times 10^7$  КОЕ/мл). Пятьдесят мкл фагов Sam46-T и Sam46-C в концентрациях  $4 \times 10^8$  БОЕ/мл добавляли отдельно в 48-луночный микропланшет к 450 мкл разбавленных бактериальных культур, чтобы обеспечить МИ=2. Микропланшет инкубировали в течение 7 ч при 30°C в микропланшетном ридере FilterMax F5 (Molecular Devices) с измерением  $OD_{595}$  каждые 10 мин. В качестве контрольных образцов использовали незараженные культуры штамма *B. cereus* ВКМ В-370. Эксперимент проводили в трех независимых повторах. Результаты представлены в виде среднего значения трех повторов  $\pm$  стандартное отклонение и визуализированы с использованием GraphPad Prism 8.4.3 [322].

#### **2.2.14. Выявление генетических различий между фагами с мутным и прозрачным морфотипом бляшек (для Sam46 и Sam112)**

Для выявления генетических различий между Sam46-T и Sam46-C, образующими мутные и прозрачные бляшки, соответственно, из очищенных препаратов фагов была выделена и отсеквенирована ДНК как описано в пункте 2.2.6., с последующим сравнением собранных геномов фагов Sam46-T и Sam46-C.

Для того чтобы проверить предположение о возникновении мутантных фагов с прозрачным морфотипом бляшек из фагов, продуцирующих мутные бляшки (из Sam46-T в Sam46-C), фаги Т-типа культивировали на бактериальном штамме *B. cereus* ВКМ В-370 (при  $OD_{590} = 0,6$ ) в 30 мл среды LB с добавлением 10 мМ  $CaCl_2$  и 10 мМ  $MgCl_2$ . Культивирование фаго-бактериальной смеси проводили при 37°C до снижения оптической плотности. Получение чистых лизатов проводили как указано в пункте 2.2.2. Цикл культивирование-очистка фага повторяли трижды. Затем 10 мкл конечной концентрированной суспензии фагов, полученных от культивирования препарата фага Т-типа, (с концентрацией  $10^4$  БОЕ/мл) использовали для детекции бляшек на газоне *B. cereus* ВКМ В-370 методом агаровых слоев (см. пункт 2.2.1.). Таким образом было проанализировано 40 чашек и отобрано три бляшки с прозрачным морфотипом для дальнейших манипуляций. Отобранные мутантные бляшки были перенесены в эппендорфы, содержащие 50 мкл Milli-Q, и проинкубированы при 95°C в течение 15 мин для разрушения фаговых частиц и высвобождения ДНК в раствор. Два микролитра каждой смеси использовали в качестве ПЦР-матриц. ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы TaqSE (с) и пары олигонуклеотидов: Sam46-112\_CDS\_24\_Fw 5'-ТСТАТТТТСААГСААГСГГ-3' и Sam46-112\_CDS\_26\_Rv 5'-GСТААТТТСТТААССГГТТС-3'. Продукты ПЦР экстрагировали из

агарозного геля и использовали для секвенирования по Сэнгеру с праймера Sam46-112\_CDS\_24\_Fw 5'-ТСТАТТТТCAAGCAAGCGG-3'.

Для того чтобы проверить предположение о возникновении мутантных фагов с мутным морфотипом бляшек из фагов с прозрачным морфотипом (из Sam46-C в Sam46-T), был использован протокол, описанный в этом пункте, но с некоторыми модификациями: в качестве исходного фага для культивирования был взят Sam46-C, а целью эксперимента было обнаружить мутантные фаги с мутным морфотипом бляшек.

### 2.2.15. Статистический анализ

Статистический анализ экспериментальных данных выполнен с помощью GraphPad Prism 8.4.3 [322]. Для определения температурной и pH стабильностей бактериофагов был использован однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями «One-way ANOVA». Для анализа таких параметров фага как литическая активность бактериофагов, адсорбция фаговых частиц, скорость созревания потомства, а также при анализе результатов теста на возникновение лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 был использован двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями «Two-way ANOVA». Во всех экспериментах результаты при  $p \leq 0,05$  считались статистически значимыми.

### 2.2.16. Регистрационные номера геномов

Последовательности геномов и связанные с геномами данные исследуемых фагов были депонированы в базу данных NCBI под следующими номерами:

для фага Sam46: геном *Bacillus* phage vB\_BcM\_Sam46, где номер нуклеотидной последовательности в GenBank MN604698; BioProject: PRJNA686639. Sam46-T type: Sample name: *Bacillus* phage vB\_BcM\_Sam46\_T; BioSample: SAMN17119841; SRA: SRS7901368. Sam46-C: Sample name: *Bacillus* phage vB\_BcM\_Sam46\_C type; BioSample: SAMN17119842; SRA: SRS7901369;

для фага Киров: геном *Bacillus* phage Киров, номер нуклеотидной последовательности в GenBank NC\_071041; BioProject: PRJNA721042; Sample name: *Bacillus*\_phage\_Kirov; BioSample: SAMN18697247; SRA: SRS8676668.

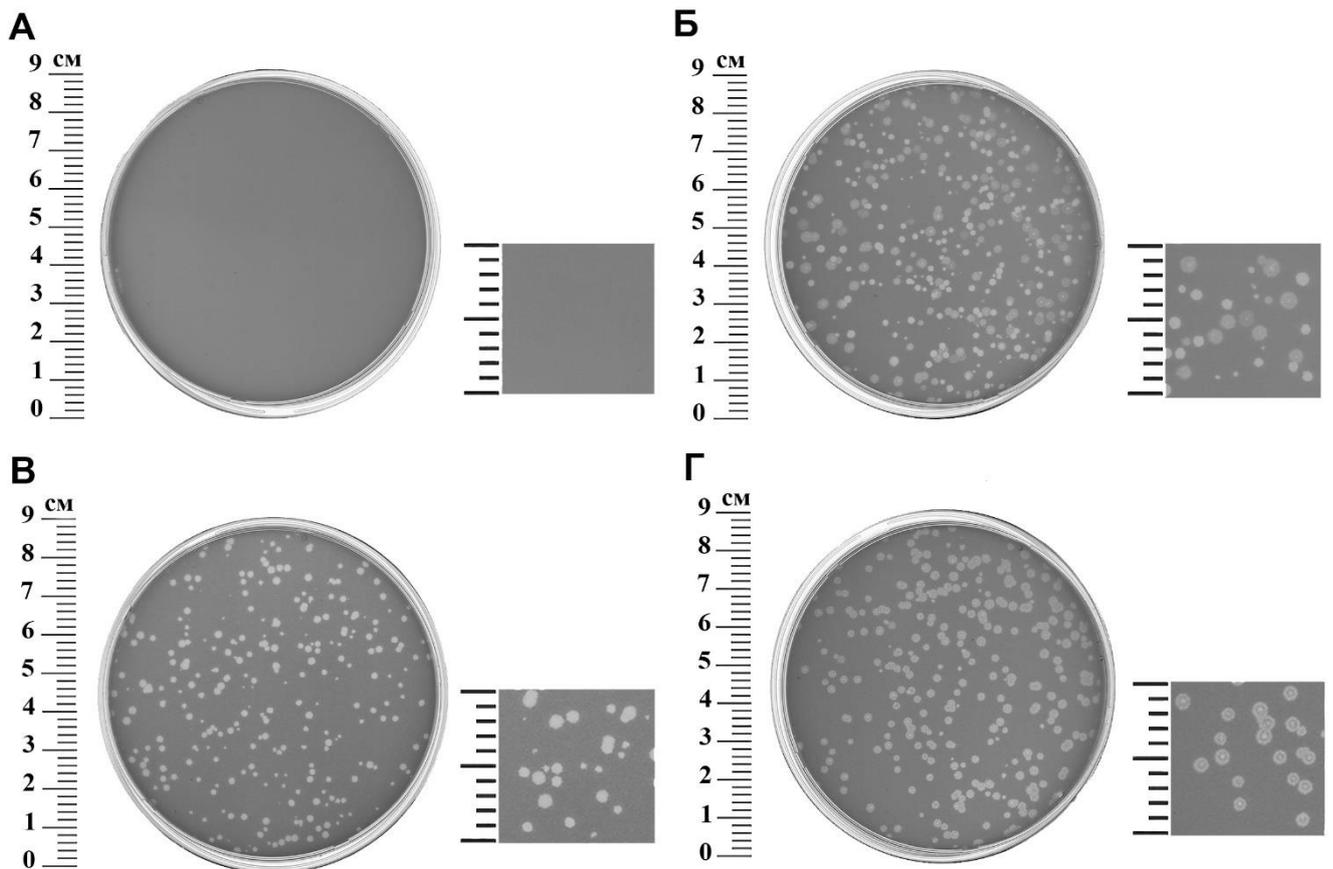
для фага B13: геном *Bacillus* phage B13, номер нуклеотидной последовательности в GenBank OP066531; BioProject: PRJNA861678; Sample name: *Bacillus* phage B13; BioSample: SAMN29921977; SRA: SRS14401482.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Вирулентные бактериофаги Sam46-T и Sam46-C

#### 3.1.1. Выделение, спектр литического действия и морфология

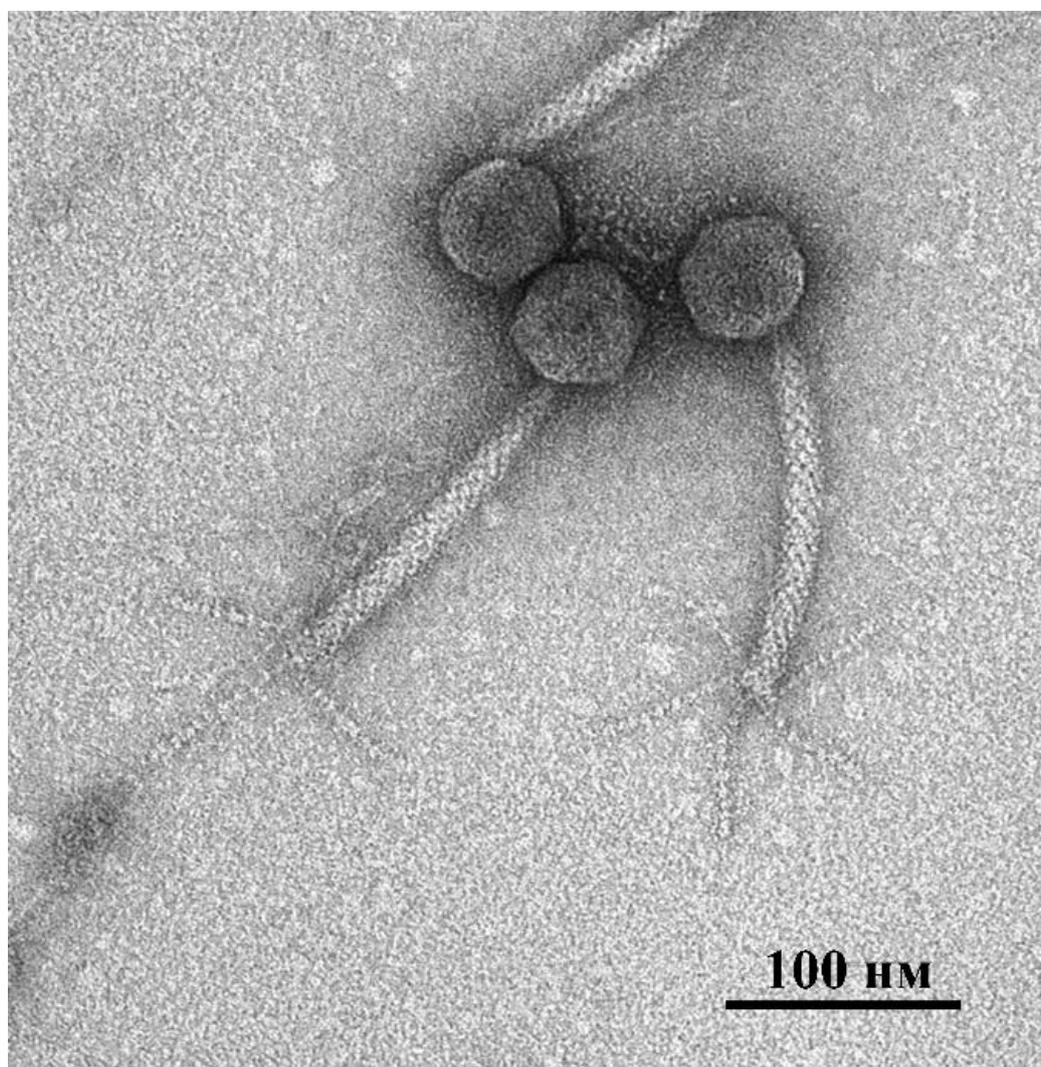
Бактериофаги *Samaravirus samarensis* vB\_VcM\_Sam46-T и *Bacillus samarensis* vB\_VcM\_Sam46-C (сокр. Sam46-T и Sam46-C соответственно) были выделены из образцов почвы, собранных в г. Самаре Российской Федерации [3, 14, 201]. На газонах чувствительного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 первоначально выделенная фаговая суспензия приводила к возникновению одновременно как прозрачных, так и мутных бляшек диаметром 1-2 мм (Рис. 4, Б). Очищенные препараты бактериофагов Sam46-T и Sam46-C, которые стабильно продуцировали только один тип бляшек, были получены после пяти циклов экстракции-культивирования. Таким образом, было выделено два штамма фагов: Sam46-C и Sam46-T. Буквы «С» и «Т» обозначают морфотипы бляшек, которые фаги формируют: прозрачный («clear») и мутный («turbid») морфотип, соответственно (Рис. 4, В и Г).



**Рисунок 4.** Морфология бляшек бактериофагов Sam46-T и Sam46-C на газоне штамма *B. cereus* ВКМ В-370. **А** – контроль (без фагов); **Б** – исходная фаговая суспензия; **В** – очищенный препарат Sam46-C; **Г** – очищенный препарат Sam46-T. Рисунок из работы [201].

Определение диапазона штаммов чувствительных к инфекции Sam46-T и Sam46-C было проведено на 38 штаммах группы *B. cereus* s. l. Спектр литической активности фагов полностью совпадал: 17 (~50%) из 38 исследуемых штаммов группы *B. cereus* s. l. были чувствительны к обоим фагам (Приложение E, Таблица П7).

Трансмиссионная микроскопия фаговых частиц была сделана только для фага Sam46-T (принят как основной представитель вида), поскольку результаты секвенирования ДНК Sam46-T и Sam46-C показали, что это два штамма одного и того же вида фага Sam46 (см. пункт 3.1.2.). Анализ результатов ТЭМ показал, что вирионы фага имеют икосаэдрический капсид размером  $57,62 \pm 1,2$  нм в диаметре, длинный сокращающийся негибкий хвост, который в несокращенном состоянии имеет длину  $160,0 \pm 5,5$  нм (включая структуру базальной пластины) и ширину  $16,9 \pm 1,3$  нм, заканчивающийся структурной базальной пластиной с прикрепленными к ней шестью хвостовыми фибриллами (Рис. 5).

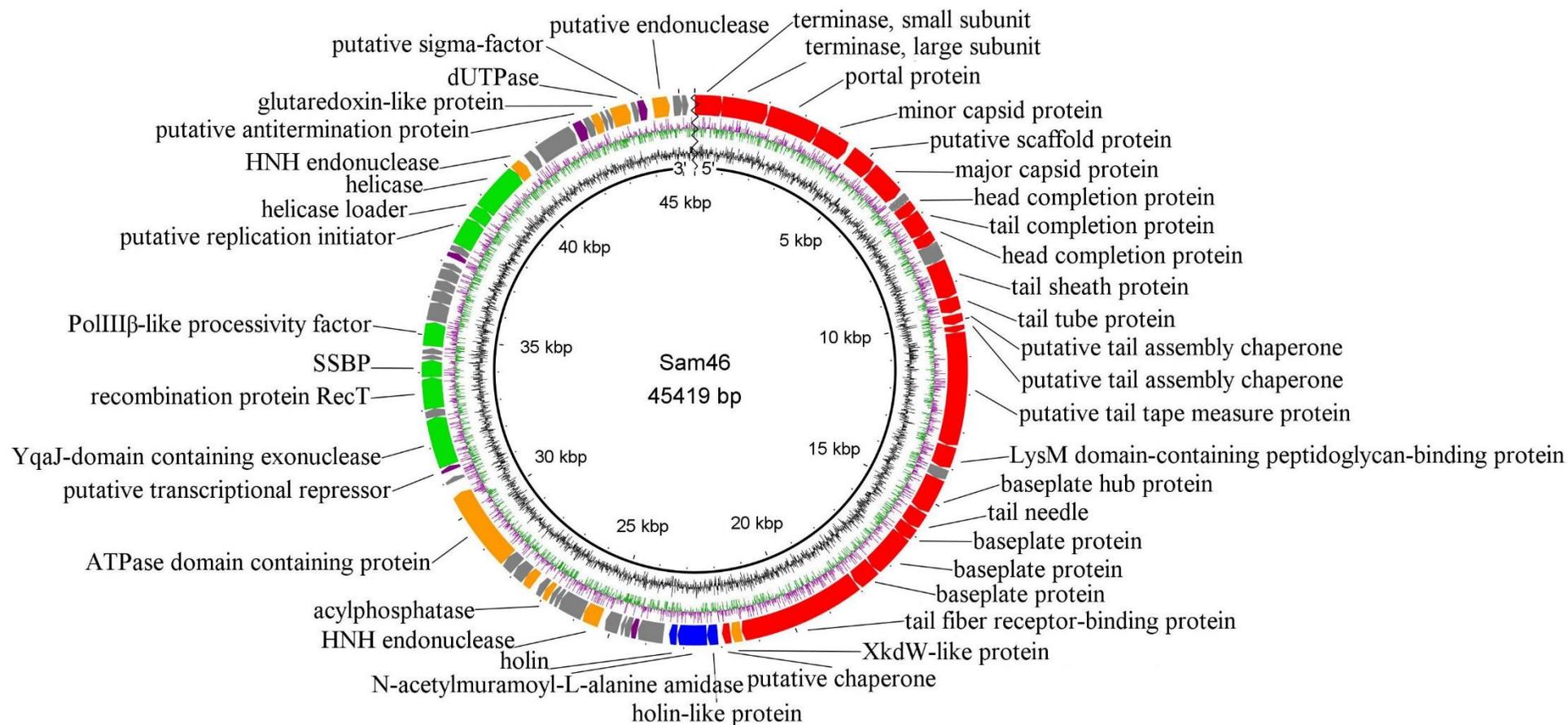


**Рисунок 5.** Трансмиссионная электронная микроскопия бактериофага Sam46-T. Изображения вирионов были получены с использованием 1% (масса/объем) уранилацетата для негативного контрастирования. Рисунок из работы [201].

### 3.1.2. Организация генома Sam46-T и Sam46-C

Полногеномное секвенирование Sam46-T и Sam46-C показало, что генетические различия (3 нуклеотидные замены на полный геном) локализованы только в гене *gp25* (QIQ61226), кодирующем HkdW-подобный белок Gp25 с неизвестной функцией (Рис. 8) (см. пункт 3.1.3.). Таким образом, согласно критерию ICTV для демаркации вида (идентичность нуклеотидных последовательностей по всей длине геномов не менее 95%) Sam46-T и Sam46-C представляют собой два разных штамма одного и того же вида бактериофага. Геном Sam46-T был выбран в качестве эталонного генома для вида и загружен в базу данных NCBI под именем «*Bacillus phage vB\_VcM\_Sam46*».

В результате сборки с помощью SPAdes v. 3.11.1 выявлено, что геном бактериофага Sam46 представляет собой дцДНК длиной 45419 н.п. с GC-составом 41,6%. Геном Sam46 содержит 77 предсказанных ОРС, 44 (57,1%) из которых были функционально аннотированы с помощью BLASTp и HHpred [3, 6, 7]. Схематично круговая карта генома Sam46 представлена на Рис. 6, при этом для удобства представления генетической информации первое основание гена малой субъединицы терминазы было выбрано в качестве начальной точки генома.



**Смещение GC состава**

- GC (-) недостаток
- GC (+) избыток
- GC состав

- Упаковка ДНК и структурные белки
- Репликация и рекомбинация
- Лизис клетки бактерии

- Регуляция транскрипции
- Другие функции
- Неизвестные функции

**Рисунок 6.** Карта генома бактериофага Sam46. ОРС окрашены исходя из функций белков, которые они кодируют (см. обозначения). Рисунок из работы [201].

### Модуль упаковки ДНК

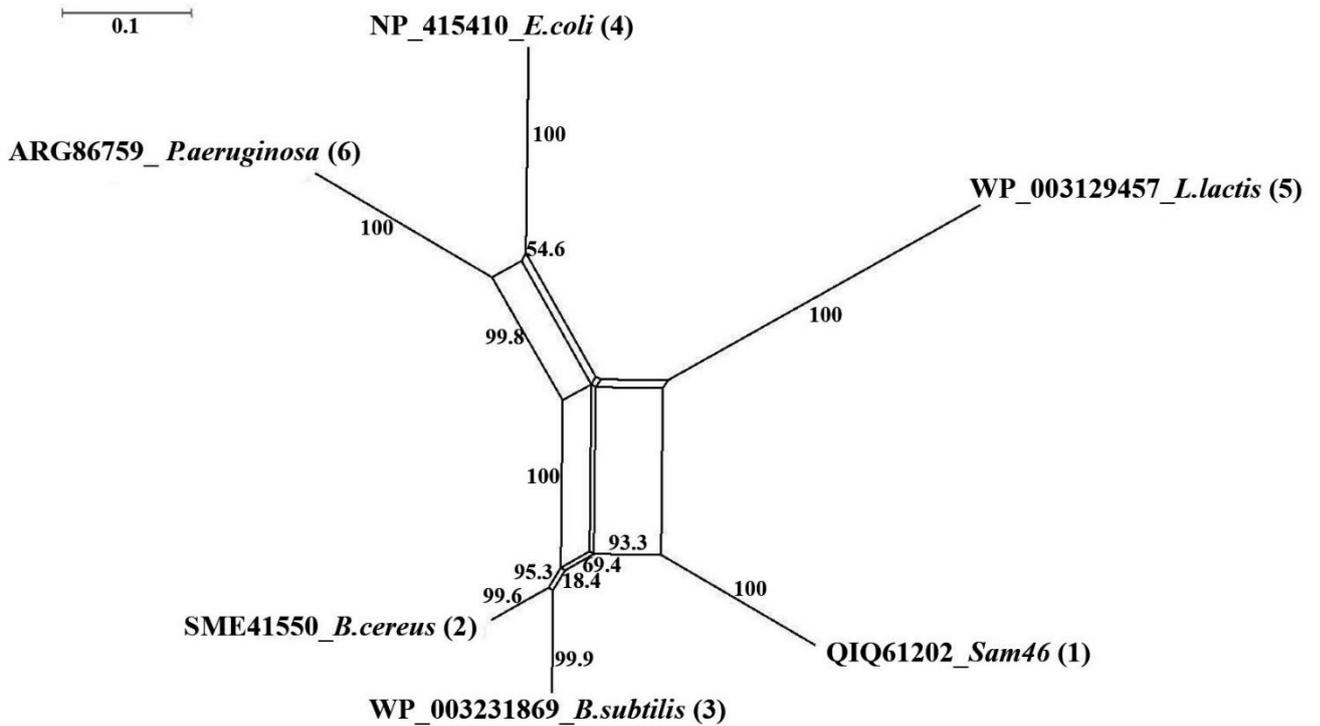
В геноме фага Sam46 гены *gp1* и *gp2* кодируют малую и большую субъединицы терминазы, соответственно (QIQ61202 и QIQ61203, соответственно) (Рис. 6). Обнаружено, что малая субъединица терминазы обладает двухдоменной структурой: типичный для малой субъединицы терминаз С-концевой «Terminase\_2» домен (а.о. 107–230) ( $E \sim 1,2e^{-27}$ ) и N-концевой «FtsK\_gamma» домен (а.о. 11–70) ( $E \sim 2e^{-27}$ ) [6, 7]. Хорошо известно, что «FtsK\_gamma» домен имеет бактериальное происхождение и является частью С-концевого «winged-helix» моторных белков, таких как FtsK или SpoIIIЕ, участвующих в сегрегации бактериальных хромосом при клеточном делении и споруляции. При этом бактериальный «FtsK\_gamma» домен отвечает за распознавание специфических последовательностей на ДНК, которые называются KOPS или SRS сайты [7]. Выравнивание «FtsK\_gamma» домена малой субъединицы терминазы Sam46 с «FtsK\_gamma» доменами бактериальных белков: *B. cereus* (SME41550.1, 727–786 а.о.); *B. subtilis* (WP\_003231869, 721–780 а.о.); *E. coli* (NP\_415410.1, 1266–1325 а.о.); *L. lactis* (WP\_003129457.1, 693–752 а.о.); *P. aeruginosa* (ARG86759.1, 747–806 а.о.) (Рис. 7, А) показало, что они имеют высокую гомологию. Филогенетический анализ показал, что «FtsK\_gamma» домены *B. cereus* и *B. subtilis* являются близкородственными «FtsK\_gamma» домену Sam46 (Рис. 7, Б). Для ряда бактериальных белков с «FtsK\_gamma» доменами ранее были установлены последовательности SRS и KOPS сайтов: *B. subtilis* – 5' - GAGAAGGG - 3' [298]; *E. coli* – 5' - GGGNAGGG - 3' [207], *L. lactis* – 5' - GAGAAG - 3' [99] и *P. aeruginosa* – 5' - GGGCAGGG - 3' [333]. Поиск последовательностей бактериальных SRS и KOPS сайтов в геноме Sam46 выявил наличие только двух KOPS сайтов *E. coli* и 15 KOPS сайтов *L. lactis*, в то время как SRS сайты, узнаваемые «FtsK\_gamma» доменами *B. cereus* и *B. subtilis* не были обнаружены.

**A**

(1) 11 DELFEEAKKVVIEMQSASVSMLQRRFRIGYTRASHLIDALELEKVIKGYEGSKPREVLIK 70  
 (2) 727 DELYDEAVQLVVMQTASVSMLQRRFRVGYTRAARLIDAMEMNGVVGPIYEGSKPREVLIN 786  
 (3) 721 DELYDEAVELIVGMQTASVSMLQRRFRIGYTRAARLIDAMEERGTVVGPIYEGSKPREVLLS 780  
 (4) 1266 DPLFDQAVQFVTEKRKASISGVQRQFRIGYNRAARIIEQMEAQGIIVSEQGHNGNREVLAP 1325  
 (5) 693 DPLYDEAVRFVTESTRASISAVQRKLKIGYNRAARMIEAMEMAGVVTMPMNTNGSREVIAP 752  
 (6) 747 DPLFEEARNMVIMAQKASTAQLQRALKVGFNRASDLMNELEAQGIIVGPAKGTTPRKVLVS 806

**Б**

\* \* : : \* . . : : \* \* : : \* \* : : \* : \* \* : : : \* : : . \* : \*



**Рисунок 7.** Сравнительный анализ «FtsK\_gamma» доменов малой субъединицы терминазы бактериофага Sam46 и «FtsK\_gamma» доменов бактериальных белков. **А.** Выравнивание аминокислотных последовательностей «FtsK\_gamma» доменов. Числа, расположенные по обеим сторонам выравнивания, указывают на положение «FtsK\_gamma» доменов в последовательностях соответствующих белков. Цветом выделены а.о. в соответствии со степенью консервативности среди выровненных аминокислотных последовательностей. Условные обозначения под выравниванием: «\*» – консервативная последовательность (красным), «:» – консервативная замена (голубым), «.» – полуконсервативная замена (зеленым) и « » – неконсервативная замена (не окрашена). **Б.** «Neighbor-Net» дерево «FtsK\_gamma» доменов. На концах ветвей дерева указаны идентификационные номера в GenBank и названия видов, а число в круглых скобках обозначает номер последовательности, приведенной под буквой «А». Числа на ветвях обозначают значения «bootstrap»-теста с 1000 повторов. Масштабная линейка обозначает количество аминокислотных замен на сайт. Рисунок из работы [201].

### Структурный модуль

Гены, кодирующие белки, ответственные за морфогенез фаговых вирионов Sam46-Т, предсказывали с помощью BLASTp и HHPred, принимая во внимание структурное сходство с известными ортологичными белками. Гены, кодирующие белки капсида, включают SPP1 Gp6-подобный порталный белок (QIQ61204), минорный капсидный белок (QIQ61205),

предполагаемый каркасный или скафолд белок (QIQ61206), SPP1 Gr13-подобный главный белок капсида (QIQ61207), SPP1 Gr15-подобный белок завершения сборки головки фага (QIQ61209) и ХkdH-подобный белок завершения сборки головки (QIQ61211). Белки, отвечающие за морфогенез хвоста бактериофагов, включают белок завершения сборки хвоста (QIQ61210), белок оболочки (чехла) хвоста (QIQ61213), белок трубки хвоста (QIQ61214), предполагаемый TMP-белок хвоста (QIQ61217) и два предполагаемых шаперона хвоста (QIQ61215 и QIQ61216). Гены, кодирующие белки, которые включены в сборку базальной пластины фагов: grP-подобный центральный белок базальной пластины (QIQ61220), grV-подобный хвостовой шип (QIQ61221), gr25-подобный белок базальной пластины (QIQ61222), J-подобный белок базальной пластины (QIQ61223), I-подобный белок базальной пластины (QIQ61224), grH-подобный белок фибрилл (QIQ61225) и предполагаемый шаперон базальной пластины (QIQ61227). Хотя Sam46 имеет несколько общих структурных генов с бактериофагом SPP1 с морфотипом сифовирус, однако структурный модуль Sam46 гораздо больше похож на структурный модуль глубоководного термофильного фага D6E (Рис. 13), обладающего морфотипом миовирус и характеризующегося сильно мозаичным по своей структуре геномом [361].

#### *Литический модуль*

Литические белки: холиноподобный белок, содержащий домен XhlA (QIQ61228), N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазу (QIQ61229) и холин (QIQ61230) [2].

#### *Модуль репликации и рекомбинации*

Модуль генов, связанных с репликацией и рекомбинацией Sam46, напоминает модуль вирулентного бактериофага *Bacillus* SPP1 (Рис. 13) и относится к типу «инициатор-хеликаза-загрузчик хеликазы» по классификации, предложенной Вайгель и Зейтц [356]. Модуль включает в себя близко расположенные друг к другу гены, которые кодируют следующие белки: предполагаемый инициатор репликации, содержащий домен DNAD (QIQ61262), белок-загрузчик хеликазы (QIQ61263) и репликативную хеликазу типа DNAB (QIQ61264). Гены *gp47* и *gp49* кодируют белки с высокой гомологией с такими белками как YqaJ-домен содержащая экзонуклеаза (QIQ61248) и RecT-подобный белок (QIQ61250), соответственно. По-видимому, эти два белка являются частями двухкомпонентной системы рекомбинации, функционально сходной с белками фага SPP1 Gr34.1 [235] и Gr35 [176]. Ген *gp50* кодирует белок, связывающий одноцепочечную ДНК (QIQ61251), который, как известно, часто связан с подобной системой рекомбинации [52, 356]. Ген *gp53* кодирует PolIII $\beta$ -подобный фактор процессивности («скользящий» ДНК-зажим, QIQ61254), наиболее распространенный среди бактериофагов [356].

### 3.1.3. Выявление генетических различий между Sam46-T и Sam46-C

Генетическое различие между фагами Sam46-T и Sam46-C наблюдалось только в последовательности гена *gp25*, кодирующего XkdW-подобный белок с неизвестной функцией. Было выдвинуто предположение, что точечные мутации, возникающие в гене *gp25*, могут быть связаны с изменением морфотипа бляшек. В попытке объяснить природу происхождения двух морфотипов бляшек была выполнена серия экспериментов по получению мутантных фагов (см. пункт 2.2.14). Частота возникновения мутантных фагов с прозрачным морфотипом бляшек из фага Sam46-T составила 1:3000, в то время как появление мутантных фагов с мутным морфотипом бляшек из Sam46-C не было обнаружено при анализе около 12000 бляшек. Для трех отобранных мутантов с прозрачным фенотипом бляшек было выполнено секвенирование последовательности гена *gp25* методом Сэнгера. На Рис. 8, А отсеквенированные последовательности трех отобранных мутантов обозначены как «mut1\_T → C», «mut2\_T → C» и «mut3\_T → C». Результаты секвенирования подтвердили связь изменения морфотипа бляшек с появлением точечных мутаций в гене *gp25* (Рис. 8, А).

Все мутации в гене *gp25*, выявленные как при полногеномном секвенировании Sam46-C (Рис. 8, А: обозначен как «NGS\_C»), так и в эксперименте по получению мутантных фагов С-морфотипа из препарата Sam46-T (Рис. 8, А: обозначены как «Т → С»), были строго локализованы в С-концевой области XkdW-подобного белка (Рис. 8, А). Предсказание вторичной структуры с помощью JPRED4 [198] и предсказание области структурного мотива «спиральной катушки» (англ. «coiled coil») с помощью LOGICOIL [351] показали, что область гена, где возникают аминокислотные замены, представляет собой  $\alpha$ -спираль. Эта  $\alpha$ -спираль содержит мотивы «НРРНРРР», называемые гептадными повторами [229, 359]. Положения аминокислот в этом повторе обозначают как «abcdefg», где гидрофобные остатки (обозначенные буквой «Н») обычно занимают положения «а» и «d», а полярные остатки («Р») встречаются в других положениях (Рис. 8). Такая структура  $\alpha$ -спирали характерна для структурного мотива «спиральная катушка». По всей видимости, замены гидрофобных аминокислот на гидрофильные «А → Т» (аланин → треонин) и «L → S» (лейцин → серин) во втором гептадном повторе в положении «Н» являются ключевыми и приводят к изменению в морфологии бляшек (Рис. 8, А). Согласно предсказанию LOGICOIL [351], наиболее вероятным состоянием «спиральной катушки» XkdW-подобного белка Sam46 является параллельный димер.

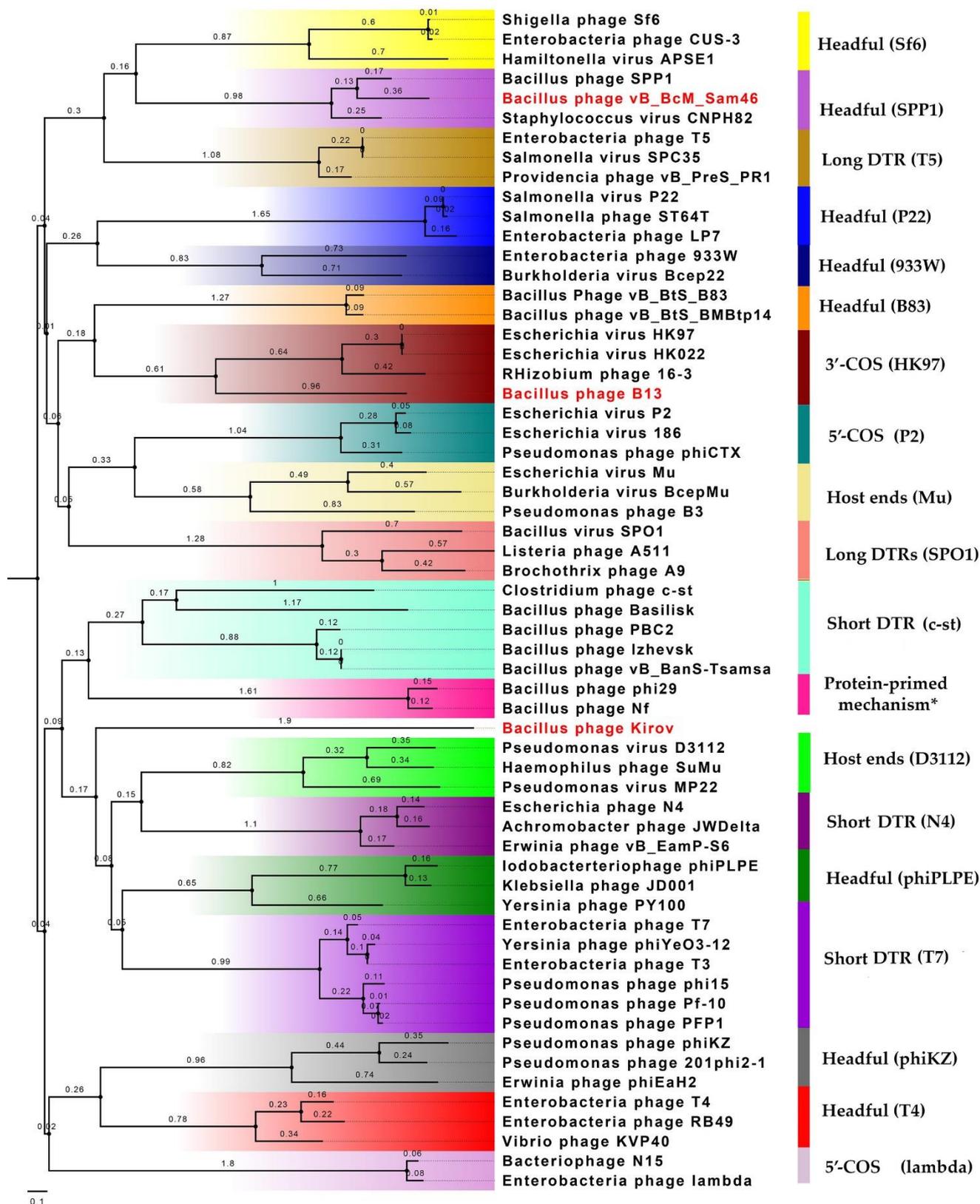


### 3.1.4. Определение стратегии упаковки ДНК

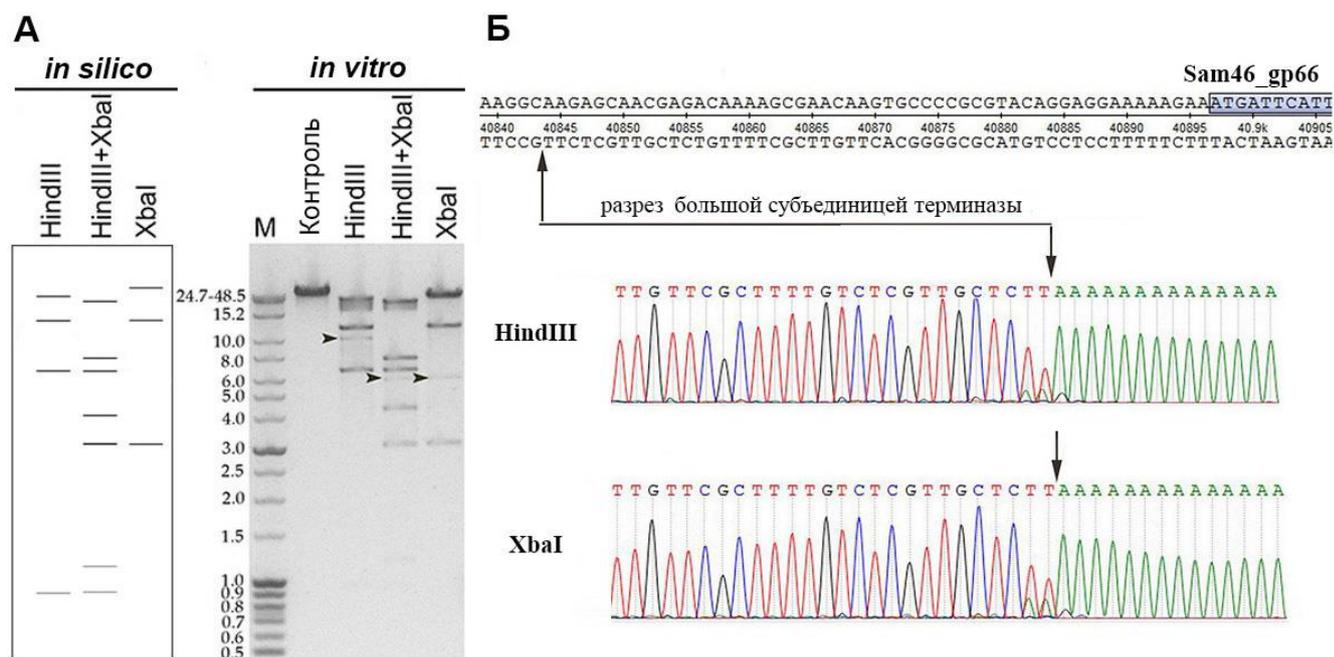
Предсказание с помощью программы PhageTerm в случае фага Sam46 не дало точной позиции концов генома. Однако на графике покрытия прочтений (не представлен в работе) на геном наблюдалось относительно однородное покрытие без значительных пиков (с двойной или более чем двойной глубиной), что типично для фагов с циклически-пермутированными терминальными повторами, использующих «headful» механизм упаковки ДНК [307]. Филогенетический анализ больших субъединиц терминаз фага Sam46 и фагов с хорошо изученными механизмами упаковки ДНК, показал, что белок Sam46 локализуется на древе вместе с белками фагов, обладающих «headful» типом упаковки – клада «SPP1» (Рис. 9) [121].

Биоинформатически предсказанный механизм упаковки ДНК фага Sam46 был экспериментально подтвержден с помощью рестрикционного анализа геномной ДНК с использованием эндонуклеаз рестрикции HindIII и XbaI. На каждой из дорожек электрофореграммы детектированы все фрагменты, предсказанные *in silico* из искусственно циркуляризованной геномной последовательности Sam46, а также дополнительные фрагменты, появляющиеся в субэквимольном количестве по сравнению с другими (Рис. 10, А) [86]. Этот тип рестрикционного паттерна, как известно, характерен для фагов с «headful» механизмом упаковки ДНК [86]. Дополнительные фрагменты представляют собой так называемые «*pac*-фрагменты», которые образуются во время первого события упаковки на каждом геномном конкатемере и, в отличие от истинных рестрикционных фрагментов, разрезаны с одной стороны фаговой терминазой, а с другой – используемой эндонуклеазой рестрикции. Наблюдаемые длины *pac*-фрагментов позволили установить приблизительные координаты *pac*-сайта в районе 40500 – 42000 н.п. генома Sam46.

Очищенные *pac*-фрагменты Sam46 использовали для определения точного местоположения разреза *pac*-сайта методом RAGE с последующим секвенированием по Сэнгеру. Как показано на хроматограммах секвенирования (Рис. 10), для HindIII- и XbaI- *pac*-фрагментов разрез, генерируемый терминазным комплексом, находится в положении между 40843 и 40844 н.п., в межгенной области перед геном *gp66*. Таким образом, было установлено, что фаг Sam46 используют «headful» механизм упаковки ДНК с точной сайт-специфичной инициацией.



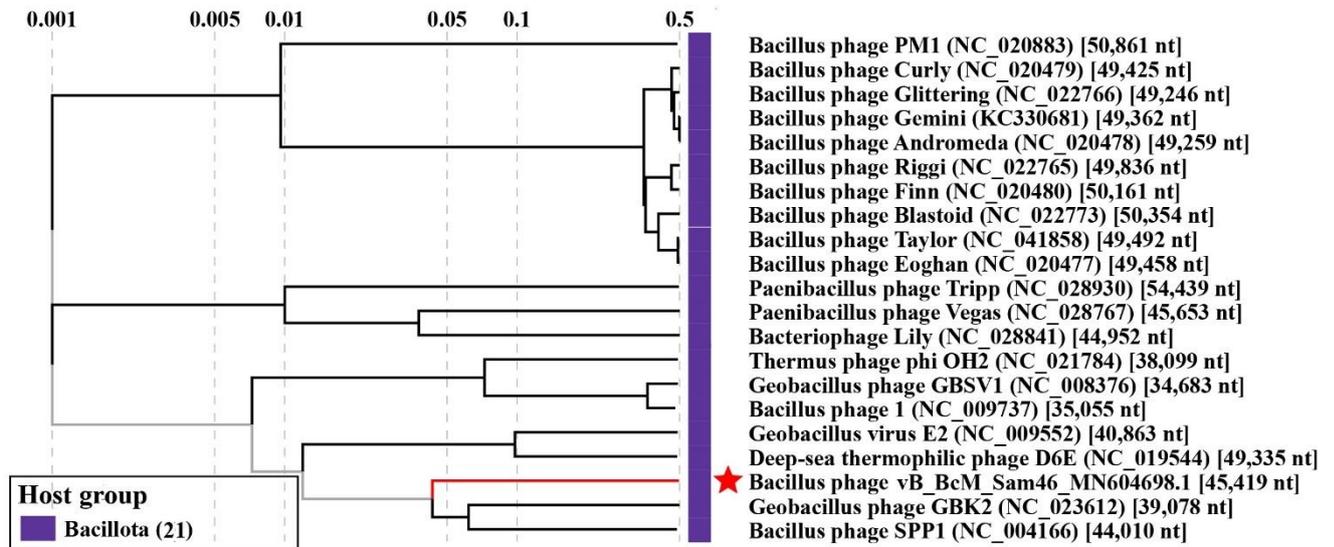
**Рисунок 9.** Филогенетический анализ больших субъединиц терминаз исследуемых фагов Sam46, Kirov, B13 и фагов с хорошо изученными механизмами упаковки. Дерево построено в MEGA X с использованием алгоритма Neighbor-Joining с параметром «bootstrap», равным 1000, и визуализировано с помощью FigTree v1.4.4. Исследуемые фаги выделены красным цветом. Масштабная линейка обозначает количество аминокислотных замен на сайт.



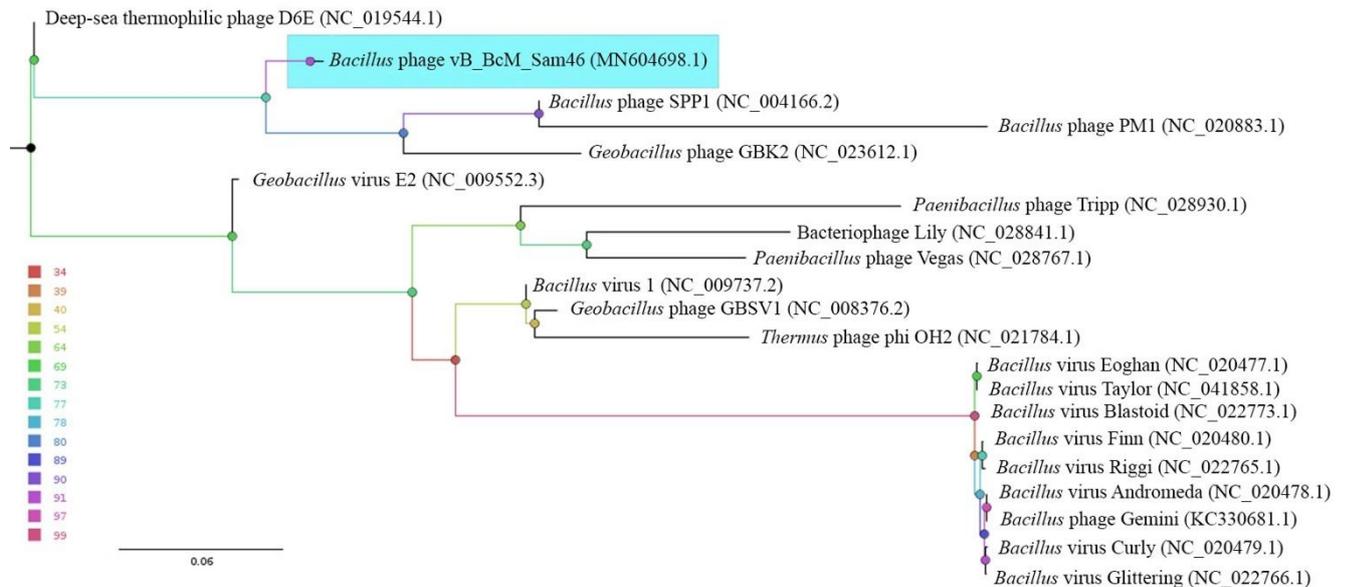
**Рисунок 10.** Определение механизма упаковки ДНК фага Sam46. **А.** Рестрикционный анализ ДНК Sam46 с XbaI и HindIII; М – маркеры длин ДНК-фрагментов; черные стрелки – *pac*-фрагменты. **Б.** Локализация в геноме Sam46 сайта разрезания, генерируемого большой субъединицей терминазы. На хроматограммах секвенирования показаны концевые области последовательностей продуктов ПЦР, полученных с помощью RAGE для HindIII- и XbaI-генерированных *pac*-фрагментов. Рисунок из работы [201].

### 3.1.5. Сравнительный геномный анализ

Для оценки филогенетического родства фага Sam46 с известными фагами было построено протеомное дерево на основе сходства, рассчитанного с помощью tBLASTx на web-сервере VipTree версии 3.6 (Рис. 11). Как видно на Рис. 11, Sam46 образует отдельную кладу, значительно удаленную от ближайших родственных бактериофагов. Наиболее близкие геномы принадлежат бактериофагам SPP1 и GBK2, которые обладают морфотипом сифовирус. Однако анализ количества общих белков (Приложение В, Таблица П4) и дополнительное пангеномное дерево максимального правдоподобия (Рис. 12) показали, что фаг D6E с морфотипом миовирус имеет немного больше общих белков (20), чем SPP1 (16) с Sam46. Таким образом, филогенетический анализ VipTree и GET\_PHYLOMARKERS не дал согласованных результатов, что несколько не удивительно, поскольку и фаг SPP1, и фаг D6E имеют менее 4% нуклеотидной идентичности и менее 23% общих белков с Sam46, поэтому оба фага являются крайне далекими родственниками [3, 7, 201].



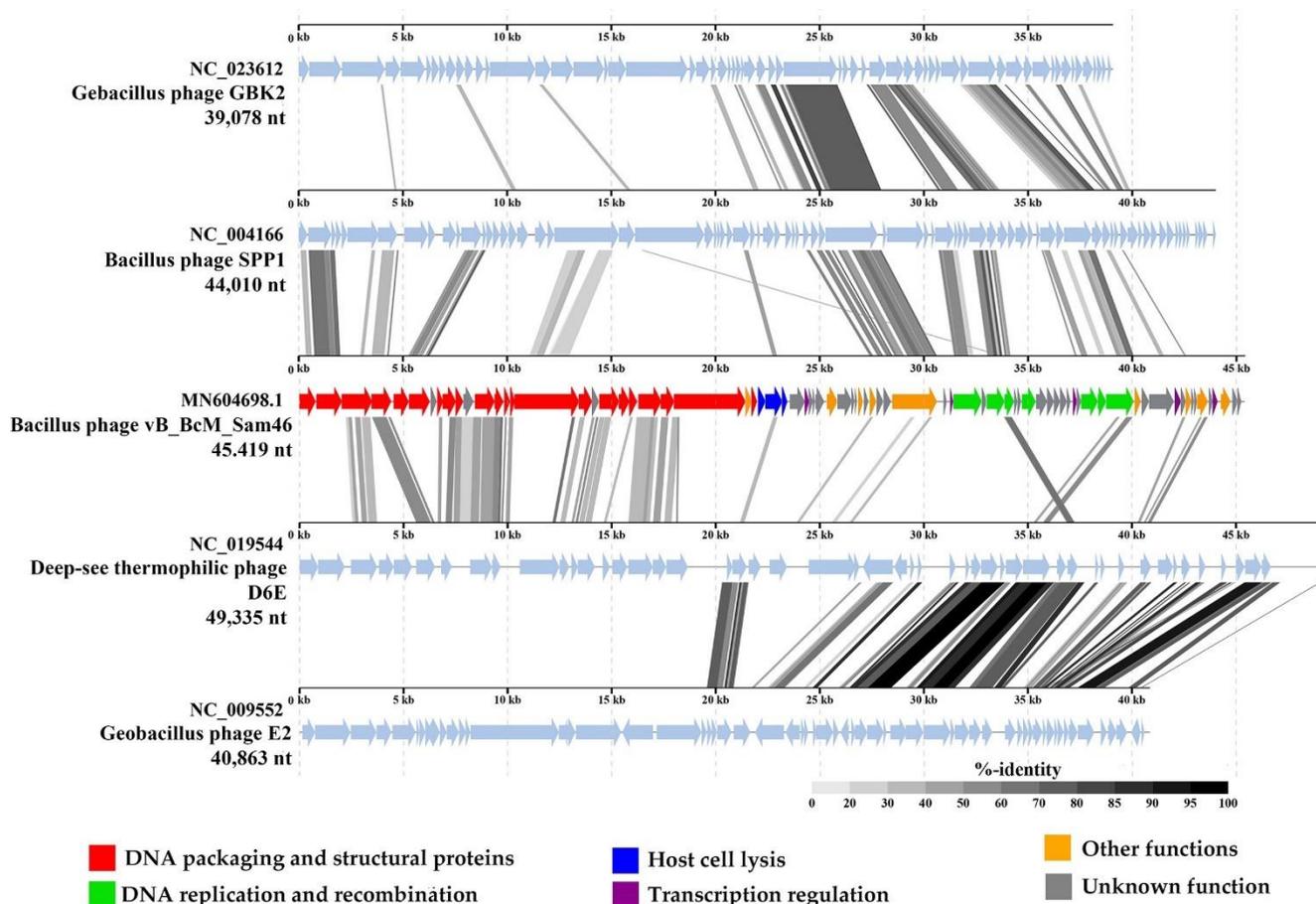
**Рисунок 11.** Вирусное протеомное дерево, включающее фаг Sam46 и его ближайших родственных фагов. Дерево было построено по результатам анализа ViPTree 3.6 с использованием метрики расстояния между белками на основе нормализованных показателей tBLASTx, нанесенных на логарифмическую шкалу. Красная звезда указывает на фаг Sam46, полное название которого в GenBank: *Bacillus phage vB\_BcM\_Sam46*. Рисунок из работы [201].



**Рисунок 12.** Пангеномное дерево максимального правдоподобия для фага Sam46 и его ближайших родственных фагов, построенное из пангеномной матрицы с использованием программного пакета GET\_PHYLOMARKERS версии 2.2.8.1 и визуализированное с помощью FigTree v1.4.4. Клада, содержащая Sam46, выделена голубым цветом. Рисунок из работы [201].

Линейная диаграмма полногеномного сравнения также была визуализирована с помощью сервера ViPTree версии 3.6 (Рис. 13) и демонстрирует попарное сходство tBLASTx между наиболее близкородственными геномами. Как показано на диаграмме, оба генома SPP1 и D6E содержат области локального сходства с геномом Sam46, хотя и в пределах разных генных

модулей. D6E имеет много общих структурных генов с Sam46, тогда как сходство между SPP1 и Sam46 в основном ограничивается генами, связанными с репликацией.

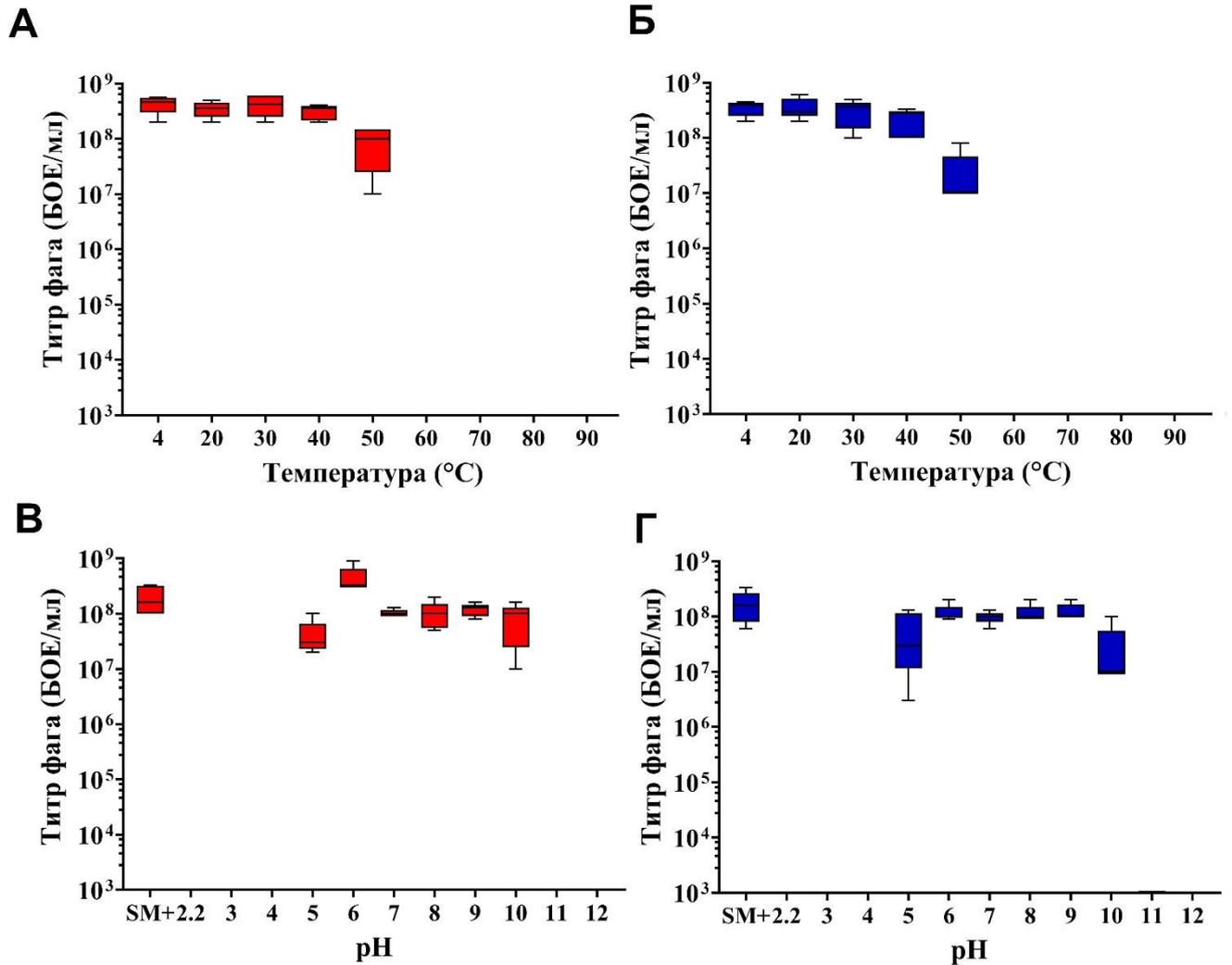


**Рисунок 13.** Попарное сравнение tBLASTx полногеномных последовательностей Sam46 и его ближайших родственных фагов, визуализированных с использованием сервера ViPTree версии 3.6. ОПС окрашены исходя из функций белков, которые они кодируют (см. обозначения). Серые области между картами геномов демонстрируют уровень идентичности (от 0 до 100%, см. обозначение справа). Рисунок из работы [201].

### 3.1.6. Определение температурной и pH стабильностей

В результате определения температурной стабильности бактериофагов Sam46-T и Sam46-C было выявлено, что фаги стабильны в диапазоне температур от 20 до 40°C. Титры фагов при 20, 30 и 40°C были сопоставимы с титрами в контрольных образцах, инкубированных при 4°C (Рис. 14, А и Б). При 50°C титр фагов снижался незначительно по сравнению с контролем (Рис. 14, А и Б) (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Однако при 60°C и выше титр фагов резко падал и присутствие активных вирусных частиц не детектировалось на газонах чувствительного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 (Рис. 14, А и Б) (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Результаты тестов на pH стабильность показали, что фаги Sam46-T и Sam46-C были стабильны в диапазоне значений pH от 5,0 до 10,0 (Рис. 14, В и Г): титры фагов в экспериментальных образцах были сравнимы с титрами в контрольных образцах, где фаги инкубировались в SM+ буфере. Фаги Sam46-T и Sam46-C не

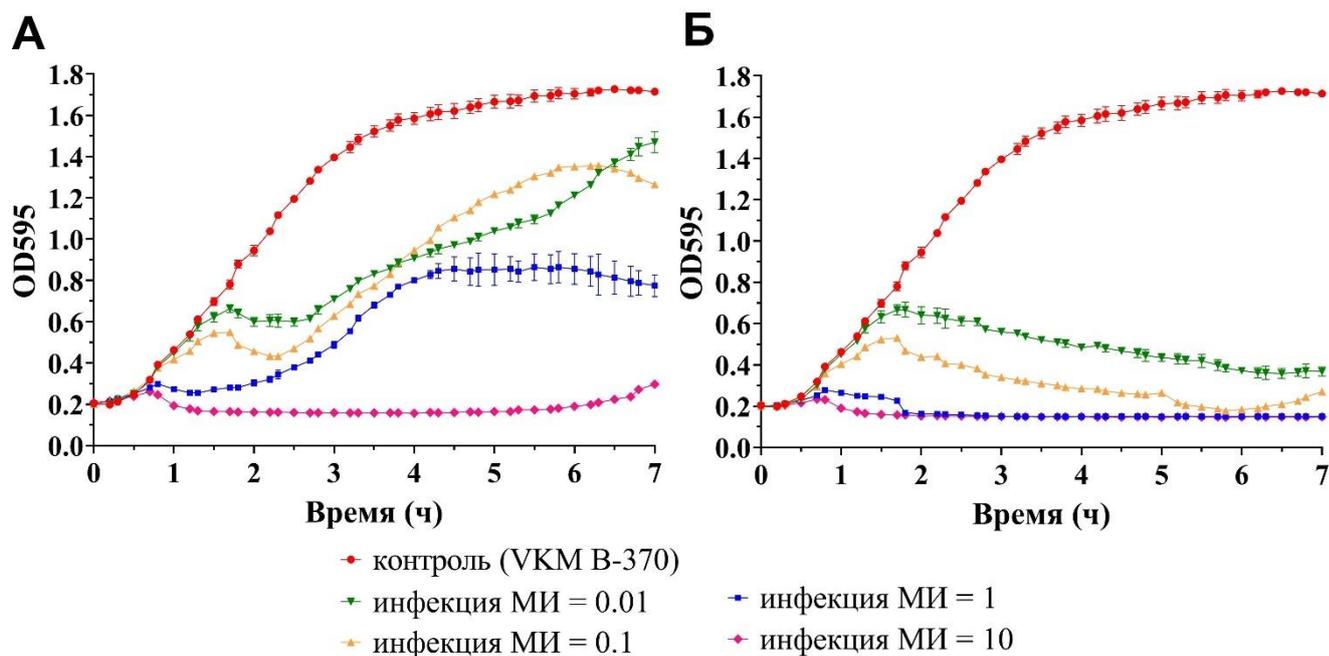
выдерживают кислых условий среды, поскольку после инкубации в растворах с pH 2,2, 3,0 и 4,0 не было обнаружено активных фагов (Рис. 14, В и Г) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) [201].



**Рисунок 14.** Температурная (А, Б) и pH (В, Г) стабильности бактериофагов Sam46-T (А, В) и Sam46-C (Б, Г). Графики построены в GraphPad Prism 8.4.3 [322] с доверительным интервалом 95% по результатам пяти независимых повторов.

### 3.1.7. Анализ литической активности

Для определения литической активности бактериофагов Sam46-T и Sam46-C в отношении чувствительного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 проводили измерение кривых роста бактериального штамма при заражении бактериофагами при различной МИ и последующим сравнением с кинетикой роста неинфицированной контрольной культуры (Рис. 15). Заражение как Sam46-T, так и Sam46-C приводило к ингибированию роста бактерий, которое становилось сильнее при увеличении значения МИ. Однако характер кривых роста *B. cereus* ВКМ В-370 при заражении Sam46-C и Sam46-T достоверно различался при МИ 0,01, 0,1 и 1 (Рис. 15).

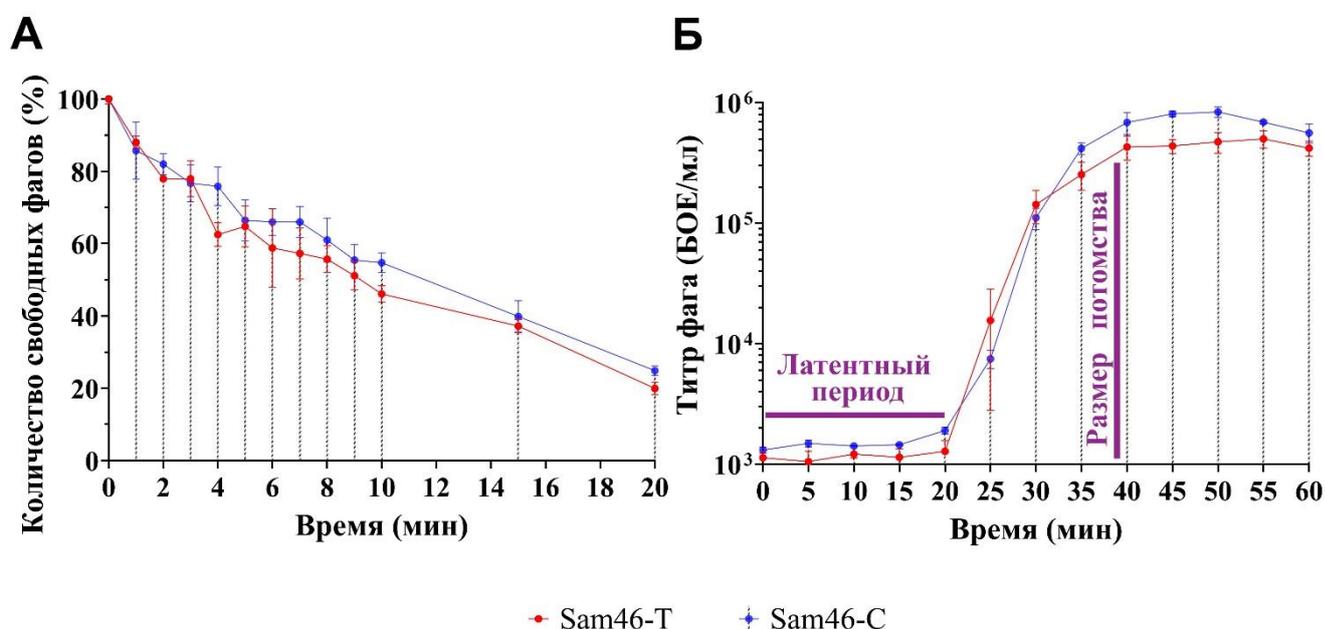


**Рисунок 15.** Кинетика роста *B. cereus* ВКМ В-370 при заражении бактериофагами Sam46-T (А) и Sam46-C (Б) при различных значениях множественности инфекции (см. обозначения). В качестве контроля использовали неинфицированную культуру *B. cereus* ВКМ В-370. Графики построены в GraphPad Prism 8.4.3 [322]. Отдельные точки представляют собой среднее значение трех независимых повторов, а планки погрешностей – стандартное отклонение. Рисунок из работы [201].

### 3.1.8. Анализ адсорбции и одноступенчатая кривая роста

Анализ адсорбции проводили для определения скорости, с которой фаги Sam46-T и Sam46-C прикрепляются на клеточной поверхности *B. cereus* ВКМ В-370. Из Рис. 16, А, видно, что скорости адсорбции Sam46-T и Sam46-C схожи: около 50% и 80% фагов способны адсорбироваться на бактериальных клетках в течение 10 и 20 мин, соответственно. Скорость адсорбции Sam46-T и Sam46-C составила  $9,68 \pm 0,36 \times 10^{-10}$  мл/мин и  $9,20 \pm 0,20 \times 10^{-10}$  мл/мин, соответственно.

Кинетику роста Sam46-T и Sam46-C определяли методом «Одноступенчатой кривой роста». Латентный период как фага Sam46-T, так и Sam46-C длится около 20 мин, а продолжительность одного литического цикла фагов составляет 15-20 мин. Размеры потомства в пересчете на одну инфицированную бактериальную клетку для фагов Sam46-T и Sam46-C составили  $450,5 \pm 70,5$  БОЕ и  $565,6 \pm 64,6$  БОЕ, соответственно (Рис. 16, Б).

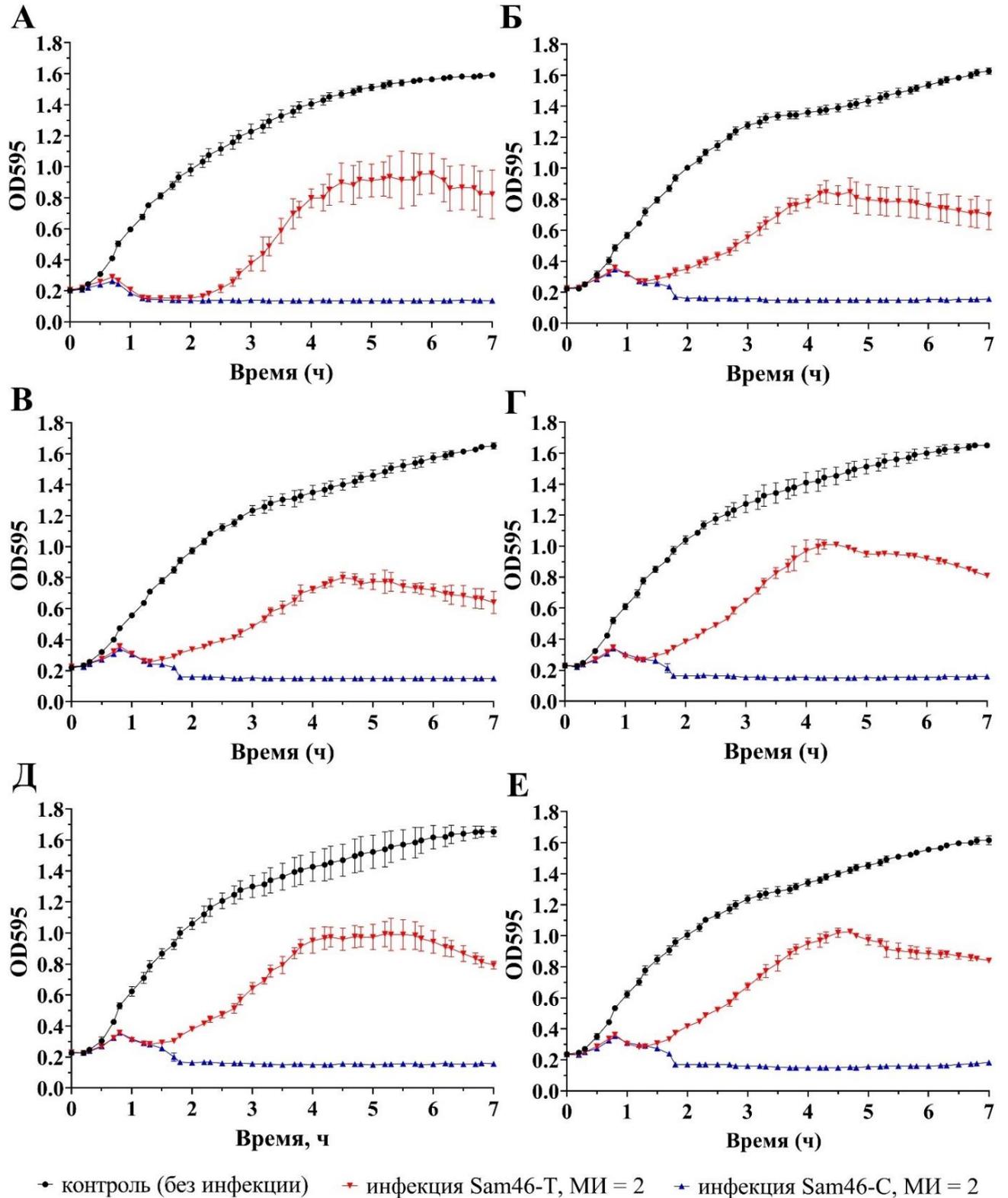


**Рисунок 16.** Параметры инфекции: **А.** Анализ адсорбции и **Б.** Одноступенчатая кривая роста фагов Sam46-T и Sam46-C. Графики были созданы с помощью GraphPad Prism 8.4.3 [322]. Отдельные точки представляют собой среднее значение трех независимых повторов, а планки погрешностей – стандартное отклонение. Рисунок из работы [201].

### 3.1.9. Тест на возникновение лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 в ходе инфекции Sam46-Т

Известно, что умеренные фаги, находясь в форме профага, придают своим лизогенным бактериям-хозяевам «иммунитет» к фагам, идентичным или близкородственным к этому профагу. Это явление известно под названием «иммунитет к суперинфекции» или «исключение суперинфекции» [24, 177, 277] и может использоваться для обнаружения присутствия профагов. Было выдвинуто предположение, что различие в морфотипах бляшек Sam46-С и Sam46-Т (Рис. 4), а также разница в скорости лизиса бактериальных клеток *B. cereus* ВКМ В-370 (Рис. 15) может быть связана с образованием лизогенного бактериального штамма в ходе фаговой инфекции Sam46-Т. Таким образом, часть бактериальной популяции, которая приобретала бы «иммунитет к суперинфекции» в виде профага Sam46-Т, продолжала бы рост даже при наличии свободного фага в среде и, как результат, мутный морфотип бляшек на чашках и рост бактериальной культуры в жидкой среде.

Для оценки «иммунитета» предполагаемых лизогенных штаммов *B. cereus* ВКМ В-370 были собраны образцы бактериальных культур (предполагаемых лизогенов) из центра пяти мутных бляшек. Полученные культуры пересеивали трижды и затем повторно инфицировали бактериофагами Sam46-Т или Sam46-С, как описано в пункте 2.2.13. Анализ результатов исследования кривых роста бактериальных штаммов *B. cereus* ВКМ В-370: как исходного штамма (Рис. 17, А), так и предполагаемых лизогенных штаммов (Рис. 17, Б-Е), не выявил каких-либо значимых различий в характере инфекций. Как показано на Рис. 17, оптическая плотность предполагаемых лизогенных культур *B. cereus* ВКМ В-370 (Рис. 17, Б-Е) снижалась аналогично оптической плотности исходного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 (Рис. 17, А).

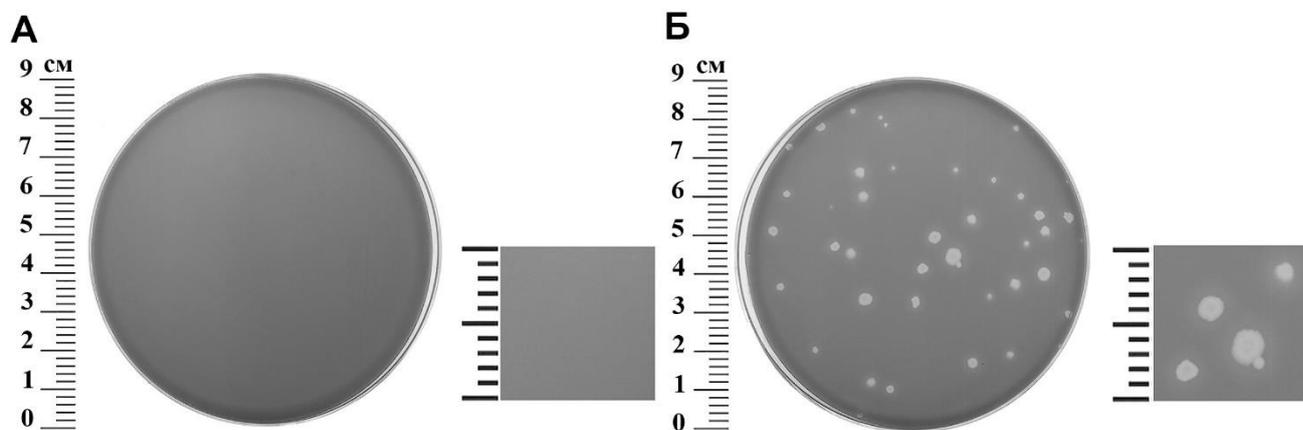


**Рисунок 17.** Кинетика роста предполагаемых лизогенных штаммов *B. cereus* ВКМ В-370 при повторном заражении бактериофагами Sam46-T и Sam46-C. Измерение проводили на исходном штамме *B. cereus* ВКМ В-370, используемом в качестве контроля (А), и пяти культурах предполагаемых лизогенных штаммов (Б-Е), собранных из центральной части пяти отдельных мутных бляшек фага Sam46. Графики построены в GraphPad Prism 8.4.3 [322]. Отдельные точки представляют собой среднее значение трех независимых повторов, а планки погрешностей – стандартное отклонение. Рисунок из работы [201].

## 3.2. Умеренный бактериофаг Kirov

### 3.2.1. Выделение, спектр литического действия и морфология

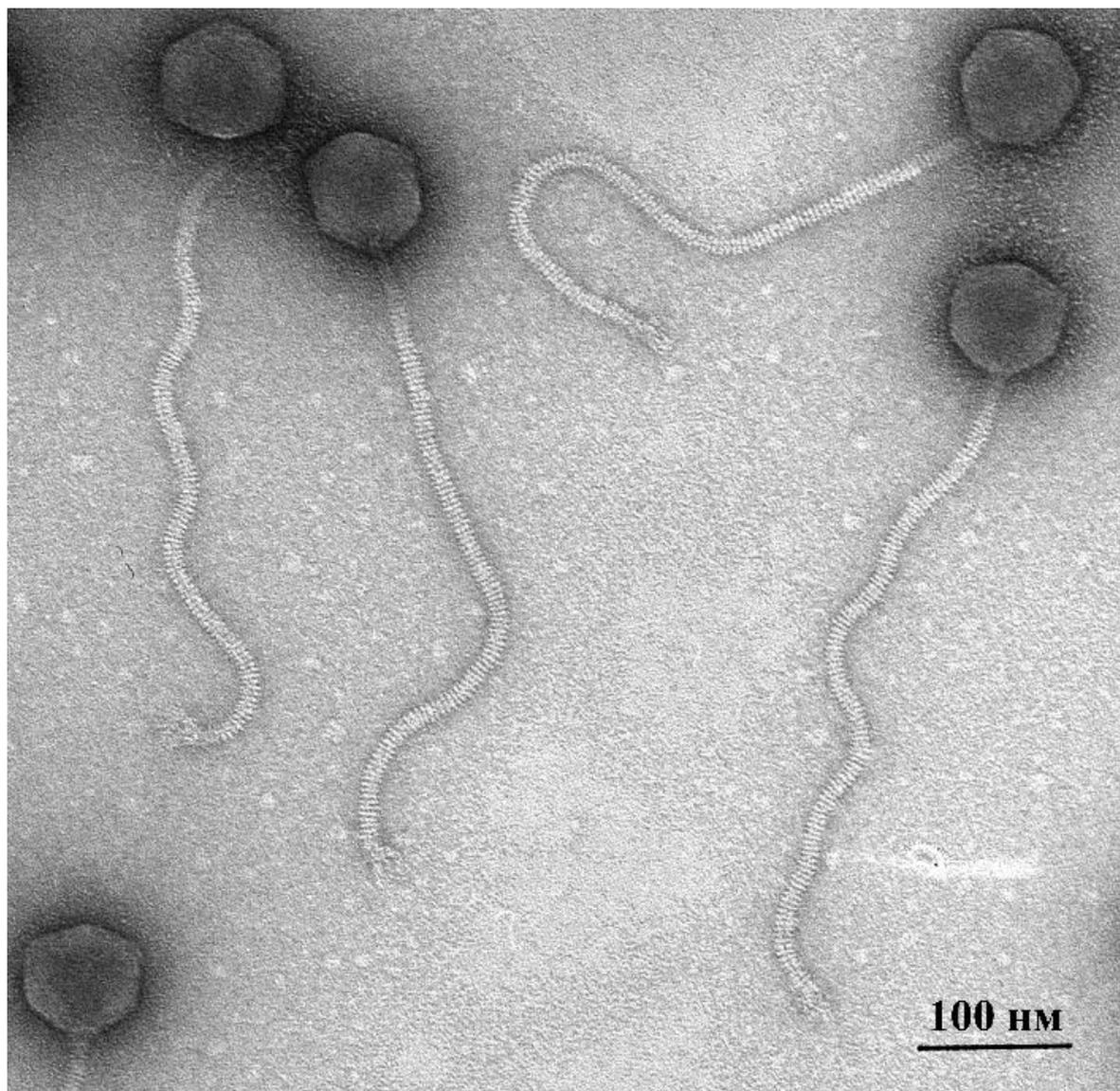
Бактериофаг *Kirovirus kirovense* Kirov был выделен из почвенного образца, отобранного в г. Киров, Российская Федерация [1, 4, 17, 19]. На газоне чувствительного штамма *B. tropicus* ATCC 4342 фаг продуцировал прозрачные бляшки диаметром приблизительно 3-6 мм (Рис. 18).



**Рисунок 18.** Морфология бляшек бактериофага Kirov на газоне штамма *B. tropicus* ATCC 4342. **А** – контроль (без фаговой инфекции); **Б** – *B. tropicus* ATCC 4342, инфицированный очищенным фагом Kirov. Рисунок из работы [19].

Анализ спектра чувствительных штаммов бактериофага Kirov показал, что фаг способен инфицировать 12 (32%) из 38 протестированных бактериальных штаммов *B. cereus* s. l. (Приложение Е, Таблица П7).

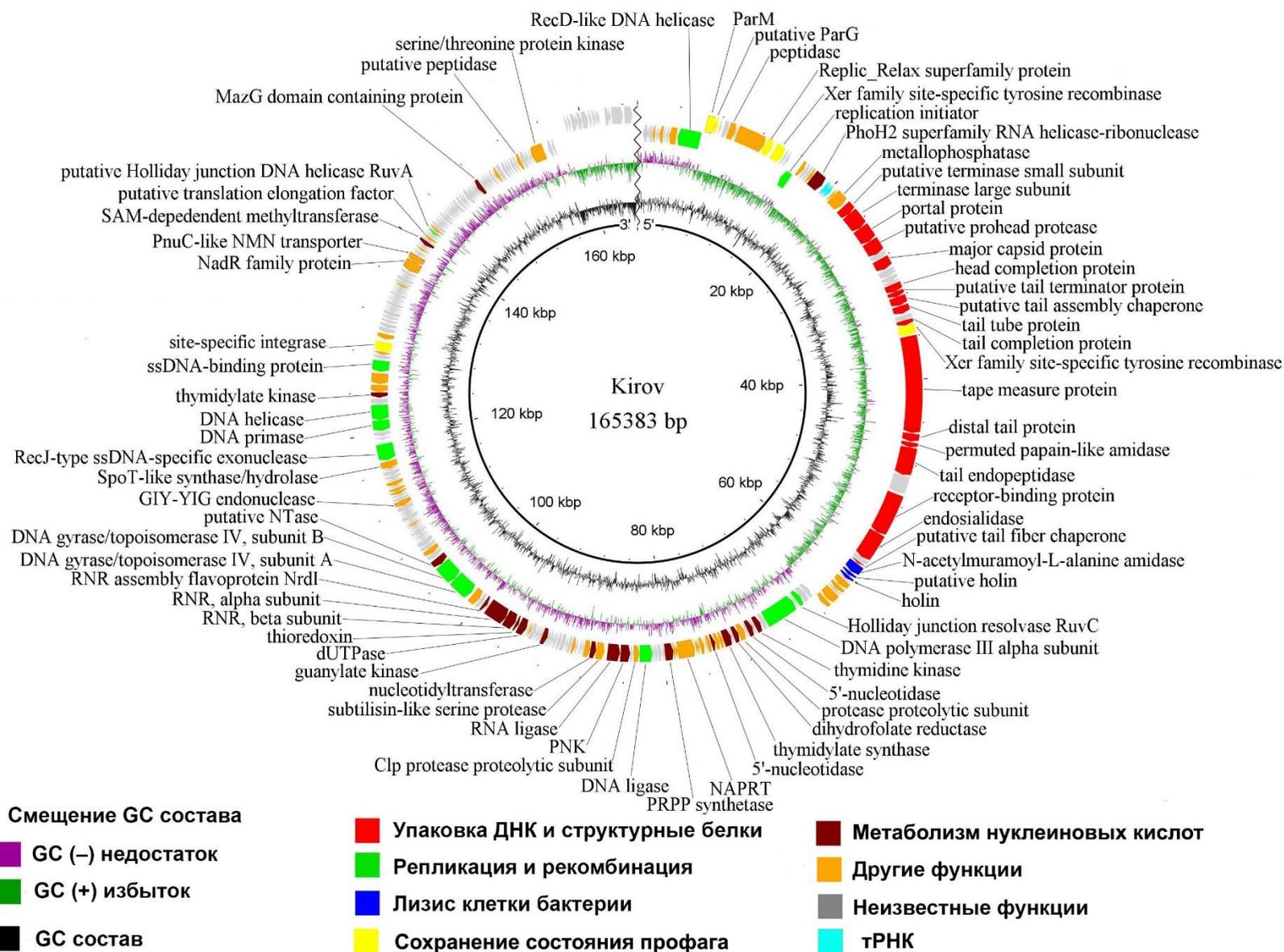
Анализ ТЕМ выявил, что Kirov обладает икосаэдрической невытянутой головкой диаметром примерно  $78,3 \pm 2,10$  нм, прикрепленной к характерному длинному несократимому гибкому хвосту длиной примерно  $437,6 \pm 12,10$  нм (не включая структуру базальной пластины) и шириной  $12,3 \pm 0,90$  нм (Рис. 19). Хвост бактериофага заканчивается базальной пластиной с выступающими волокнообразными структурами – фибриллами (Рис. 19). Также на микрофотографиях было отчетливо видно, что некоторые вирионы фагов взаимодействуют друг с другом своими хвостовыми фибриллами (не представлены в работе). Хвост содержит около 110 видимых поперечных «полос» – дискообразных структур. Таким образом, фаг обладает всеми характерными морфологическими признаками морфотипа сифовирус (Рис. 19) [4, 19].



**Рисунок 19.** Трансмиссионная электронная микроскопия вирионов бактериофага Kirov. Изображения вирионов были получены с использованием 1% (масса/объем) уранилацетата для негативного контрастирования. Рисунок из работы [19].

### 3.2.2. Организация генома Kirov

В результате сборки генома был получен один контиг длиной 165383 н.п. и GC-составом 35,5%. Геном фага Kirov содержит 280 предсказанных генов, в том числе 275 генов, кодирующих белки, и пять генов тРНК. Из 275 белок-кодирующих генов 108 (39,3%) были функционально аннотированы с помощью BLASTp (NCBI) и HHPred. Важно отметить, что хотя гены Kirov могут быть разделены на несколько функциональных групп (Рис. 20), большинство из них разбросаны по геному и не всегда образуют очевидные «модули генов», как это часто бывает у фагов с меньшими геномами. Для представления генома фага Kirov генетическая карта визуализирована в виде круговой диаграммы (Рис. 20), где за начало генома принято первое основание короткого терминального повтора (см. пункт 3.2.3.).



**Рисунок 20.** Карта генома бактериофага Kirov. ОПС окрашены исходя из функций белков, которые они кодируют (см. обозначения). Сокращения: NAPRT – никотинатфосфорибозилтрансфераза, PRPP synthetase – фосфорибозилпирофосфатсинтетаз; PNK – полинуклеотидкиназа; NTase – нуклеотидилтрансфераза; RNR – рибонуклеотидредуктаза. Рисунок из работы [19].

### *Модуль упаковки ДНК*

Модуль упаковки ДНК фага Kirov состоит из двух генов, которые кодируют малую (YP\_010679460) и большую (YP\_010679461) субъединицы терминазы (Рис. 20), обладающие высоким сходством 94% и 92% белковой идентичности с субъединицами терминазы ближайшего родственного фага PBC2 (см. пункт 3.2.4.), соответственно.

### *Структурный модуль*

Идентифицированные гены структурного модуля кодируют белки, из которых состоят зрелые вирусные частицы, а также белки, участвующие в сборке вириона: порталный белок (YP\_010679462), предполагаемая протеаза проголовки (YP\_010679463), главный белок капсида (YP\_010679465.1), белок завершения сборки головки фага (YP\_010679469), предполагаемый белок терминатор хвоста (YP\_010679470), предполагаемый шаперон сборки хвоста (YP\_010679471), белок хвостовой трубки (YP\_010679472), белок завершения сборки хвоста (YP\_010679474), TMP-белок хвоста (YP\_010679476), дистальный белок хвоста (YP\_010679477), эндопептидаза хвоста (YP\_010679479), рецептор-связывающий белок (YP\_010679481), эндосиалидаза (YP\_010679482) и предполагаемый шаперон сборки фибрилл хвоста (YP\_010679484).

### *Литический модуль*

Литические гены кодируют N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазу (YP\_010679485), предполагаемый холин (YP\_010679486) и холин (YP\_010679487) [2].

### *Модуль репликации и рекомбинации*

Белки, связанные с репликацией и рекомбинацией фага Kirov, включают: инициатор репликации (YP\_010679452), RecD-подобную ДНК-хеликазу (YP\_010679440), белок, содержащий С-концевой домен RuvA (YP\_010679642), белок, связывающий одноцепочечную ДНК (YP\_010679605), репликативную хеликазу типа DNAB (YP\_010679597), ДНК-праймазу (YP\_010679596), RecJ-подобную экзонуклеазу (YP\_010679593), субъединицы А и В ДНК-гиразы/топоизомеразы IV (YP\_010679559 и YP\_010679560, соответственно), ДНК-лигазу (YP\_010679524),  $\alpha$ -субъединица ДНК-полимеразы III (YP\_010679498) и RuvC-подобную резольвазу структуры Холлидея (YP\_010679496).

### *Модуль поддержания состояния профага*

В геноме фага Kirov, обнаружен ген кодирующий сайт-специфичную интегразу (YP\_010679606). Фаг Kirov обладает двумя генами, кодирующими сайт-специфические тирозинрекомбиназы семейства Xer (YP\_010679449 и YP\_010679475), которые участвуют в разрешении димерных форм бактериальных хромосом и кольцевых плазмид [348]. В геноме фага также закодирован белок суперсемейства Replic\_Relax (YP\_010679448), ParM-подобный белок

(YP\_010679441) и предполагаемый ParG-подобный белок (YP\_010679442), общие компоненты систем релаксации и разделения плазмид.

#### *Модуль метаболизма нуклеиновых кислот*

Бактериофаг Kirov кодирует большой набор белков, участвующих в различных процессах метаболизма нуклеиновых кислот, таких как метилирование, синтез нуклеотидов, репарация и сплайсинг тРНК и др.: SAM-зависимая метилтрансфераза (YP\_010679637), тимидилаткиназа (YP\_010679599), нуклеотидилтрансфераза (YP\_010679561), альфа- и бета-субъединицы рибонуклеотид-дифосфатредуктазы (YP\_010679554 и YP\_010679553, соответственно), тиоредоксин (YP\_010679552), dUTP дифосфатаза (YP\_010679551), гуанилаткиназа (YP\_010679544), РНК-лигаза (YP\_010679528), полинуклеотид киназа (YP\_010679527), 5'-нуклеотидаза (YP\_010679502), тимидилатсинтаза (YP\_010679507), дигидрофолатредуктаза (YP\_010679505), тимидинкиназа (YP\_010679500) и РНК-хеликаза-рибонуклеаза (YP\_010679457).

Среди остальных генов, не отнесенных ни к одному из основных модулей, можно выделить гены, кодирующие липопротеины с сигнальными последовательностями (YP\_010679511, YP\_010679584, YP\_010679585, YP\_010679607, YP\_010679644 и YP\_010679676). Кроме того, в геноме фага Kirov присутствует ген, кодирующий эндонуклеазу семейства GIY-YIG (YP\_010679581), которой была присвоена предполагаемая функция хоминг-эндонуклеазы [123].

Были также идентифицированы гены, связанные с метаболизмом никотинамидадениндинуклеотида (НАД), кодирующие: PnuC-подобный переносчик никотинамидмононуклеотидов (YP\_010679631), никотинамиднуклеотид-аденилилтрансфераза NadR-типа (YP\_010679630) и никотинат-фосфорибозилтрансфераза (YP\_010679516).

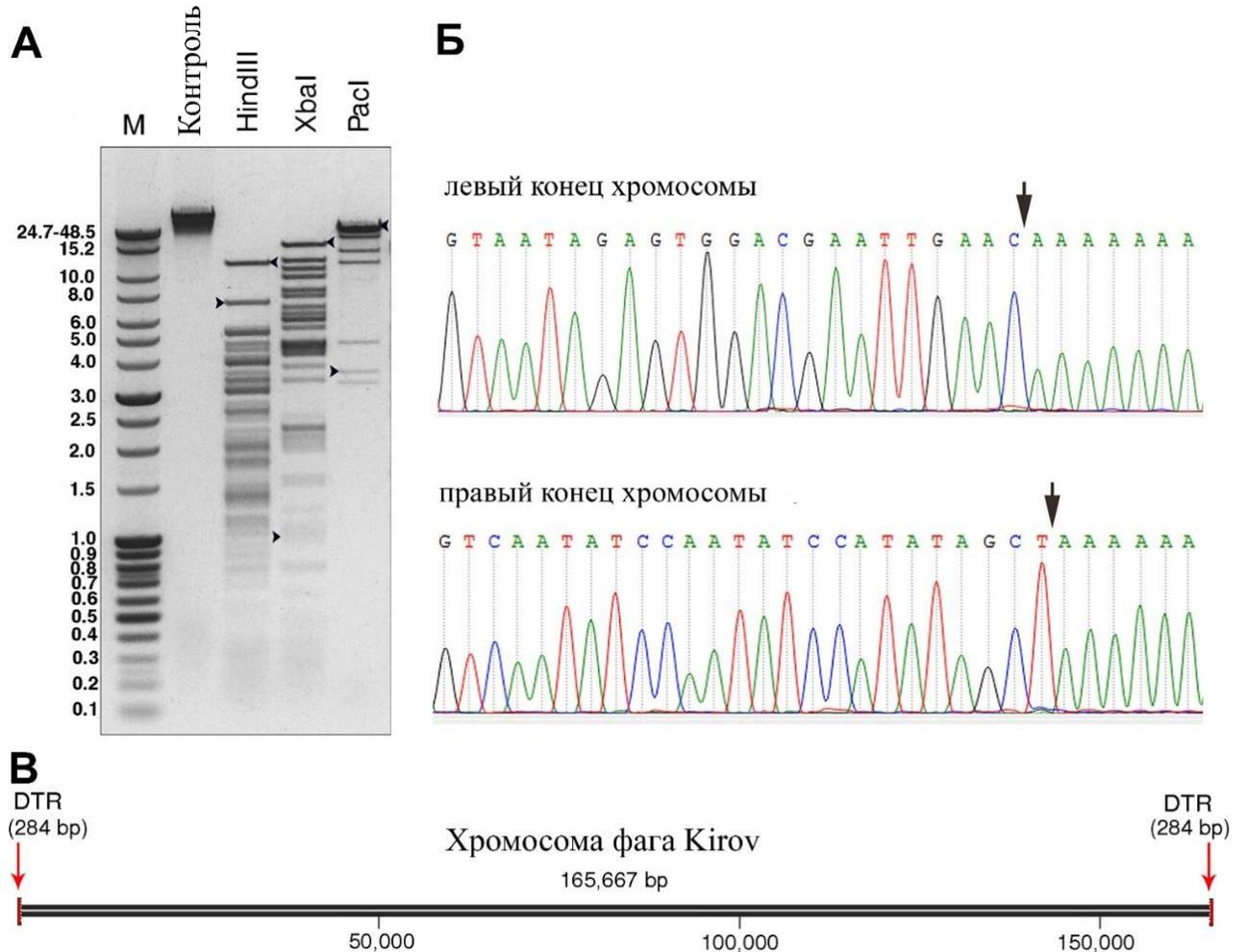
Помимо этого, в геноме фага Kirov был обнаружен ген, кодирующий белок споруляции Cse60 (YP\_010679514).

### **3.2.3. Определение стратегии упаковки ДНК**

С учетом сходства геномных последовательностей фага Kirov и ранее описанного фага vB\_VanS\_Tsamsa, у которого известен тип упаковки ДНК «Short DTR» [252], предполагалось, что исследуемый фаг обладает похожим механизмом упаковки. Однако на графике покрытия прочтений на геном (не показан в работе) области, отклоняющиеся более чем в 2 раза от среднего покрытия [307], не были представлены, поэтому при таком биоинформатическом подходе было сложно определить концы генома Kirov. Филогенетический анализ большой субъединицы терминазы фага Kirov также не дал однозначного ответа относительно механизма упаковки исследуемого фага, поскольку терминаза фага Kirov кластеризуется отдельной кладой (см. пункт

3.1.4.) при значительном удалении от белков других фагов, включая большую субъединицу терминазы ближайшего родственного *Bacillus*-инфицирующего фага PBC2 (Рис. 9).

Концы генома фага Kirov были точно определены с помощью рестрикционного анализа ДНК (Рис. 21, А) и метода RAGE с последующим секвенированием по Сэнгеру (Рис. 21, Б). Анализ результатов экспериментов выявил наличие двух коротких прямых терминальных повторов (DTRs) на концах хромосомы, каждый из которых длиной 284 н.п. Таким образом, длина генома и хромосомы фага Kirov составили 165383 н.п. и 165667 н.п., соответственно. Схематическое изображение хромосомы фага показано на Рис. 21, В.

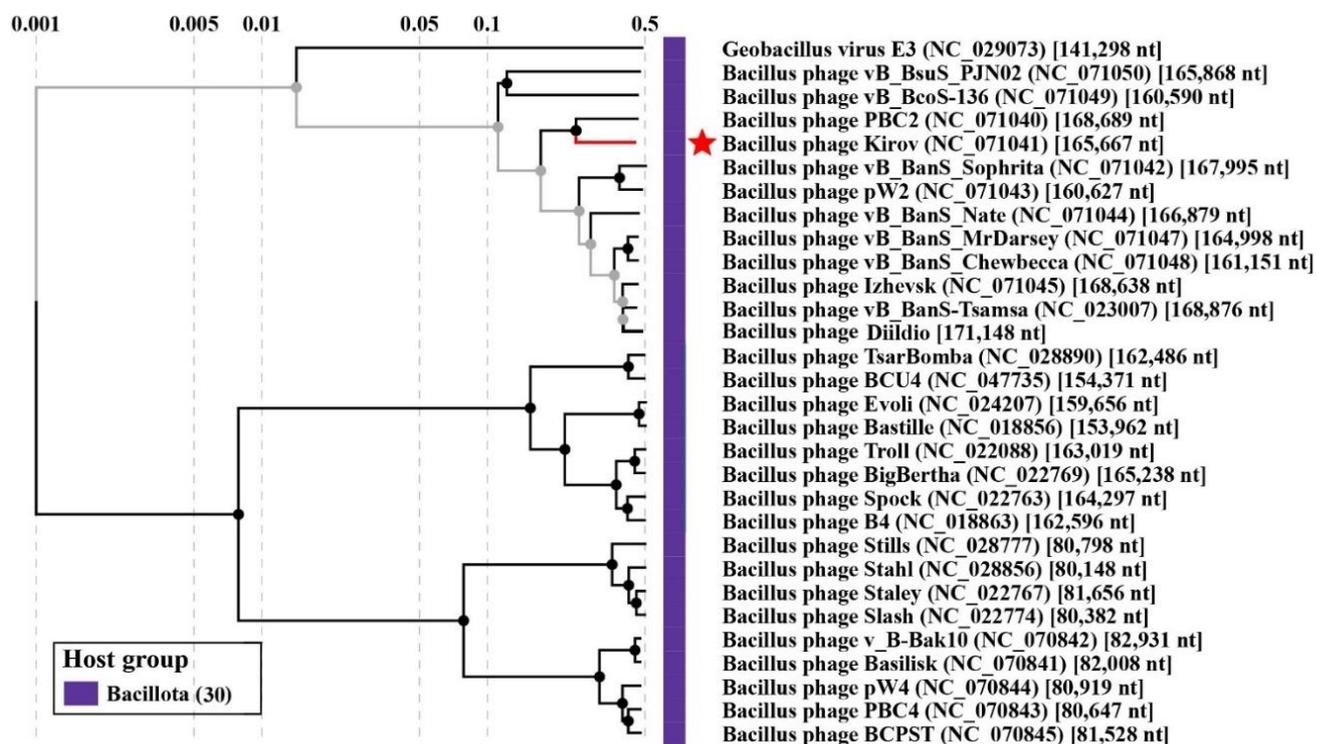


**Рисунок 21.** Определение механизма упаковки ДНК фага Kirov. **А.** Рестрикционный анализ ДНК Kirov с HindIII, XbaI и PacI; М – маркеры длин ДНК-фрагментов. Черными стрелками указаны фрагменты ДНК, содержащие концы хромосомы. **Б.** Концевые последовательности хромосомы фага, определенные с помощью RAGE. Концевые области обозначены черными стрелками на хроматограммах секвенирования. **В.** Схема хромосомы фага Kirov. Рисунок из работы [19].

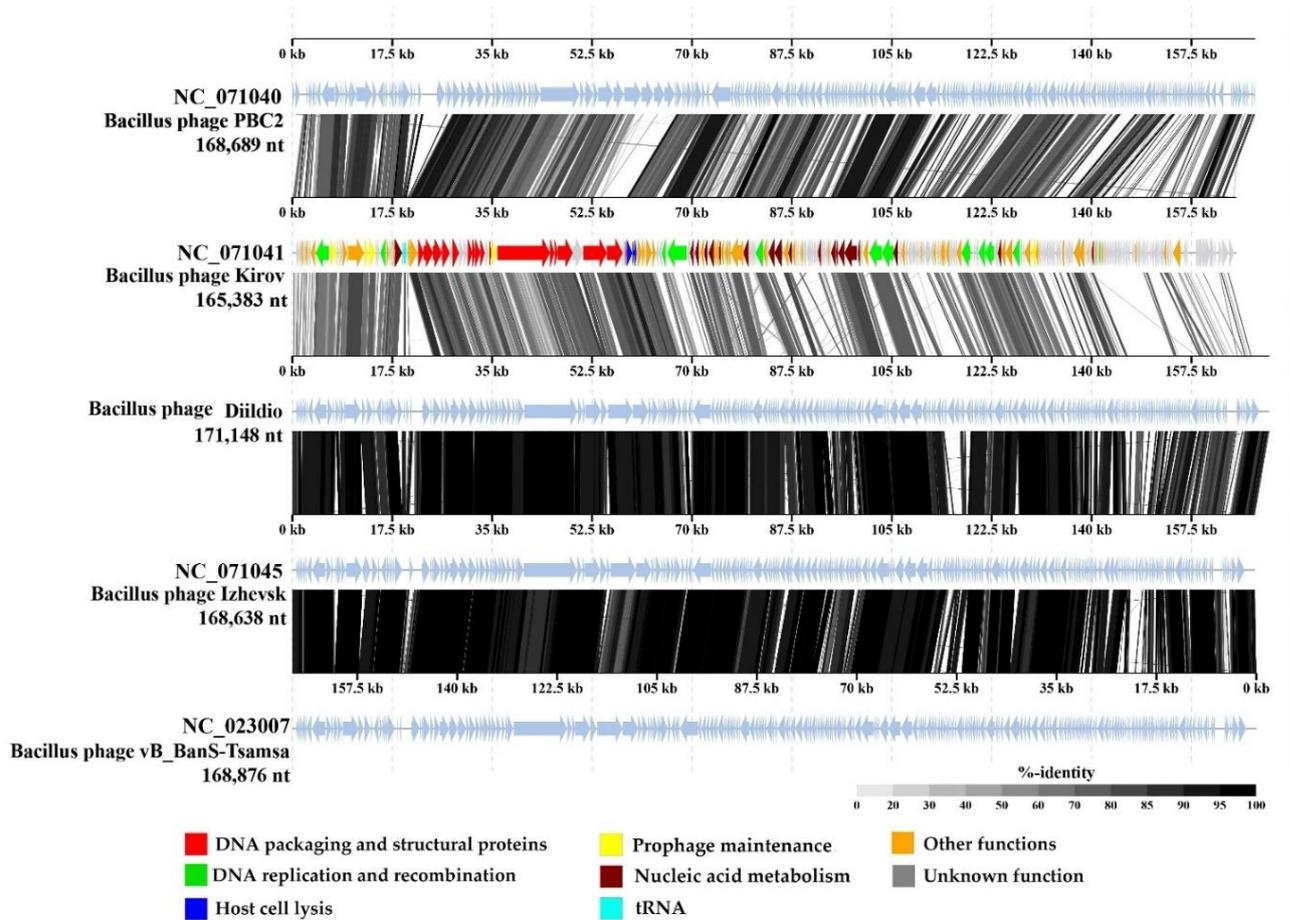
### 3.2.4. Сравнительный геномный анализ

Для обнаружения родственных фагов был проведен поиск BLASTn в базе данных NCBI (Viruses, taxid:10239) и базе данных *Bacillus*-инфицирующих фагов BPD

(<http://bacillus.phagesdb.org/>), используя полногеномную последовательность фага Kirov в качестве последовательности-запроса. На филогенетическом древе (Рис. 22), построенном с помощью VirTree версии 3.6, показано, что ближайшим родственным фагом для Kirov является ранее описанный фаг *Bacillus* PBC2 с морфотипом сифовирус [230]. Фаг Kirov имеет с PBC2 60,3% нуклеотидной идентичности и 156 (60,2%) общих белков (Приложение Г, Таблица П5). Линейная полногеномная сравнительная диаграмма на Рис. 23 показывает попарное сходство tBLASTx между фагом Kirov и его родственными фагами: PBC2, Diildio (загруженный из базы данных BPD), Izhevsk [35], vB\_BanS-Tsamsa [252].



**Рисунок 22.** Вирусное протеомное дерево, включающее фаг Kirov и его родственные фаги. Дерево было построено по результатам анализа VirTree 3.6. с использованием метрики расстояния между белками на основе нормализованных показателей tBLASTx, нанесенных на логарифмическую шкалу. Красная звезда указывает на фаг Kirov. Рисунок из работы [19].

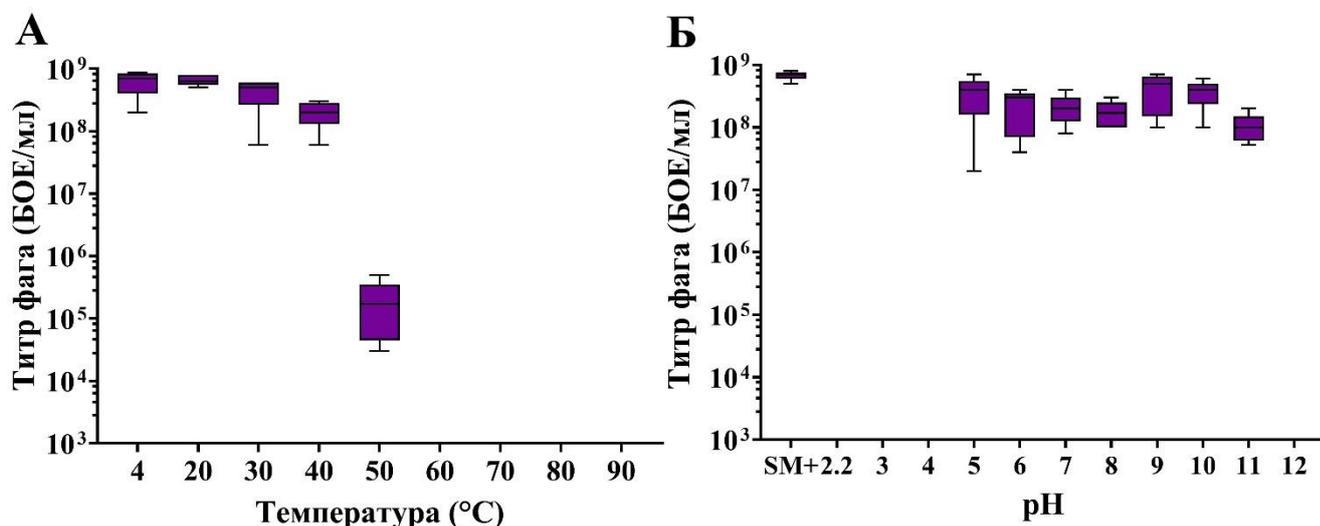


**Рисунок 23.** Парное сравнение tBLASTx полногеномных последовательностей фага Kirov и его ближайших родственных фагов, визуализированных с использованием сервера ViPTree версии 3.6. ОРС окрашены исходя из функций белков, которые они кодируют (см. обозначения). Серые области между картами геномов демонстрируют уровень идентичности (от 0 до 100%, см. обозначение справа). Рисунок из работы [19].

### 3.2.5. Определение температурной и pH стабильностей

Результат анализа термостабильности фага Kirov свидетельствуют о том, что фаг высокостабилен в диапазоне температур от 20 до 40°C, поскольку титры фага были аналогичны титру в контрольном образце, инкубированном при 4°C (Рис. 24, А). При 50°C титр фага снижался примерно на три порядка по сравнению с контрольным образцом (ANOVA,  $p < 0,05$ ). В условиях инкубации при 60°C и более высоких температурах частицы фага Kirov не выживали (ANOVA,  $p < 0,05$ ) [4, 19].

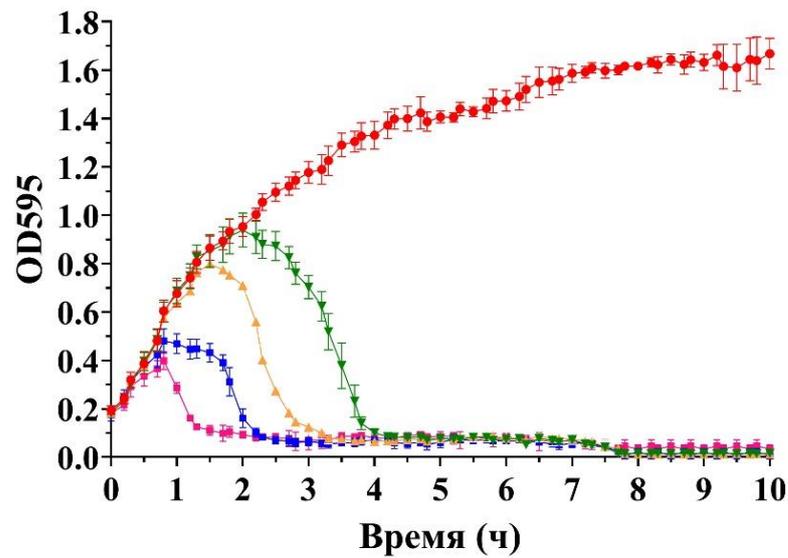
Тест на pH-стабильность показал, что фаг остается стабильным в диапазоне pH от 5,0 до 11,0 (Рис. 24, Б), на что указывают сопоставимые с контролем (SM+) титры фагов. В то же время после инкубации при pH 2,2; 3,0 и 4,0 литической активности фага не наблюдалось (ANOVA,  $p < 0,05$ ) [4, 19].



**Рисунок 24.** Температурная (А) и pH (Б) стабильности бактериофага Kirov. Графики построены в GraphPad Prism 8.4.3 [322] с доверительным интервалом 95% по результатам пяти независимых повторов. Рисунок из работы [19].

### 3.2.6. Анализ литической активности

Анализ кривых роста культуры *B. tropicus* ATCC 4342 при различных значениях множественности инфекции фагом Kirov показал, что в исследованном диапазоне МИ от 0,01 до 10 фаг проявляет высокую литическую активность. Наблюдается корреляция между значением МИ и скоростью лизиса культуры: при МИ, равном 10, требовалось около 1 часа для полного лизиса культуры, а при МИ равном 0,01 около 4-х часов (Рис. 25). Стоит также отметить, что при размножении фага Kirov на штамме ATCC 4342 при различном значении МИ наблюдается полный лизис культуры, который по виду напоминает чистую среду LB.



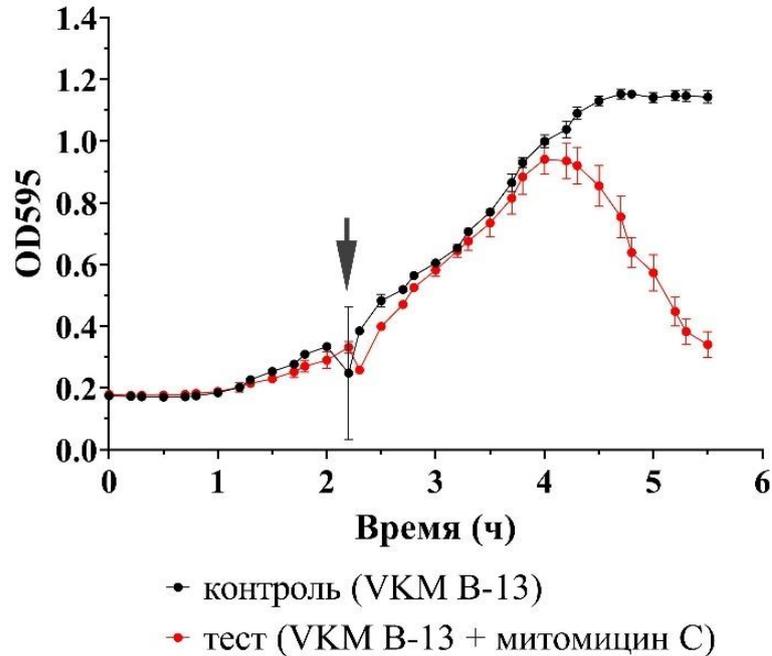
- контроль (ATCC 4342)
- инфекция МИ = 0.01
- инфекция МИ = 0.1
- инфекция МИ = 1
- инфекция МИ = 10

**Рисунок 25.** Кинетика роста *B. tropicus* ATCC 4342 при заражении бактериофагом Kirov при различных значениях множественности инфекции (см. обозначения). В качестве контроля использовали неинфицированную культуру *B. tropicus* ATCC 4342. Графики построены в GraphPad Prism 8.4.3 [322]. Отдельные точки представляют собой среднее значение трех независимых повторов, а планки погрешностей – стандартное отклонение. Рисунок из работы [19].

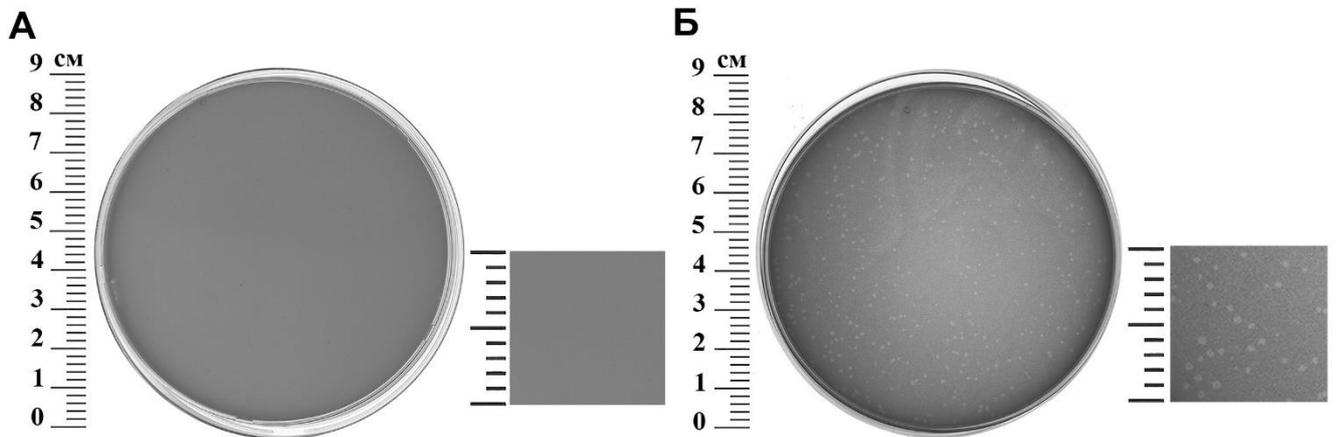
### 3.3. Умеренный бактериофаг В13

#### 3.3.1. Выделение, спектр литического действия и морфология

Умеренный бактериофаг *Bunatrivirus bunatris* В13 был выделен из штамма-хозяина *B. cereus* ВКМ В-13 путем индукции профага митомицином С (Рис. 26) [8, 11, 12].



**Рисунок 26.** Индукция профага лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-13 митомицином С. Черной стрелкой обозначено время добавления митомицина С к бактериальной культуре.



**Рисунок 27.** Морфология бляшек бактериофага В13 на газоне штамма *B. cereus* ВКМ В-370. А – контроль (без фаговой инфекции); Б – инфицирование *B. cereus* ВКМ В-370 очищенным препаратом В13. Рисунок из работы [200].

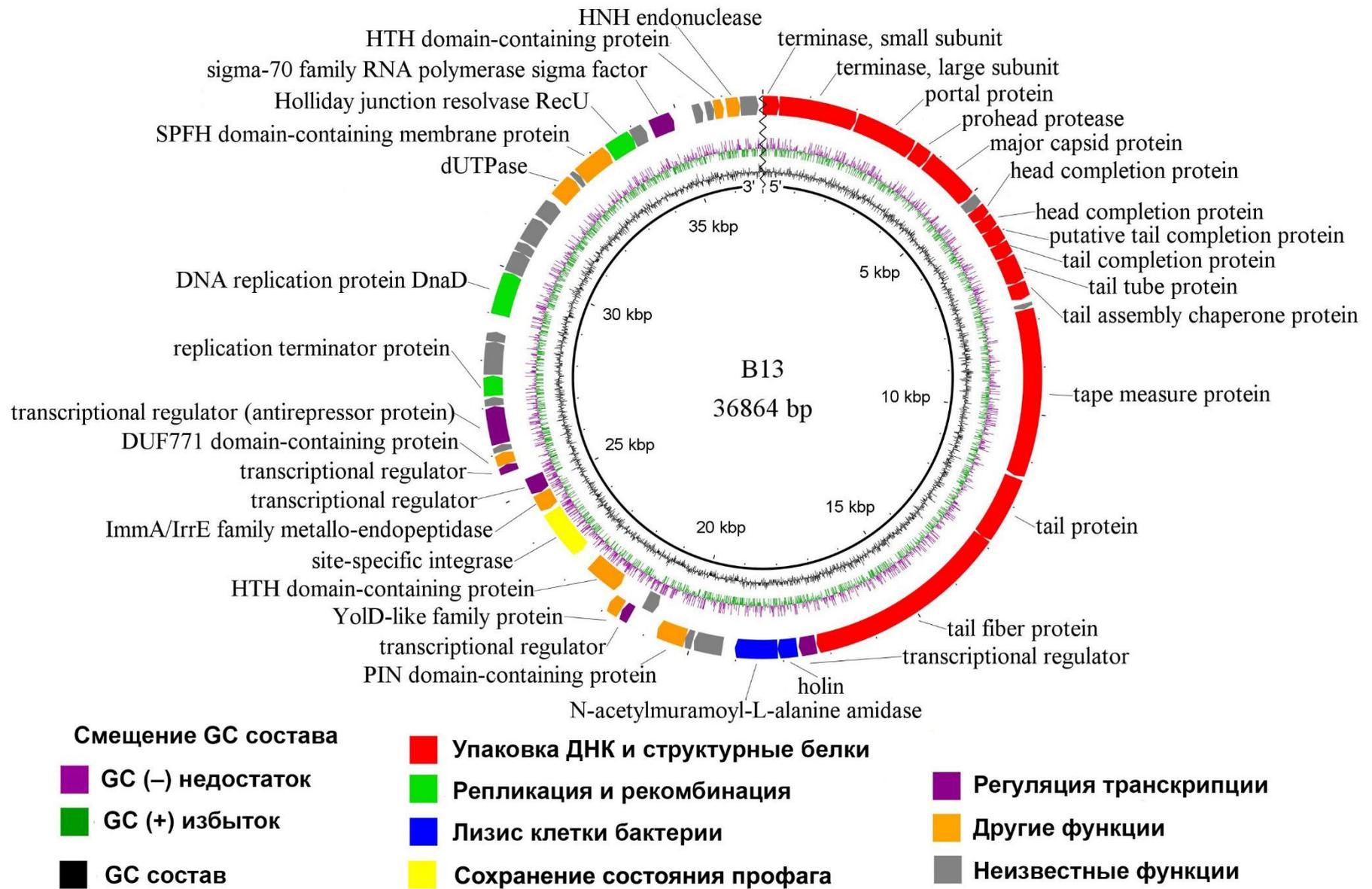
На чувствительном штамме *B. cereus* ВКМ В-370 фаг В13 образовывал мутные бляшки диаметром около 1–1,5 мм (Рис. 27, Б).

Для определения круга хозяев фага очищенный фаговый препарат В13 с титром  $10^6$  БОЕ/мл протестировали на газонах 38 штаммов группы *B. cereus* s. l., из которых 21 (55%) были чувствительны к фагу В13 (Приложение Е, Таблица П7).

К сожалению, трансмиссионная микроскопия фаговых частиц В13 не дала желаемого результата, поскольку при анализе микрофотографий отчетливо были видны деградированные вирионы В13. Предполагается, что данный фаг не выдерживает условий ультрацентрифугирования в хлористом цезии. В связи с этим, микрофотографии бактериофага В13 в данной работе не приведены.

### **3.3.2. Организация генома В13**

Геном В13 представляет собой линейную молекулу двухцепочечной ДНК длиной 36864 н.п. и GC-составом 34,8% [5, 8, 11, 12]. Геном фага содержит 53 предсказанных ОРС. Структурная организация генома В13 типична для умеренных фагов, при этом 48 генов (90,6%) расположены на одной цепи и пять — на противоположной. С использованием BLASTp и HHpred были функционально аннотированы 30 (56,6%) из 53 ОРС и далее разделены на функциональные модули (Рис. 28). Схематично круговая карта генома В13 представлена на Рис. 28, при этом для удобства представления генетической информации первое основание гена малой субъединицы терминазы было выбрано в качестве начальной точки генома.



**Рисунок 28.** Карта генома бактериофага B13. ОРС окрашены исходя из функций белков, которые они кодируют (см. обозначения). Рисунок из работы [200].

### *Модуль упаковки ДНК*

Модуль упаковки ДНК фага В13 включает в себя два гена, кодирующие малую (UUW40187) и большую (UUW40188) субъединицы терминазы.

### *Структурный модуль*

Гены структурного модуля В13, кодируют следующие белки морфогенеза капсида фага: порталный белок (UUW40189), прокапсидную протеазу (UUW40190), главный белок капсида (UUW40191) и два белка, завершающих сборку головы фага (UUW40193 и UUW40194). Белки хвоста фага и белки, участвующие в его сборке: предполагаемый белок завершения сборки хвоста (UUW40195), белок завершения сборки хвоста (UUW40196), белок хвостовой трубки (UUW40197), шаперон сборки хвоста (UUW40198), TMP-белок хвоста (UUW40200), дистальный белок хвоста (UUW40201) и белок хвостовых фибрилл (UUW40202) [8].

### *Литический модуль*

Гены литического модуля кодируют белки: холин (UUW40204) и N-ацетилмурамоил-L-аланинамидаза (UUW40205). Кроме того, было обнаружено, что белок хвостовых фибрилл фага В13 (UUW40202) содержит предполагаемый N-концевой эндопептидазный домен [8].

### *Модуль репликации и рекомбинации*

В данный модуль входят гены фага В13, кодирующие следующие белки: белок-терминатор репликации (UUW40221), DNAD-подобный загрузчик хеликазы (UUW40224) и RecU резольваза структуры Холлидея (UUW40232).

### *Модуль поддержания состояния профага*

В геноме фага присутствует ген, кодирующий сайт-специфическую тирозин-интегразу (UUW40213), окруженный генами-регуляторами транскрипции.

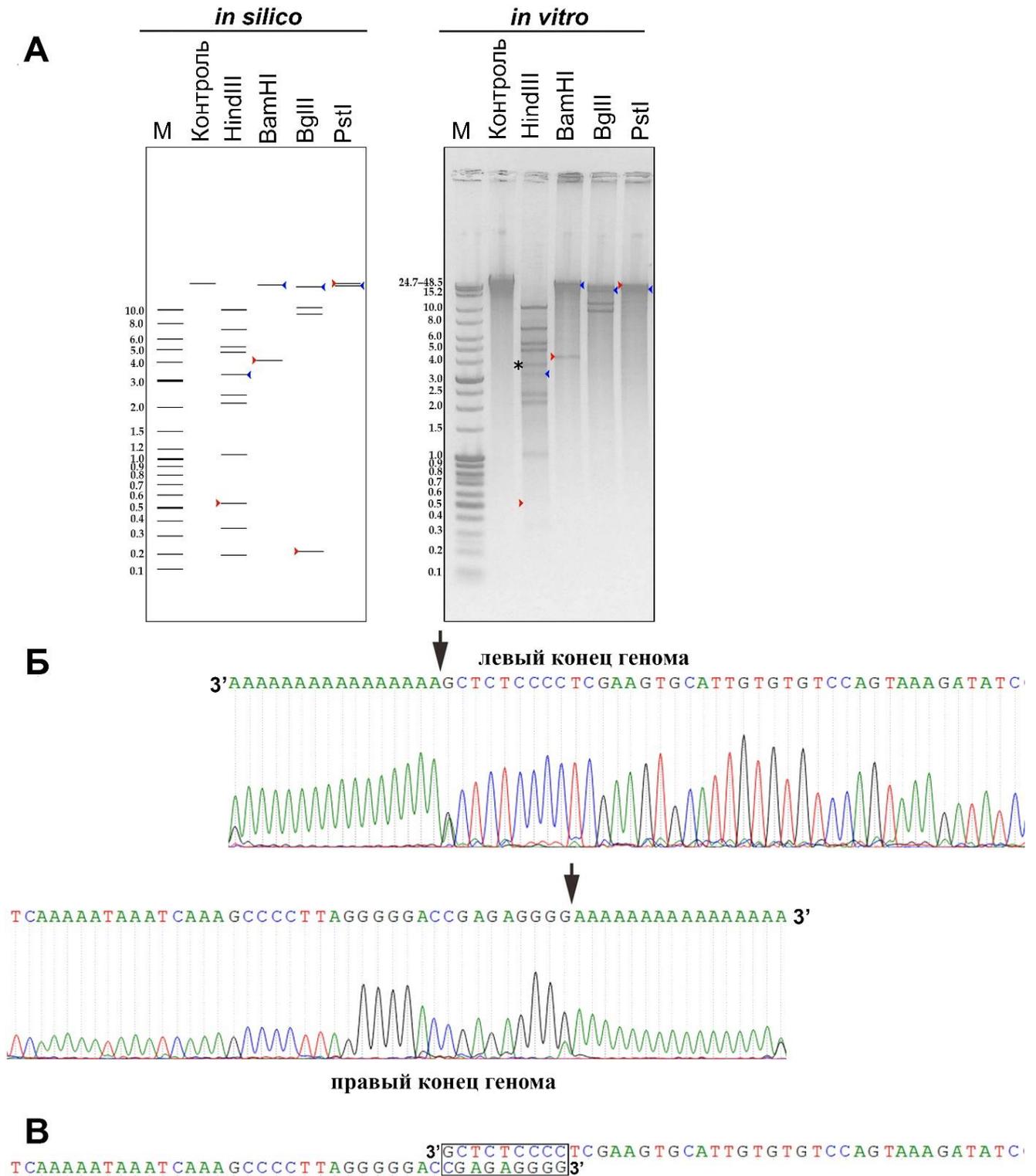
## **3.3.3. Определение стратегии упаковки ДНК**

По результатам анализа с помощью PhageTerm [271] было установлено, что терминальный комплекс фага В13 может узнавать определенный сайт на геномной ДНК и генерировать фиксированные концы ДНК с 3'-выступами со следующей последовательностью: 5'-GGACCGAGAGGGGA-3'. Таким образом, согласно PhageTerm, В13 использует механизм упаковки «3'-COS» аналогично известному фагу *Escherichia* НК97 [152, 191]. Далее в результате филогенетического анализа было обнаружено, что большая субъединица терминазы В13 группируется в одну общую кладу с белками фагов *Escherichia* НК97, *Escherichia* НК022 и *Rhizobium* 16-3 (Рис. 9), которые, как известно, используют механизм упаковки «3'-COS» [152].

Результаты биоинформатического анализа были подтверждены экспериментально с помощью рестрикционного анализа ДНК фага В13 с применением эндонуклеаз рестрикции HindIII, BamHI, BglII и PstI и последующим сравнением полученных рестрикционных паттернов

*in silico* и *in vitro* (Рис. 29, А). Как *in silico*, так и *in vitro* рестрикционные картины были практически идентичны. Исключение составляет результат гидролиза ДНК по сайту HindIII, где *in vitro* на дорожке была обнаружена дополнительная полоса длиной около 3,7 т.н.п. (обозначена звездой на Рис. 29, А). Данный фрагмент ДНК образован левым (3143 н.п.) и правым (552 н.п.) концевыми фрагментами (обозначены красной и синей стрелками, соответственно, на Рис. 29, А). Эти фрагменты «отжигаются» своими когезионными концами при постепенном снижении температуры после реакции рестрикции с HindIII. В случае BamHI, BglIII и PstI «новые» фрагменты ДНК, получившиеся в результате объединения двух левого и правого концевых фрагментов, было слишком сложно обнаружить из-за ограничений разрешения метода электрофореза в агарозном геле. Наблюдаемый тип рестрикционного паттерна свидетельствует о том, что фаг В13 использует «COS» механизм упаковки ДНК [86, 291].

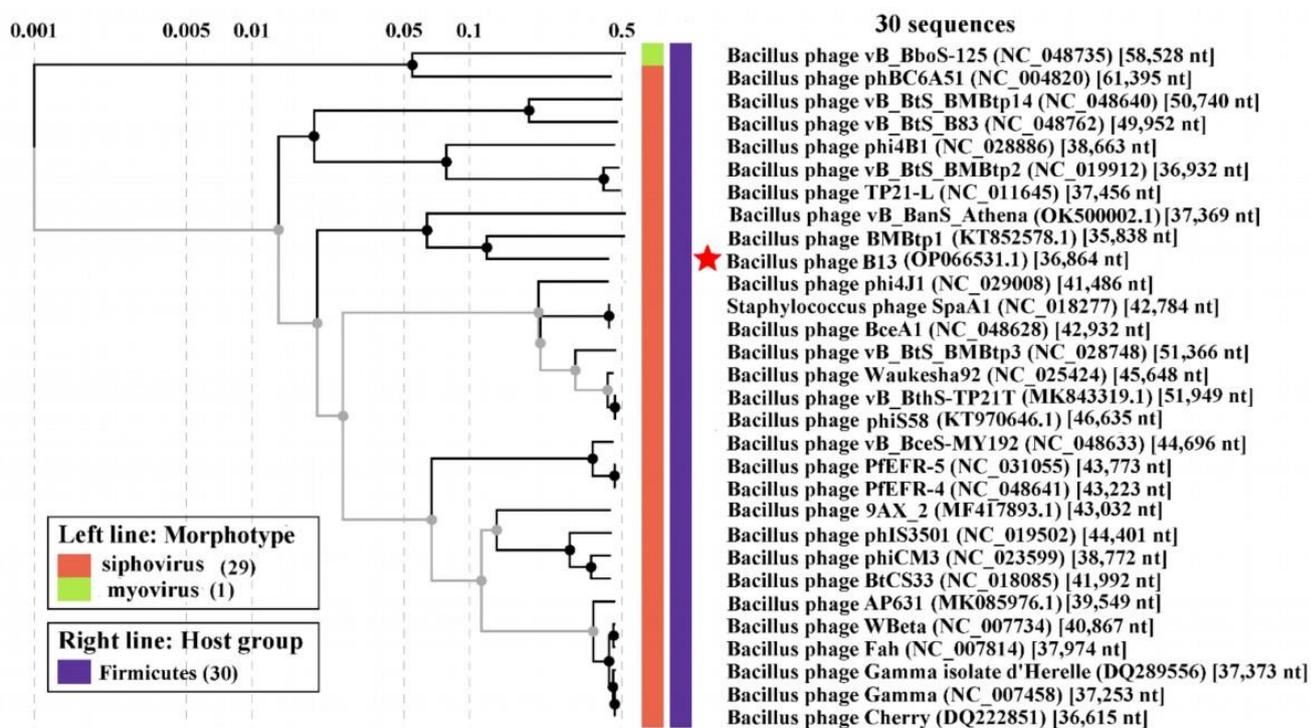
Последовательности концевых участков генома фага В13 были экспериментально идентифицированы с использованием модифицированной методики RAGE с последующим секвенированием по Сэнгеру (Рис. 29, Б). В результате было подтверждено наличие 3'-COS-выступов и идентифицирована последовательность *cos*-сайта: 5'-CGAGAGGGG-3', которая отличалась от биоинформатически предсказанной по длине (Рис. 29, В).



**Рисунок 29.** Определение механизма упаковки ДНК фага В13. **А.** Рестрикционный анализ ДНК В13 с ферментами HindIII, BamHI, BglIII и PstI; М – маркеры длин ДНК-фрагментов; красными и синими стрелками обозначены фрагменты ДНК, содержащие левый и правый концы генома; звездой обозначен «объединенный» фрагмент ДНК. Рисунок из работы [200]. **Б.** Концевые последовательности генома фага В13, определенные с помощью RAGE. Концевые области обозначены черными стрелками на хроматограммах секвенирования. **В.** 3'-COS-когезионными концы выделены черной рамкой. 3'-выступающая последовательность ДНК по результатам RAGE 5'-CGAGAGGGG-3'.

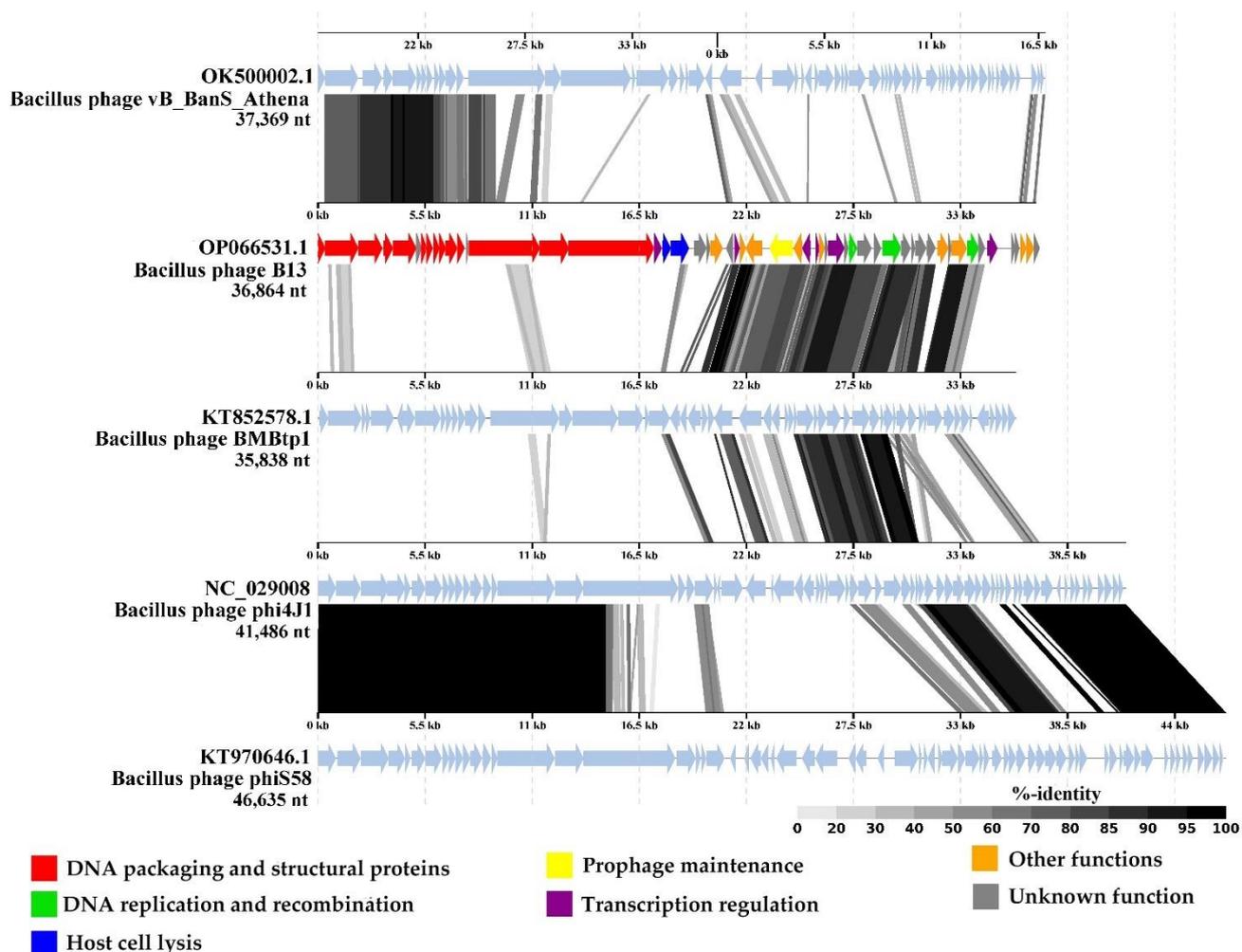
### 3.3.4. Сравнительный геномный анализ

Для определения филогенетического родства между фагом В13 и известными вирусами бактерий было построено протеомное дерево с использованием сервера ViPTree версии 3.5 [353]. Как видно на древе (Рис. 30), ближайшими родственными фагами для В13 являются фаги *Bacillus* ВМВтр1 и *Bacillus* vB\_BanS\_Athena. Однако ни один фаговый геном, доступный в базе данных GenBank, не демонстрирует существенного сходства с В13. Согласно результатам BLASTn анализа, значение нуклеотидной идентичности полных геномов фага В13 и ближайшего родственного *Bacillus*-инфицирующего фага phi4J1 составляет 31,28%. В свою очередь, геномы родственных фагов ВМВтр1 и vB\_BanS\_Athena идентичны геному фага В13 лишь на 27,73% и 21,54%, соответственно.



**Рисунок 30.** Вирусное протеомное дерево, включающее фаг В13 и его ближайших родственных бактериофагов. Дерево было построено по результатам анализа ViPTree 3.5 с использованием метрики расстояния между белками на основе нормализованных показателей tBLASTx, нанесенных на логарифмическую шкалу. Красная звезда указывает на фаг В13. Рисунок из работы [200].

Линейная полногеномная сравнительная диаграмма на основе попарного сходства tBLASTx Рис. 31 показывает, что области заметного сходства (величина идентичности 40% и более) между геномами B13 и BMBtp1 содержат гены, кодирующие белки, ответственные за сохранение формы профага, белки репликации и регуляторы транскрипции, а также гены с неизвестными функциями. В то время как сходство между геномами B13 и vB\_BanS\_Athena наблюдалось в области генов, кодирующих белки упаковки ДНК и структурные белки. В результате сравнительного анализа, проведенного с использованием программного пакета GET\_HOMOLOGUES, установлено, что фаг B13 имеет наибольшее количество общих белков (26 белков, т.е. около 46,85%) с фагом BMBtp1 (Приложение Д, Таблица Пб).

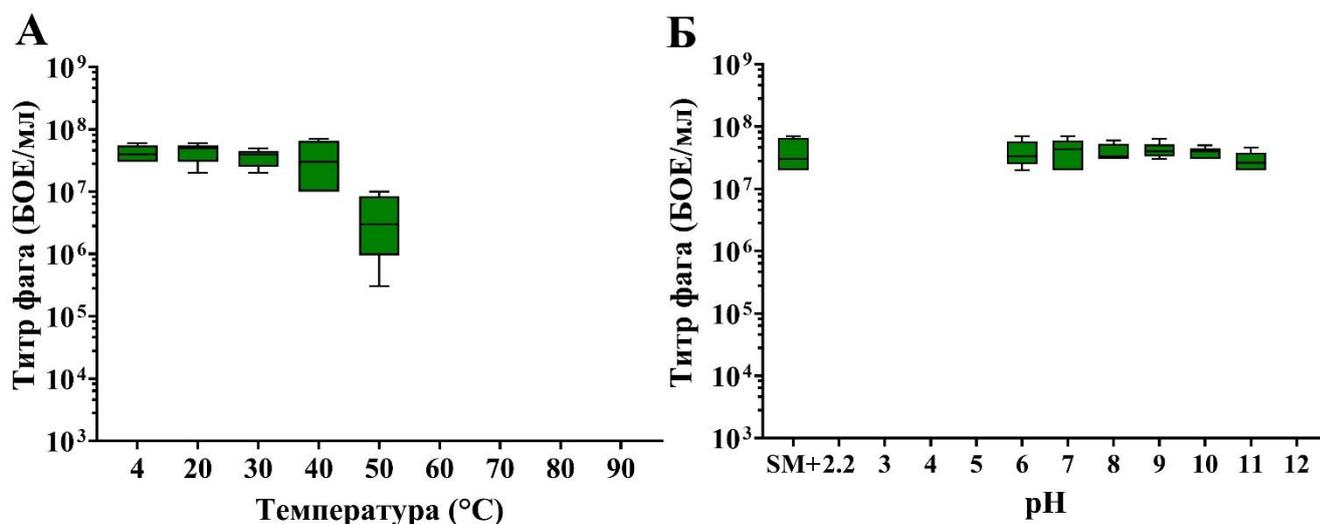


**Рисунок 31.** Попарное сравнение tBLASTx полногеномных последовательностей B13 и его ближайших родственных фагов, визуализированных с использованием сервера ViPTree версии 3.5. OPC окрашены исходя из функций белков, которые они кодируют (см. легенду). Серые области между картами геномов демонстрируют уровень идентичности (от 0 до 100%, см. легенду справа). Рисунок из работы [200].

### 3.3.5. Определение температурной и pH стабильностей

Анализ температурной стабильности фага В13 показал, что фаг стабилен после инкубации в течение 1 часа в диапазоне температур от 20 до 40°C. В то время как инкубация при 50°C приводила к снижению титра примерно на один порядок по сравнению с контрольным образцом, инкубированным при 4°C (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Рис. 32, А). При температуре 60°C и выше частицы фага не выживали (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Рис. 32, А).

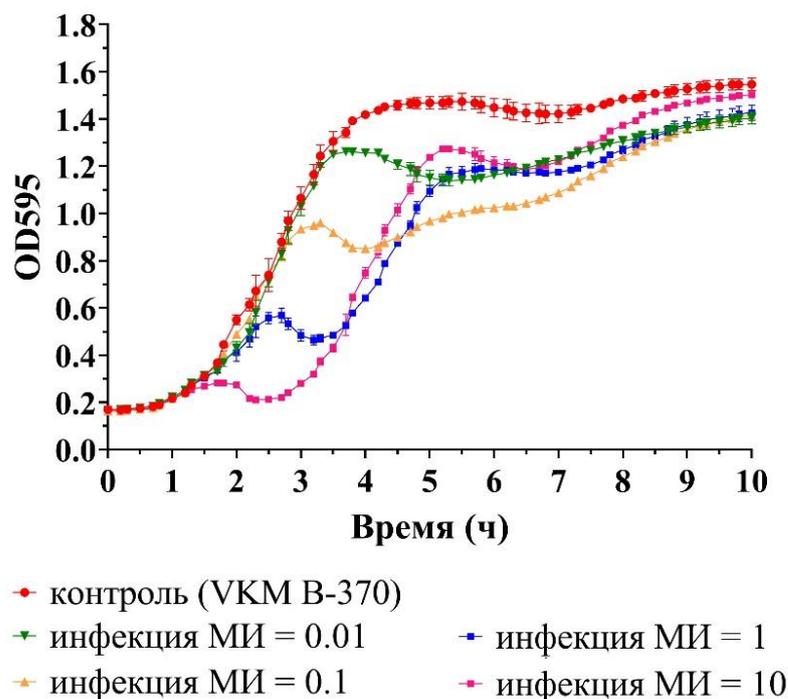
Бактериофаг В13 был стабилен в диапазоне pH от 6,0 до pH 11,0 (Рис. 32, Б). При инкубации в кислых условиях в диапазоне pH от 2,2 до 5,0 вирионы фага В13 не выживали (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Рис. 32, Б).



**Рисунок 32.** Температурная (А) и pH (Б) стабильности бактериофага В13. Графики построены в GraphPad Prism 8.4.3 [322] с доверительным интервалом 95% по результатам пяти независимых повторов. Рисунок из работы [200].

### 3.3.6. Анализ литической активности

Кривые роста *B. cereus* ВКМ В-370 при заражении фагом В13 при различных значениях МИ показаны на Рис. 33. Отчетливо видно, что чем выше значение МИ, тем быстрее достигается частичное ингибирование роста бактериальной культуры. Однако даже при самой высокой МИ, равной 10, фаг В13 не обеспечивает полного лизиса культуры: после временного ингибирования рост бактерий возобновляется и продолжается до выхода на плато (Рис. 33). В конечном итоге оптические плотности как контрольных, так и инфицированных культур *B. cereus* ВКМ В-370 выравниваются примерно через 9 ч культивирования (Рис. 33). Такая динамика лизиса с отсутствием устойчивого ингибирования бактериального роста весьма характерна для умеренных фагов, поскольку они зачастую стремятся переключиться на лизогенный цикл развития и перейти в состояние профага.



**Рисунок 33.** Кинетика роста *B. cereus* VKM B-370 при заражении бактериофагом В13 при различных значениях множественности инфекции (см. обозначения). В качестве контроля использовали неинфицированную культуру *B. cereus* VKM B-370. График построен в GraphPad Prism 8.4.3 [322]. Отдельные точки представляют собой среднее значение трех независимых повторов, а планки погрешностей – стандартное отклонение. Рисунок из работы [200].

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1. Структурная организация геномов бактериофагов. Метод RAGE

В базах данных геномных последовательностей, в первую очередь NCBI, помимо ошибок в аннотации геномов фагов встречаются проблемы со структурой загруженных нуклеотидных последовательностей геномов. Ошибки могут встречаться не только в сборке генома или некорректно установленной точке начала генома, но иногда встречаются последовательности, которые представляют собой хромосому, а не геном фага. Это может привести к путанице при определении длины генома фага, а также может влиять на результаты сравнительного геномного анализа с целью таксономической классификации штаммов или видов фагов. В ходе изучения литературы и анализа геномов фагов, загруженных в различные базы данных, а также в ходе исследований Sam46, Kirov, B13 и других фагов была выявлена необходимость четкого разграничения терминов «хромосома» и «геном» в контексте хвостатых ДНК-содержащих бактериофагов [19, 35, 38, 45, 200, 201, 328]. Это объясняется различиями в механизмах упаковки ДНК фагов и, следовательно, в структуре ДНК, которая находится внутри их капсидов [86, 307].

Хромосома ДНК-содержащего бактериофага – это ДНК, локализованная внутри капсида и которая может содержать повторяющиеся последовательности, такие как короткие или длинные прямые концевые повторы при механизме упаковки «DTR» или прямые пермутированные повторы при механизме упаковки «headful».

Геном ДНК-содержащего бактериофага – это последовательность ДНК, локализованная внутри клетки бактериального хозяина и которая не содержит повторяющихся последовательностей. Геном фага содержит всю необходимую генетическую информацию для жизнедеятельности фага, включая морфогенез, репликацию, регуляцию, упаковку ДНК и др., а также иногда может содержать дополнительные гены, участвующие в адаптации и эволюции бактериального хозяина. После инъекции фаговой ДНК (хромосомы) из капсида в бактериальную клетку, как правило, происходит циркуляризация этой ДНК, что приводит к формированию кольцевого генома фага и, как следствие, отсутствию повторяющихся последовательностей. Далее активируются соответствующие фаговые программы в зависимости от жизненного цикла фага. Таким образом, геном фага, в отличие от хромосомы, не содержит избыточные ДНК-последовательности, такие как второй повтор при механизме упаковки «DTR» или пермутированный повтор, составляющий 2-10% от генома при механизме упаковки «headful». Корректное понимание и применение этих двух терминов поможет более точно описать структуру и функции генетической информации в бактериофагах.

Поскольку у ДНК-содержащих фагов в большинстве случаев можно точно определить начало и конец генома, то при загрузке последовательностей их геномов в базы данных

целесообразно использовать четкие правила для этого процесса. Это позволит обеспечить удобный и быстрый доступ к генетической информации для других пользователей и исследователей. В книге «Bacteriophages, Methods and Protocols Volume III» представлены правила для загрузки окончательных файлов в формате «Fasta», содержащих ДНК-последовательности фагов [98]. Однако если следовать указанным в книге правилам, то в случае фагов с «COS» и «headful» механизмов упаковки ДНК в базы данных будут загружены их геномы, а в случае фагов с «DTR» механизмом будут загружены хромосомы. Поэтому стоит обратить внимание на этот факт при загрузке геномов. Возможно, в будущем рекомендации и правила по загрузке геномов будут скорректированы, что поможет унифицировать этот процесс и позволит исследователям формировать и использовать более точные геномные базы данных фагов.

#### *Определение механизмов упаковки ДНК фагов и границ их геномов*

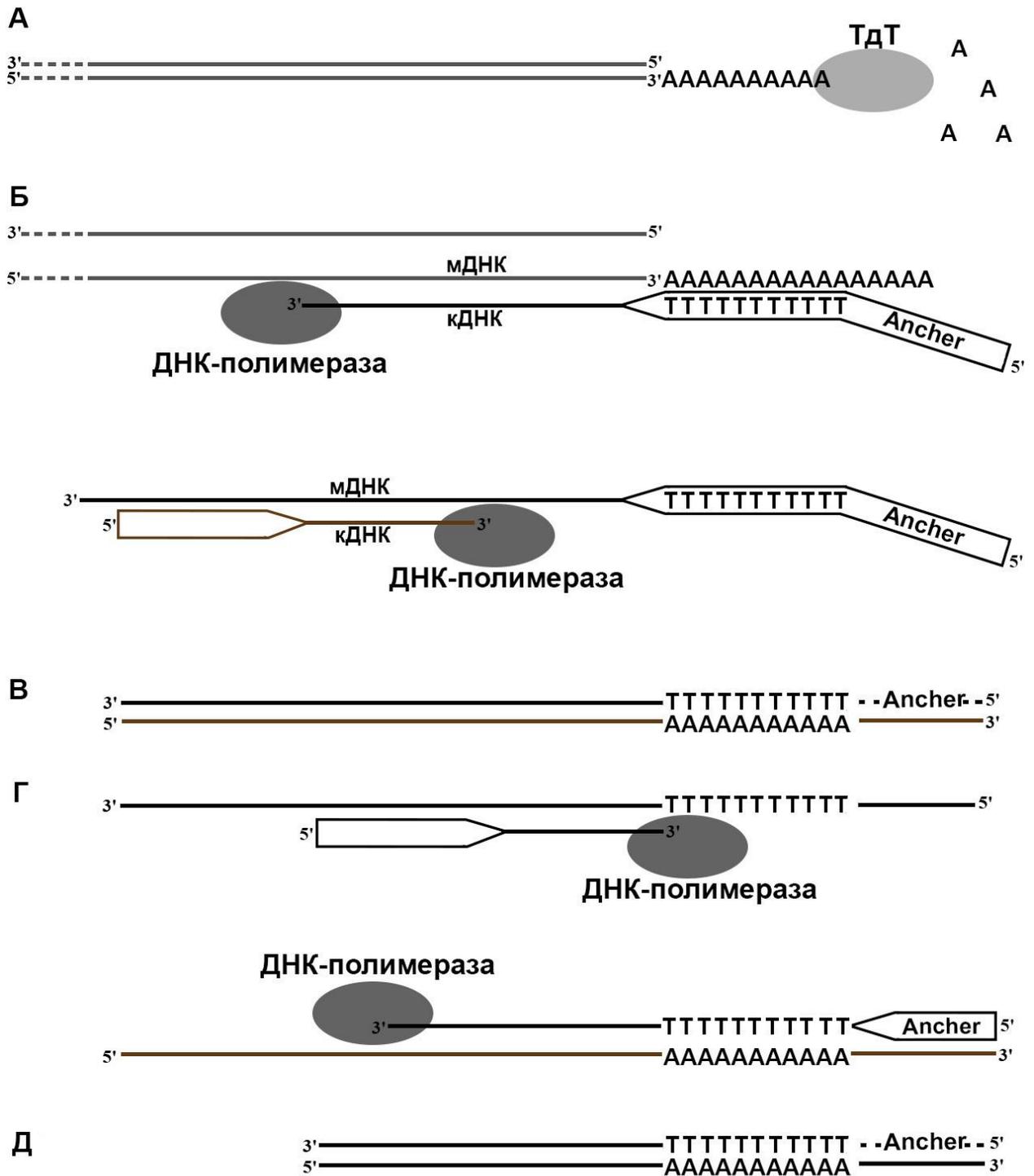
Для правильной загрузки генома требуется определить тип упаковки и концы генома. Для этой цели в первую очередь используют биоинформатический анализ. Например, программу PhageTerm – инструмент для определения границ генома и типа упаковки ДНК бактериофагов. Однако точность определения концов генома с помощью PhageTerm в значительной степени зависит от качества сборки фагового генома. Фрагментация генома, наличие ошибок в сборке, а также плохое качество и распределение нуклеотидных прочтений могут повлиять на результаты анализа и привести к неправильному определению концов. Кроме того, валидация программы была проведена в 2017 году на ограниченном наборе фагов с известными механизмами упаковки ДНК и установленными концами геномов. Вариабельность концов геномов может затруднить их корректное определение с помощью PhageTerm. Например, такая проблема может возникать при анализе данных фагов с «headful» механизмом упаковки. В таких случаях интерпретация результатов может потребовать дополнительных проверок. Растущее число исследований бактериофагов может привести к открытию фагов с новыми механизмами упаковки ДНК и/или с неизвестными типами концов геномов, что может потребовать обновления программы PhageTerm, а также использования дополнительных инструментов или подходов для анализа [9, 10]. В целом, программа PhageTerm представляет ценный инструмент для определения концов геномов бактериофагов, но важно учитывать указанные выше ограничения при интерпретации результатов.

Несмотря на быстроту биоинформатического анализа, во многих случаях требуется провести экспериментальное подтверждение границ геномов фагов. В качестве экспериментального метода используется стандартный метод секвенирования по Сэнгеру. Однако следует учитывать, что этот метод эффективен преимущественно для фагов, использующих механизм упаковки «DTR». Поскольку зачастую только для «DTR»-фагов можно

выделить достаточное количество ДНК-фрагментов (содержащих концы геном), для секвенирования из агарозного геля. В случае «headful»-фагов обязательно требуется выделять рестрикционные фрагменты с *pac*-последовательностями (упаковываются только в первый вирион), которые присутствуют на агарозном геле в субэквилярных количествах [38]. Это создает серьезную проблему в получении достаточного количества ДНК для последующего секвенирования. Аналогичная ситуация с недостаточным количеством ДНК может наблюдаться и в случае фагов с механизмом упаковки «COS».

В данной работе было предложено использовать метод RAGE, модифицированный в соответствии с конкретными механизмами упаковки ДНК [9, 10, 19, 200, 201]. Этот метод позволяет использовать небольшое количество ДНК, такое как рестрикционные фрагменты ДНК (что, как правило, является предпочтительным вариантом), или тотальную ДНК. Схематическое изображение основных этапов метода RAGE изображено на Рис. 34. Первоначальная реакция проводится с участием терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (ТдТ), которая добавляет дезоксирибонуклеотиды (в данной работе – dATP) на 3'-концах ДНК. Далее происходит увеличение необходимого ампликона в двух последующих ПЦР («гнездовая») с использованием системы специфичных праймеров (см. пункт 2.2.7.) В конечном итоге требуется выделить и очистить ПЦР-фрагмент в достаточном количестве для последующего секвенирования методом Сэнгера. Недостаток метода RAGE заключается в его высокой чувствительности к избытку ДНК-матрицы в ПЦР, особенно во второй реакции. Это может привести к низкому выходу ампликонов, возникновению неспецифических продуктов или ингибированию реакции. Стоит также отметить, что при использовании как метода RAGE, так и прямого секвенирования методом Сэнгера, необходимо учесть оптимальное расположение специфичных праймеров относительно предполагаемых концов генома, а также учесть максимальную длину прочтения методом Сэнгера, которая обычно составляет не более 900 нуклеотидных пар.

Таким образом, метод RAGE может быть эффективным решением для преодоления проблем с недостаточным количеством ДНК-материала и позволит повысить вероятность точного определения концов генома, что особенно критично для фагов с «COS» и «headful» механизмами упаковки ДНК.



**Рисунок 34.** Схема трех основных реакций метода RAGE (прохождение реакций показано только для одного конца генома). **А** – Терминальная дезоксиинуклеотидилтрансфераза добавляет dATP на 3'-конец ДНК. **Б** – 1-ая ПЦР с 1-ым специфичным праймером и AnchordT-праймером. **В** – ампликон, образовавшийся в результате 1-ой ПЦР. **Г** – 2-ая ПЦР со 2-ым специфичным праймером и Anchor-праймером. **Д** – ампликон, образовавшийся в результате 2-ой ПЦР. Обозначения: ТдТ – терминальная дезоксиинуклеотидилтрансфераза; А – дезоксирибоаденин трифосфат (dATP); Т – дезоксириботимин трифосфат (dTTP); N – любой дезоксирибонуклеотид монофосфат (аденин, тимин, цитозин, гуанин); мДНК – матричная ДНК; кДНК – комплементарная ДНК.

#### 4.2. Характеристика исследуемых бактериофагов: основные физиологические параметры, геномный и филогенетический анализы

В ходе работы были выделены и охарактеризованы новые вирулентные *Samaravirus samarensis* vB\_ВсМ\_Sam46-Т и vB\_ВсМ\_Sam46-С и умеренные *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* В13 бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении группы *B. cereus* s. l. Было проведено детальное исследование основных физиологических и генетических характеристик всех четырех изучаемых фагов, что позволило выявить различия между ними и выделить их особенности [19, 200, 201].

Морфология вирионов. С помощью электронной микроскопии 5500 различных фагов было установлено, что бактериофаги с морфотипом сифовирус наиболее многочисленны среди всех хвостатых фагов: около 61%, в то время как на долю фагов с морфотипом миовирус приходилось 25%, а с морфотипом подовирус только 14% [139]. В данной работе описаны 4 фага с различными морфотипами. С использованием ТЭМ было установлено, что фаги Sam46-Т и Sam46-С обладают морфотипом миовирус (Рис. 4, В и Г), в то время как фаг Kirov демонстрирует морфотип сифовирус (Рис. 19), что согласуется с соответствующими наборами хвостовых генов, присутствующих у этих фагов, и подтверждает их морфологическую классификацию (Рис. 6 и Рис. 20, соответственно) [225]. ТЭМ фага В13 не дала ожидаемых результатов из-за деградации вирионов. Тем не менее, набор и структурная организация генов хвоста фага В13 соответствуют характерным особенностям бактериофагов с морфотипом сифовирус, которые характеризуются наличием длинного и несокращающегося хвоста (Рис. 28).

Морфология фаговых бляшек. Для большинства ДНК-содержащих хвостатых фагов морфология бляшек зачастую коррелирует с типом жизненного цикла бактериофага и используется для детекции и селекции фагов в фаготерапии [155]. «Прозрачный» тип бляшек часто ассоциируется с вирулентными фагами, в то время как «мутный» тип считается характерным для умеренных фагов. Однако подобная корреляция не всегда подтверждается, поскольку морфотип бляшки может быть связан со многими факторами, включая временную адаптацию к хозяйским бактериям, наличия генетических элементов или мутаций, изменяющих взаимодействие фага с хозяином, а также влияние различных факторов, таких как температура, плотность хозяйских бактерий на газоне или состав среды. Возникновение мутантов с «прозрачным» морфотипом бляшек у умеренных фагов может происходить под влиянием различных факторов, например, в присутствии хелатирующих агентов (ЭДТА, цитрат натрия или пирофосфат натрия), а также в условиях повышения температуры, как было описано для фагов  $\phi$ H5 и  $\lambda$  [257, 275]. Зачастую умеренные фаги начинают формировать «прозрачные» бляшки на газонах чувствительных штаммов вследствие мутаций в генах, связанных с переключением стадий лизис-лизогения. Например, умеренный фаг  $\phi$ H5 после обработки пирофосфатом

образовывал мутантную форму phiPLA88 с «прозрачным» морфотипом бляшек [275]. Сравнительный анализ геномов phiH5 дикого типа и phiPLA88 выявил наличие одной точечной замены в гене *cI*, кодирующем репрессор, что проводило к потере стартового кодона. В результате этой мутации phiPLA88 становится облигатно-вирулентным фагом. Подобная ситуация наблюдалась также у умеренного phiA72 и его вирулентного штамма phiPLA35, у которого в результате точечной мутации отсутствуют 25 аминокислот на С-конце белка репрессора [275]. Также мутации в геномах умеренных фагов, приводящие к появлению прозрачных бляшек, могут возникать в генах, кодирующих такие белки, как интегразы, транскрипционные факторы, белки ParM и ParG и другие [125, 145, 184].

В данной работе исследуемые фаги формируют разные по морфологии бляшки: Sam46-T и B13 – «мутные» (Рис. 4, Г и Рис. 27, Б), а в случае Sam46-C и Kirov – прозрачные (Рис. 4, В и Рис. 18, Б). Более подробно в работе рассмотрена причина возникновения расщепления по типу бляшек у вида Sam46 на газонах чувствительного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 (Рис. 4). Было выдвинуто предположение, что Sam46-T – это умеренный фаг, который способен формировать форму профага в штамме *B. cereus* ВКМ В-370, а Sam46-C – это мутантная форма Sam46-T. Известно, что профаги способны обеспечивать бактериальным хозяевам защиту от заражения близкородственными фагами — явление, которое называется «исключение суперинфекции» [24, 177, 277]. В таком случае образование профага Sam46-T в штамме В-370 приводило бы к «мутным» бляшкам на бактериальном газоне, а характер кривых роста лизогенного штамма В-370 при повторной инфекции Sam46-T был аналогичен контролю (без фага). Однако проведенный в работе тест на возникновение лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 в ходе инфекции Sam46-T не подтвердил выдвинутое предположение об умеренной природе фага Sam46-T (Рис. 17). Следовательно, наблюдаемое разнообразие морфотипов бляшек и различия в темпах лизиса *B. cereus* ВКМ В-370 при фаговой инфекции Sam46-T и Sam46-C (Рис. 15) не обусловлены процессами образования бактериальных лизогенов и исключения суперинфекции.

Полногеномный сравнительный анализ фагов Sam46-C и Sam46-T показал, что различия в морфологии бляшек обусловлены точечными мутациями в гене *gp25*, который кодирует XkdW-подобный белок Gp25 с неизвестной функцией. Сравнительный аминокислотный анализ белков Gp25 фагов Sam46-C, Sam46-T и полученных мутантных фагов Sam46-C (из T → мутант C), а также структурный анализ белка Gp25 показал, что обнаруженные мутации расположены в последовательности «спиральной катушки» (coiled-coil) (Рис. 8). Этот мотив присутствует во многих белках, включая структурные белки фага, такие как фибритин (ген *gpwac*) бактериофага T4 [158, 317] и дистальная субъединица хвостовой фибриллы (ген *gp37*) бактериофага T4 [188]. Подобные области в фаговых белках могут играть ключевую роль в фолдинге белков и стимулировании конформационных изменений, а также участвовать в белок-белковых

взаимодействиях [158, 188, 317]. Исходя из результатов экспериментов и принимая во внимание соседство гена *gp25* с генами, связанными с морфогенезом фагового хвоста (*gpH*-подобный белок фибрилл и предполагаемый шаперон базальной пластины) (Рис. 6), можно предположить, что белок Gr25 принимает участие в сборке хвоста фага и/или влияет на скорость и эффективность его сборки. Известно, что многие свойства фаговых бляшек, включая их размер и продуктивность (общее количество фагового потомства внутри бляшек), зависят от таких факторов как адсорбция фага на клеточной поверхности, латентный период, количество потомства от одной клетки [146]. В связи с этим было выдвинуто предположение, что Gr25 может иметь отношение к процессу адсорбции фага и/или влиять на параметры сборки вириона, такие как эффективность сборки и количество активных частиц фагового потомства. Различия в таких параметрах как скорость адсорбции, скорость созревания фагового потомства (латентный период) и размер потомства у фагов Т- и С-типа могли бы объяснить морфологические отличия их бляшек и характер литической активности. Однако результаты адсорбционного анализа не показали существенных различий между Sam46-Т и Sam46-С как в количестве адсорбированных на бактериальных клетках частиц, так и в скорости адсорбции фаговых частиц (Рис. 16, А). Экспериментальные данные, полученные при анализе одноступенчатой кривой роста, также не выявили значительных различий в латентном периоде и времени литических циклов (Рис. 16, Б). При этом было отмечено, что размер потомства фагов Sam46-Т и Sam46-С незначительно отличается (Рис. 16, Б), однако маловероятно, что небольшая разница в этом параметре могла привести к столь большой разнице в поведении фагов. На данном этапе работы предполагается, что различия в морфологии бляшек и литической активности Sam46-Т и Sam46-С связано с характером взаимодействия фага Sam46-Т с бактериальными клетками в стационарной фазе роста, который обусловлен мутацией в гене белка Gr25. Однако это предположение в рамках данной исследовательской работы не было проверено, поскольку эксперименты были поставлены в условиях экспоненциальной фазы роста бактериальной культуры. На данный момент затруднительно точно установить взаимосвязь белка Gr25 с различиями в морфологии и характере литической активности между фагами Sam46-Т и Sam46-С. Для более глубокого понимания функциональной роли XkdW-подобного белка Gr25 в жизненных циклах фагов Sam46-Т и Sam46-С необходимы дополнительные исследования.

Тип жизненного цикла. До сих пор самым простым способом определения жизненного цикла фага является метод агаровых слоев, к которому иногда добавляется анализ литической активности фагов [155]. Однако более точно жизненную стратегию можно определить, опираясь на данные функциональной аннотации геномов фагов [180]. Несмотря на разницу в морфологии бляшек и литической активности, анализ полных геномов Sam46-Т и Sam46-С не выявил наличие генов, характерных для умеренных фагов (Рис. 6), что подтверждает вирулентную природу этих

фагов. На основании анализа морфологии бляшек фага Kirov (Рис. 18) и кривых роста штамма ATCC 4342 при инфекции Kirov (Рис. 25) изначально предполагалась вирулентная природа этого фага. Однако анализ полного генома Kirov позволяет предположить, что данный фаг имеет умеренный образ жизни (Рис. 20). Известно, что умеренные *Bacillus*-инфицирующие бактериофаги могут интегрировать свою геномную ДНК в хромосомы и плазмиды хозяина или реплицироваться без интеграции в виде кольцевых или линейных плазмид [154]. При этом в геноме умеренных фагов, которые могут находиться в клетке хозяина в форме кольцевого плазмидного профага, обычно присутствуют гены, кодирующие рекомбиназы Xer и компоненты ParMRC или аналогичные системы сегрегации [125, 279, 335] для обеспечения внехромосомной репликации на стадии профага. При анализе генома фага Kirov был выявлен ген сайт-специфичной интегразы (YP\_010679606), а также были обнаружены гены, связанные с репликацией и сегрегацией плазмиды и кодирующие следующие белки: белок суперсемейства Replic\_Relax (YP\_010679448), ParM-подобный белок (YP\_010679441) и предполагаемый ParG-подобный белок (YP\_010679442) (Рис. 20). Эти данные позволяют предположить, что фаг Kirov, помимо интеграции своего генома в геном бактерии, может существовать в форме кольцевой плазмиды в цитоплазме хозяина без обязательной интеграции своей ДНК в хромосому хозяина в лизогенном цикле развития. Таким образом, проявление физиологических свойств, таких как прозрачность бляшек и характер литической активности, характерных для вирулентных фагов, у фага Kirov может быть связано с взаимодействием «фаг-хозяин».

В случае фага В13 морфотип бляшек (Рис. 27) и кинетика роста чувствительного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 при фаговой инфекции (Рис. 33) были типичны для умеренных фагов. При анализе генома фага В13 был выявлен набор генов, который включает в себя ген, кодирующий сайт-специфическую тирозин-интегразу (UUW40213), вблизи которого находятся гены, связанные с регуляцией транскрипции (Рис. 28). Подобная структура генетического модуля поддержания профагов, обнаруженная в геноме В13, является характерной чертой умеренных фагов.

Организация генома. Согласно данным полногеномного анализа, геномы Sam46-T и Sam46-C обладают дцДНК длиной 45419 н.п. и одинаковым GC-составом, равным 41,6%. Как было ранее упомянуто, отличия между этими геномами находятся исключительно в гене *gp25*. Таким образом, исходя из установленных критериев видовой классификации ICTV, Sam46-T и Sam46-C являются двумя отдельными штаммами в рамках одного вида бактериофага *Samaravirus samarense* Sam46. В свою очередь, геном фага Kirov имеет почти в 3,7 раза большую длину по сравнению с геномом фага Sam46 и составляет 165383 н.п. с GC-составом 35,5%. Одним из ключевых аспектов генома фага Kirov является не только его значительная длина, но и наличие обширного набора генов, кодирующих белки, которые потенциально полезны для

бактериального хозяина. Геном фага В13 является самым маленьким среди всех геномов фагов, представленных в данной работе, и составляет 36864 н.п. с GC-составом 34,8%.

*Механизмы упаковки ДНК исследуемых фагов.* Механизмы упаковки фаговой ДНК тесно связаны с формированием концов геномов фагов. После установления границ генома можно точно определить механизм упаковки, и наоборот, иногда механизм упаковки может помочь в определении концов генома. На сегодняшний день отсутствуют исследования, которые дали бы количественную оценку представленности всех механизмов упаковки ДНК у бактериофагов, включая *Bacillus*-фаги. Как известно, модуль упаковки ДНК включает два гена: один кодирует малую субъединицу терминазы, белок, который связывается с сайтом инициации упаковки и регулирует АТФазную активность большой субъединицы терминазы; а другой кодирует большую субъединицу терминазы, основной упаковочный белок хвостатых бактериофагов, который отвечает за транслокацию геномной ДНК фага в прокапсиды с участием АТФ. Сравнение больших субъединиц терминазы используется в таксономической классификации фагов, а также может применяться для прогнозирования стратегий упаковки фаговой ДНК и типов концов генома. Таким образом, чтобы предсказать стратегию упаковки геномов, был проведен филогенетический анализ больших субъединиц терминаз фагов с установленным механизмом упаковки и белков исследуемых фагов [307]. Было показано, что фаги Sam46 и В13 используют «headful» и «3'-COS» механизм для упаковки ДНК, соответственно (Рис. 9). Однако филогенетический анализ больших субъединиц терминаз известных фагов и фага Kirov не привёл к однозначным результатам, поскольку белок Kirov формировал отдельную филогенетическую группу (Рис. 9). Дальнейшие исследования, включая рестрикционный анализ и использование модифицированного метода RAGE, позволили экспериментально установить механизмы упаковки ДНК и точно определить границы геномов фагов. Таким образом, модифицированный для фагов метод RAGE был успешно применен для определения границ геномов трех исследуемых фагов, обладающих разными механизмами упаковки ДНК: «headful», «DTR» и «3'-COS».

*Температурная и рН-стабильности* являются важными параметрами при характеристике фагов. Потеря активности фага во время хранения, транспортировки или инактивация фага из-за условий окружающей среды *in vivo* (например, рН) может не только усложнить процесс исследования этого фага, но и привести к плохим результатам в случае использования препаратов на основе нестабильных фагов. Исследование температурной и рН-устойчивости фагов Sam46-T, Sam46-C, Kirov и В13 показали, что их спектры устойчивости в различных условиях среды являются характерными для хвостатых фагов. Однако стоит отметить, что фаг Kirov оказался наиболее устойчивым к изменениям рН, покрывая диапазон от 5,0 до 11,0, что превосходит другие исследованные фаги в данной работе.

Значимые особенности исследуемых фагов

*Бактериофаг Sam46.* Примечательной особенностью фага Sam46 является уникальная двухдоменная структура его малой субъединицы терминазы, которая играет важную роль в упаковке ДНК. Эта субъединица содержит С-концевой домен «Terminase\_2» (107-230 а.о.) и N-концевой домен «FtsK\_gamma» (11-70 а.о.), который ранее не был описан в составе малой субъединицы терминазы. Иногда FtsK\_gamma домен встречается в составе отдельных белков. Например, из 441 генома *Bacillus*-инфицирующих фагов, загруженных в GenBank, 151 имеют гены, кодирующие белки в домен «FtsK\_gamma». Однако функциональное назначение подобных фаговых белков до сих пор неизвестно. Домен «FtsK\_gamma» встречается у бактерий и представляет собой С-концевой «winged-helix» мотив бактериальных моторных белков, таких как белок FtsK *E. coli* и белок SpoIIIЕ *B. subtilis*, которые координируют правильную сегрегацию бактериальных хромосом во время клеточного деления и споруляции, соответственно [60, 144, 242]. Бактериальный «FtsK\_gamma» домен действует как ДНК-узнающий домен, который распознает и связывает специфические последовательности ДНК длиной 8 н.п., известные как KOPS (FtsK Orienting Polarized Sequences) [99, 207, 242] или FRS (FtsK Recognition Sequence), а в случае SpoIIIЕ известные как SRS сайты (SpoIIIЕ Recognition Sequence) [201, 298]. По всей видимости, «FtsK\_gamma» домен малой субъединицы терминазы Sam46 был приобретен у бактериальных хозяев в ходе ко-эволюции. С одной стороны, наличие «FtsK-gamma» домена в структуре малой субъединицы терминазы Sam46 указывает на то, что геном фага может содержать KOPS/SRS-подобные сайты связывания, которые могут действовать как дополнительные сайты узнавания для терминазного комплекса. С другой стороны, согласно аминокислотному выравниванию и филогенетическому анализу «FtsK\_gamma» домен Sam46 имеет высокую гомологию с доменами «FtsK\_gamma» *B. cereus* и *B. subtilis* (Рис. 7). Этот факт предполагает, что малая субъединица терминазы может связываться с SRS-сайтами ДНК клетки-хозяина, что приводит к ошибочной упаковке бактериальной ДНК вместо фаговой ДНК в прокапсиду, т.е. осуществляется ГПГ за счёт генерализованной трансдукции [96]. Было показано, что большинство фагов, способных выполнять генерализованную трансдукцию, упаковывают свою ДНК с помощью механизма «headful» [343, 360], в частности, вирулентный бактериофаг *Bacillus* SPP1, который является ближайшим родственником фагом Sam46 согласно филогенетическому анализу (Рис. 11 и Рис. 12) и способен захватывать хромосомную или плазмидную ДНК бактерии-хозяина [243, 360]. Было показано, что системы репликации и рекомбинации SPP1 вносят вклад в горизонтальный перенос плазмид, хотя и в разной степени [243]. Согласно сравнительному анализу геномов, модуль генов, связанных с репликацией и рекомбинацией у Sam46, сходен с модулем у SPP1 (Рис. 13). Таким образом, предполагается, что Sam46 может быть трансдуцирующим фагом.

Мозаичный геном Sam46 имеет локальное сходство в разных модулях с геномами ближайших родственных фагов SPP1 и D6E (Рис. 13): где нуклеотидная идентичность составила лишь 3,9 и 0,6%, соответственно (Приложение В, Таблица П4). Это указывает на то, что родственные фаги Sam46 еще предстоит открыть. Исследование близкородственных фагов позволило бы реконструировать историю крупнейших событий рекомбинации, которые привели к наблюдаемой мозаичности генома Sam46.

#### *Литические белки бактериофагов Kirov и B13*

Литические белки фагов играют важную роль в их жизненном цикле, поскольку эти ферменты участвуют в разрушении клеточной стенки бактерий на этапе высвобождения потомства фага. Литические белки (эндолизины и вирион-ассоциированные пептидогликангидролазы) можно использовать в качестве потенциальных агентов для ингибирования или устранения бактериальных патогенов.

Как было упомянуто выше, геном фага Kirov характеризуется наличием обширного набора генов (Приложение Г, Таблица П5), из которого можно выделить эндолизин литического модуля бактериофага Kirov – N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазу (YP\_010679485) [2]. Ранее был охарактеризован ряд ферментов, проявляющих высокую степень гомологии с эндолизином фага Kirov. Амидаза (YP\_008873459, 89% идентичности) гигантского *Bacillus*-инфицирующего фага vB\_BanS-Tsamsa с морфотипом сифовирус обладает высокой эффективностью против нескольких штаммов *B. anthracis* [252]. Эндолизин Ply57 фага *Bacillus* Izhevsk (Izhevsk\_197, YP\_010680601, 88%) показал широкий спектр активности по отношению к *B. cereus* s. l. и более высокую термостабильность по сравнению с PlyG  $\gamma$ -фага [2, 35]. Эндолизин PlyPBC2 (YP\_010679375, 84%) ближайшего родственного фага PBC2 к Kirov показал литическую активность в отношении как вегетативных клеток, так и спор штаммов группы *B. cereus*. При этом было обнаружено, что точечная мутация в споросвязывающем домене существенно усилила литическую активность этого эндолизина за счет снижения его термостабильности [230].

Сравнительный анализ с помощью BLASTp N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы B13 выявил несколько близкородственных эндолизинов, в том числе эндолизинов фагов *Bacillus* Waukesha92 (YP\_009099314; 86,50% идентичности), vB\_BthS-HD29phi (QDP43493; 73,51%), phiCM3 (YP\_009009166; 68,48%), phi4J1 (YP\_009218153; 53,86%), а также фагов упомянутых выше: vB\_BanS-Tsamsa (YP\_008873459; 52,5%), Izhevsk (YP\_010680601; 52,5%) и PBC2 (YP\_010679375; 50,48%).

Также было обнаружено, что белок хвостовых фибрилл фага B13 (UW40202) содержит предполагаемый N-концевой эндопептидазный домен. Эндопептидазные домены часто содержатся в белках хвостовых фибрилл бактериофагов, заражающих грамположительные бактерии, где они служат для обеспечения проникновения ДНК фага в клетку. Белки, которые

имеют эндопептидазные домены, расщепляют амидные связи внутри сшитых пептидов, соединяющих две или более гликановых цепей, что приводит к образованию отверстий в пептидогликановом слое. Гидролазы хвостов фагов, наряду с эндолизинами фагов, могут быть использованы для борьбы с бактериальными патогенами. Согласно анализу BLASTp, белок хвостовой фибриллы B13 имеет мало сходства с белками фагов *Bacillus phi4B1* (YP\_009206320; 39,24%), *phi4J1* (YP\_009218150; 68,89%) и *vB\_BtS\_B83* (YP\_009845458; 55,09%) и поэтому может представлять интерес для дальнейших исследований.

Таким образом, экспериментальные исследования эндолизинов фагов Kirov, а также N-концевого эндопептидазного домена B13, в том числе сравнительный анализ их активностей с активностями эндолизинов других *Bacillus*-инфицирующих фагов, например Ply57, представляют значительный интерес и могут стать одним из ключевых направлений будущих исследований, направленных на поиск новых агентов для борьбы с бактериальными патогенами группы *B. cereus*.

*Исследуемые фаги и фаготерапия.* Первым и решающим этапом в разработке успешного препарата для фаготерапии является формирование качественной библиотеки бактериофагов. При разработке препарата бактериофага, помимо собранной информации о патогенных бактериях, вызывающих различные инфекции, также критическое значение имеет оценка характеристик самих бактериофагов [15]. Эти характеристики служат основой для формирования так называемой «информационной матрицы» фагобиблиотеки. Для того, чтобы бактериофаг попал в эту библиотеку, он должен соответствовать строго определенным критериям фага-кандидата, которые играют решающую роль на этапе первичной селекции [13].

Основными критериями фага-кандидата зачастую являются следующие [13, 180]:

1. Облигатная вирулентность (отсутствие интеграз): фаги, предлагаемые для использования в фаготерапии, должны обязательно обладать высокой вирулентностью в отношении целевых бактерий, чтобы эффективно ликвидировать инфекцию и избежать таких процессов как «исключение суперинфекции» и ГПП.
2. Спектр чувствительных штаммов: важно, чтобы бактериофаги охватывали широкий спектр бактериальных штаммов, включая разные виды и штаммы, вызывающие инфекции.
3. Эффективность литической активности: фаги должны обладать высокой эффективностью в разрушении бактериальных клеток для успешного уничтожения инфекции.
4. рН- и термостабильность: фаги должны сохранять свою активность в различных условиях среды, включая широкий диапазон рН и температур.

Исходя из указанных критериев, можно сделать вывод, что, несмотря на физиологические характеристики фагов Sam46-C и Kirov, такие как высокая литическая активность, pH- и температурная стабильность, а также спектр чувствительных штаммов группы *B. cereus*, эти фаги не пригодны для включения в состав фаготерапевтических препаратов. В случае фага Sam46 существует потенциальная угроза усиления патогенности и вирулентности у чувствительных к фагу бактериальных штаммов патогенов. Это обусловлено присутствием в геноме Sam46 гена (*gp2*), который кодирует малую субъединицу терминазы с «Ftsk\_gamma» доменом, что может способствовать ГПГ и вызвать проблемы в будущем. Что касается фага Kirov, его геном содержит группу генов, ответственных за формирование формы профага внутри клетки бактериального хозяина: белок суперсемейства Replic\_Relax, ParM-подобный белок и предполагаемый ParG-подобный белок. Подобный набор генов связан с формированием лизогена и может привести к устойчивости бактериальных штаммов как к заражению фагом Kirov, так и близкородственными фагами. Таким образом, при выборе бактериофагов для фаготерапии необходимо учитывать не только их физиологические характеристики, но и потенциальные риски, связанные с наличием определенных генов-маркеров. Например, помимо генов интеграз, на которые обращают внимание при первичном отборе фагов для фагопрепаратов [180], в качестве дополнительных генов-маркеров могут выбраны гены, кодирующие белки, в составе которых присутствует «Ftsk\_gamma» домен, а также гены, кодирующие системы сегрегации плазмид – ParMRC или аналогичные системы сегрегации. Наличие этих генов может сигнализировать о потенциальных рисках и ограничениях в использовании фагов для фаготерапии и их наличие должно быть учтено при формировании библиотеки бактериофагов.

Благодаря синтетической биологии и использованию современных методов молекулярной биологии, таких как системы CRISPR-Cas и BRED, можно осуществить целевой мутагенез в геномах бактериофагов, что может потенциально позволить использовать фаги Sam46, Kirov и B13 в фаготерапии и других областях [77, 233, 234, 315].

Таксономия исследуемых фагов. Согласно критериям демаркации вида и рода [347], исследуемые фаги должны быть классифицированы как новые виды: *Samaravirus samarense*, имеющий два штамма vB\_BcM\_Sam46-T и vB\_BcM\_Sam46-C; *Kirovirus kirovense*, штамм Kirov и *Bunatrivirus bunatris*, штамм B13. *Samaravirus samarense* Sam46, *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13 являются представителями и основателями 3-х новых родов *Samaravirus*, *Kirovirus* и *Bunatrivirus*, соответственно, которые принадлежат к подсемейству *Andregratiavirinae* в классе *Caudoviricetes*.

### 4.3. Вклад исследуемых бактериофагов в адаптацию и эволюцию бактерий группы *Bacillus cereus sensu lato*

*Бактериофаг Sam46.* Анализ генома фага Sam46 выявил наличие нескольких интересных генов, способных оказать влияние на жизнь бактериального хозяина. Один из таких генов кодирует уникальный и нетипичный по своей структуре белок малой субъединицы терминазы (QIQ61202), содержащий «Ftsk\_gamma» домен. В результате проведенных исследований предполагается, что данный белок, распознавая KOPS/SRS-сайты на бактериальной ДНК, может упаковывать хозяйскую ДНК в капсид фага вместо своей, что, в свою очередь, может приводить к ГПГ между бактериями. Кроме того, присутствует ген, кодирующий хоминг эндонуклеазу (HNH), что может объяснить мозаичную структуру генома фага Sam46, а именно модульную гомологию с геномами фагов SPP1 и D6E [215]. Изменения в структуре генома фага, вызванные перестройками с помощью хоминг эндонуклеаз, могут оказать влияние на взаимодействие между фагом и его бактериальным хозяином. Эти изменения могут влиять на способность фага заражать бактерию, его репликацию и другие аспекты взаимодействия, включая перенос новых генов. Это может быть важным фактором в адаптации фага к хозяйской бактерии и его влиянии на эволюцию бактерий.

#### *Бактериофаг Kirov.*

Фаг Kirov обладает крупным геномом, включающим несколько генов, которые могут оказывать влияние на его бактериального хозяина. Например, были обнаружены гены, кодирующие липопротеины с сигнальными последовательностями. Хотя липопротеины фагов были описаны давно [286], однако они до сих пор считаются редкими, вероятно, потому что инструменты прогнозирования сигнальных последовательностей обычно не включаются в процесс аннотаций геномов бактериофагов. Присутствие генов, кодирующих липопротеины с сигнальными пептидами в основном характерно для умеренных фагов. Было показано, что они могут способствовать исключению суперинфекции, лизису, вирулентности хозяина [341] и переключению стадий лизис-лизогения [101]. Присутствие гена хоминг нуклеазы (GIY-YIG) в геноме фага Kirov может способствовать перестройкам генома фага и его распространению между родственными геномами [95]. И, как следствие, эти изменения могут повлиять на взаимодействие между фагом и его бактериальным хозяином.

Помимо этого, были идентифицированы гены, связанные с метаболизмом никотинамидадениндинуклеотида (НАД). PnuC-подобный переносчик никотинамидмононуклеотидов может изменить их доступность внутри клетки бактерии. Никотинамид-нуклеотид-аденилилтрансфераза NadR-типа может регулировать активность ферментов, зависящих от НАД, и тем самым влиять на метаболические пути в клетке [288]. Метаболизм окисленной (НАД<sup>+</sup>) и восстановленной формой НАД тесно связан с производством

и использованием энергии, а изменения в этом метаболизме могут повлиять на энергетический баланс бактериальной клетки. НАД также участвует в ответах на клеточный стресс. Ферменты, связанные с НАД, могут регулировать эти процессы. Таким образом, фаг Kirov, перенося гены, связанные с метаболизмом НАД, в клетку бактериального хозяина, может вызвать изменения в метаболизме и физиологии клетки, что в конечном итоге может влиять на способность бактериального хозяина к росту, его взаимодействию с другими микроорганизмами и его адаптацию к изменяющимся условиям окружающей среды.

В геноме Kirov был обнаружен ген, кодирующий белок споруляции Cse60. Хотя этот белок известен уже более 20 лет [111], только недавно было показано, что для эффективного прорастания спор *B. subtilis* при умеренном высоком давлении Cse60 играет незначительную роль [239]. На сегодняшний день функция Cse60 остается до конца неизученной и необходимы дальнейшие исследования, чтобы проверить, играет ли этот белок важную роль в прорастании споры бактерий группы *B. cereus*. Таким образом, геном фага Kirov включает не только минимальный набор генов, необходимый для функций самого фага, но и гены, полезные для метаболизма хозяина.

*Бактериофаг B13.* В геноме бактериофага не было обнаружено генов, которые непосредственно участвуют в жизнедеятельности бактериального хозяина или в его общих метаболических процессах. Однако в геноме B13 присутствует ген, кодирующий хоминг эндонуклеазу (UUW40238), которая может приводить к перестройкам генома фага.

Исследование фагов Sam46-T, Sam46-C, Kirov и B13 привело к получению уникальных данных, которые не только обогатили наше понимание о *Bacillus*-инфицирующих фагах, выделенных на территории Российской Федерации, но также расширили таксономию вирусов бактерий на три новых рода: *Samaravirus*, *Kirovirus* и *Bunatrivirus*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были выделены и охарактеризованы три новых вида бактериофагов, способных инфицировать представителей группы *B. cereus* s. l.: *Samaravirus samarensis* vB\_VcM\_Sam46, *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13.

Были подробно изучены основные физиологические характеристики данных фагов, включая морфологию негативных колоний, структуру вирионов, pH- и температурную стабильности, спектр литической активности, скорость и характер литической активности в отношении чувствительных штаммов *B. cereus* ВКМ В-370 и *B. tropicus* ATCC 4342. Эти данные важны для дальнейшего применения бактериофагов в научных и прикладных исследованиях.

В ходе исследования были выявлены и впервые описаны несколько интересных особенностей фага Sam46. Этот фаг, принадлежащий к морфотипу миовирус, обладает способностью образовывать два типа бляшек на чувствительном штамме *B. cereus* ВКМ В-370: прозрачные (С-тип) и мутные (Т-тип). Анализ геномов Sam46-Т и Sam46-С выявил наличие генетических различий только в гене *gp25*, который кодирует XkdW-подобный белок с неизвестной функцией. Эксперименты по анализу адсорбции и одноступенчатой кривой роста не выявили существенных различий между параметрами инфекции фагов Sam46-Т и Sam46-С. Кроме того, в геномах Sam46-Т и Sam46-С не обнаружено генов, характерных для умеренных фагов, и тест на возникновение лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 в ходе инфекции Sam46-Т дал отрицательный результат. Эти данные подтверждают вирулентную природу фагов Sam46-Т и Sam46-С. Таким образом, было установлено, что разнообразие морфотипов и различия в темпах лизиса *B. cereus* ВКМ В-370 штаммов Sam46 не связаны с образованием лизогенов или явлением исключения суперинфекции. Роль XkdW-подобного белка остается предметом дальнейших исследований, направленных на выяснение его функциональной значимости в жизненных циклах фагов Sam46-Т и Sam46-С. Впервые высказано предположение о возможной связи функции XkdW-подобного белка с взаимодействием фага с его бактериальным хозяином.

Впервые была описана малая субъединица терминазы с необычной двухдоменной структурной организацией. Структура малой субъединицы терминазы фага Sam46 включает в себя С-концевой «Terminase\_2» домен, который является типичным для малых субъединиц терминазы фага, а также дополнительный N-концевой «FtsK\_gamma» домен. Интересно, что «FtsK\_gamma» домен иногда кодируется отдельной ОРС в некоторых фагах, но никогда ранее не был описан как часть малой субъединицы терминазы. Это открытие впервые поднимает вопрос о возможной роли фаговых белков, содержащих «FtsK\_gamma» домен, в горизонтальном переносе генов между бактериальными клетками через процесс генерализованной трансдукции, осуществляемый бактериофагами.

С учетом того, что известно сравнительно немного фагов, способных существовать внутри клетки хозяина в качестве плазмидного профага, включая *Bacillus*-фаги, следует выделить интересное открытие, сделанное в ходе исследования умеренного фага Kirov, который относится к морфотипу сифовирус и характеризуется крайне длинным и гибким хвостом. Анализ весьма крупного генома (165383 н.п.) этого фага позволил выявить наличие генов, кодирующих белки, поддерживающие стабильное состояние профага. Среди этих белков стоит выделить три рекомбиназы семейства Xer, белок из суперсемейства Replic\_Relax, также ParM- и ParG-подобные белки. Исходя из наличия генов, связанных с репликацией и сегрегацией плазмид, в геноме фага Kirov, можно предположить, что этот фаг способен существовать в форме кольцевого плазмидного профага в цитоплазме бактериального хозяина. Учитывая редкость таких наблюдений, выделение большего числа фагов, способных существовать в форме плазмидного профага и их дальнейшие исследования являются научно значимыми.

Кроме того, на фоне существующего дисбаланса в исследованиях фагов, который проявляется в переизбытке исследований вирулентных фагов, умеренные фаги остаются малоизученными. Исследования фага Kirov, предположительно плазмидного фага, и B13, который был индуцирован из хромосомы хозяйского штамма *B. cereus* ВКМ В-13, являются значимыми для пополнения наших знаний об умеренных бактериофагах.

В результате исследования геномов Sam46 и Kirov были идентифицированы гены, которые могут влиять на процессы адаптации и эволюции у бактерий рода *B. cereus* s. l., включая вышеупомянутый ген *gp25*, который кодирует XkdW-подобный белок. Маркерные гены, рассматриваемые в данном контексте, могут служить одним из ключевых критериев при выборе фагов для создания фаготерапевтических препаратов. Кроме того, их изучение может иметь особое значение для понимания ко-эволюционных взаимосвязей между фагами и их бактериальными хозяевами.

Впервые был использован метод RAGE (метод быстрой амплификации геномных концов) для определения границ фагового генома. Особенность этого исследования заключалась в модификации метода RAGE, учитывающей тип концов генома фагов, который зависит от механизма упаковки ДНК. Применение данного метода позволяет точно определить позицию концов генома фагов и выявить тип упаковки ДНК, особенно в случаях, когда биоинформатические инструменты не работают. Этот метод предоставляет ценную альтернативу существующим экспериментальным методам, поскольку для определения границ генома можно использовать небольшое количество исходного ДНК материала. Таким образом, использование этого метода расширяет возможности и повышает точность определения концов генома, что способствует более глубокому пониманию геномной организации фагов.

Полногеномные последовательности ДНК представителей трех новых видов фагов были подробно аннотированы и загружены в базу данных NCBI GenBank: *Samaravirus samarense* vB\_VcM\_Sam46-T (MN604698), *Kirovirus kirovense* Kirov (MW084976; NC\_071041), *Bunatrivirus bunatris* B13 (OP066531).

По результатам сравнительной геномики и филогенетического анализа было установлено, что три описанных новых вида фагов – вирулентные фаги *Samaravirus samarense* vB\_VcM\_Sam46-T и *Samaravirus samarense* vB\_VcM\_Sam46-C (два штамма одного вида), а также умеренные фаги *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13, являются представителями и основателями трех новых родов, названных *Samaravirus*, *Kirovirus* и *Bunatrivirus*, соответственно. Это расширяет существующую таксономию вирусов бактерий и обогащает наше понимание биологического разнообразия и эволюции этих микроорганизмов. Полученные результаты играют важную роль в фундаментальной науке, способствуя более глубокому изучению фагов и их взаимодействия с бактериями, что, в свою очередь, может иметь практическое применение в медицине, биотехнологии и других областях.

## ВЫВОДЫ

1. Выделены новые вирулентные *vB\_VcM\_Sam46-T* и *vB\_VcM\_Sam46-C* и умеренные *Kirov* и *B13* бактериофаги, инфицирующие *Bacillus cereus sensu lato*.
2. Определены ключевые физиологические характеристики выделенных бактериофагов: морфология бляшек и вирионов, спектр литического действия в рамках бактериальной группы *B. cereus s. l.*, литическая активность на чувствительных штаммах *B. cereus s. l.*, температурная и pH стабильности.
3. Для исследуемых фагов установлены полные последовательности геномов и изучена их структурная и функциональная организация. Впервые для определения границ геномов фагов предложен экспериментальный метод RAGE (метод быстрой амплификации концов генома), модифицированный для 3-х наиболее распространенных механизмов упаковки ДНК: «headful», «short DTR» и «3'-COS».
4. Результаты сравнительной геномики и филогеномного анализа исследуемых бактериофагов показали, что они являются представителями трех новых видов и основателями трех новых родов: *Samaravirus samarensis vB\_VcM\_Sam46-T* и *Samaravirus samarensis vB\_VcM\_Sam46-C*, *Kirovirus kirovense Kirov* и *Bunatrivirus bunatris B13*.
5. В геномах бактериофагов *vB\_VcM\_Sam46-T* и *Kirov* выявлены генетические маркеры, которые могут влиять на процессы адаптации и эволюции у бактерий рода *Bacillus cereus sensu lato*. Впервые описан фаговый ген, кодирующий малую субъединицу терминазы с необычной двухдоменной структурой, содержащей «Terminase\_2» домен и дополнительный «FtsK-gamma» домен. Предполагается, что подобная атипичная структура этого белка позволяет фагу участвовать в горизонтальном переносе генов бактериального хозяина за счёт генерализованной трансдукции.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- а.о. – аминокислотный остаток
- аПЦР – асимметричная полимеразная цепная реакция
- БОЕ – бляшкообразующая единица
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- дцДНК – двухцепочечная ДНК
- КОЕ – колониеобразующая единица
- МИ – множественность инфекции
- НАД – никотинамидадениндинуклеотид
- н.п. – нуклеотидная пара
- ОРС – открытая рамка считывания
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- т.н.п. – тысяча нуклеотидных пар
- ТдТ – терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза
- ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
- «COS» механизм – от англ. «Cohesive Site»
- «DTR» механизм – от англ. «Direct Terminal Repeat»
- «long DTR» механизм – от англ. «long Direct Terminal Repeat»
- «short DTR» механизм – от англ. «short Direct Terminal Repeat»
- ANI – средняя геномная идентичность от англ. «Average Nucleotide Identity»
- BPD – от англ. «Bacillus Phage Database», База данных *Bacillus*-фагов
- CRISPRs – от англ. «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats», сгруппированные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы
- CRISPR-Cas – система адаптивного иммунного ответа бактерий, включает CRISPRs и Cas белки
- DNA – от англ. «deoxyribonucleic acid»
- DTRs – от англ. «Direct Terminal Repeats», прямые концевые или терминальные повторы
- dATP – от англ. «deoxyriboadenine triphosphate», дезоксирибоаденин трифосфат
- E – от англ. «Expect Value», «ожидаемое значение»
- EDTA – от англ. «ethylenedinitrilotetraacetic acid», этилендиаминтетрауксусная кислота
- ICTV – от англ. «International Committee on Taxonomy of Viruses», Международный комитет по таксономии вирусов
- LB – от англ. «Lysogeny broth», богатая среда для культивирования бактериальных культур

ML или MLE – от англ. «maximum likelihood estimation», метод максимального правдоподобия или метод наибольшего правдоподобия

NCBI – от англ. «National Center for Biotechnology Information», база данных Геномных ресурсов национального центра биотехнологической информации

NGS – от англ. «Next-Generation Sequencing», секвенирования следующего поколения

OD – от англ. «Optical Density», оптическая плотность

RAGE – от англ. «Rapid Amplification of Genomic Ends», метод быстрой амплификации концов генома

SDS – от англ. «sodium dodecyl sulfate», додецилсульфат натрия

SM буфер – буфер, состоящий в основном из хлорида натрия (sodium chloride), сульфата магния (magnesium sulphate) и желатина

TAE – от англ. «tris-acetate-EDTA», трис-ацетатный буфер

## СПИСОК ТЕРМИНОВ

Геном ДНК-бактериофага – ДНК, которая содержит генетическую информацию, необходимую для сборки новых вирусных частиц. Геном может содержать дополнительные гены, которые оказывают влияние на хозяйскую бактерию. В геном фага не включается избыточная информация (например, при механизме упаковки «DTR» второй повтор или при «headful» пермутированный повтор, составляющий 2-10% от генома).

Хромосома ДНК-бактериофага – ДНК внутри капсида бактериофага, которая может содержать повторяющиеся последовательности (при механизмах упаковки «DTR» и «headful»).

«COS» механизм – от англ. «Cohesive Site», механизм упаковки ДНК фага, при котором на концах генома присутствуют одноцепочечные выступающие когезивные COS-последовательности (3' или 5'), которые при отжиге образуют *cos*-сайт. Варианты написания «COS», встречаемые в тексте «3'-COS» механизм или «5'-COS».

«DTR» механизм – от англ. «Direct Terminal Repeat», механизм упаковки ДНК фага, при котором на концах хромосомы присутствуют короткие или длинные прямые терминальные повторы.

«long DTR» механизм – от англ. «Direct Terminal Repeat», механизм упаковки ДНК фага, при котором на концах хромосомы присутствуют длинные прямые терминальные повторы, которые могут достигать в длину до 15 т.н.п.

«short DTR» механизм – от англ. «Direct Terminal Repeat», механизм упаковки ДНК фага, при котором на концах хромосомы присутствуют короткие прямые терминальные повторы длиной около 100-300 н.п.

E – от англ. «Expect Value» или «ожидаемое значение» – значение, которое помогает оценить статистическую значимость выравнивания в BLAST-поиске

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бактериофаги фВ83, фKIR1 И фIZH57, инфицирующие бактерии группы *Bacillus cereus* / О. А. Казанцева, Э. Г. Пилигримова, В. А. Загородный [и др.] // Биология – наука XXI века: 22-ая Международная пушинская школа-конференция молодых ученых (г. Пушино, 23 – 27 апреля 2018 г.): сборник тезисов. – Пушино, РФ, 2018. – С. 293.
2. Бактериофаги и их ферменты как антибактериальные агенты / А. М. Шадрин, О. Н. Копосова, А. В. Скорынина [и др.] // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса / ред. Е. А. Бонч-Осмоловская [и др.]. – Псков, РФ : ООО «Конкорд», 2021. – С. 122.
3. Выделение, секвенирование и характеристика двух штаммов Sam46 и Sam112 нового вида бактериофага, инфицирующего представителей группы *Bacillus cereus sensu lato* / О. А. Казанцева, Э. Г. Пилигримова, В. А. Загородный, А. М. Шадрин // 8-ая Всероссийская научно-практическая конференция «Геномное секвенирование и редактирование» (NGS 2020) (г. Москва, 20–21 мая 2020 г.): сборник тезисов. – Москва, РФ : 978-5-88458-503-4, 2019. – С. 6.
4. Использование бактериофага Kirov в качестве агента биоконтроля *B. cereus* в пищевых продуктах / А. В. Скорынина, Э. Г. Пилигримова, О. А. Казанцева, А. М. Шадрин // VIII Пушинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пушино, 6–8 декабря 2022 г.): сборник тезисов. / ред. Т. А. Решетилова. – Пушино, РФ : ГЕОС, 2022. – С. 268–270.
5. Казанцева, О. А. Isolation, sequencing and characterization of the *Bacillus*-infecting temperate bacteriophage B13 / О. А. Казанцева, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // 10-ая Всероссийская научно-практическая конференция «Геномное секвенирование и редактирование» (NGS 2022), под эгидой Центров геномных (г. Москва, 19 мая 2022 г.): сборник тезисов исследований мирового уровня. – Москва, РФ : РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2022. – С. 9.
6. Казанцева, О. А. Sam46 и Sam112, бактериофаги нового рода «*Samaravirus*» с необычной доменной структурой малой субъединицы терминазы / О. А. Казанцева, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // 3-ий Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса / ред. Е. А. Бонч-Осмоловская [и др.]. – Псков, РФ : ООО «Конкорд», 2021. – С. 191–192.
7. Казанцева, О. А. Бактериофаги vB\_VcM\_Sam46 и vB\_VcM\_Sam112, представители нового рода «*Samaravirus*» с необычной доменной структурой малой терминазы / О. А. Казанцева, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов / VII съезд биохимиков России (г. Сочи, Дагомыс, 3 – 8 октября 2021 г.): материалы. – Москва, РФ : Перо, 2021. – Т. 2. – С. 111–112.
8. Казанцева, О. А. Выделение и характеристика умеренного бактериофага B13 ,

инфицирующего бактерии группы *Bacillus cereus sensu lato* / О. А. Казанцева, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // VII Пушинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пушино, 6 – 9 декабря 2021 г.): сборник тезисов / ред. Т. А. Решетилова. – Пушино, РФ : ГЕОС, 2021. – С. 48–50.

9. Казанцева, О. А. Sam46, Kirov и B13 – представители и основатели трех новых родов бактериофагов, инфицирующих бактерии из группы *Bacillus cereus sensu lato* / О. А. Казанцева, А. М. Шадрин // Всероссийская конференция «От микробиологии к генетическим технологиям» (г. Новосибирск, 22–25 сентября 2023 г.): сборник тезисов. – Новосибирск, РФ, 2023. – С. 46-47.

10. Казанцева, О. А. Определение механизма упаковки ДНК и концов хромосомы бактериофагов с использованием методов NGS и RAGE / О. А. Казанцева, А. М. Шадрин // III Всероссийская конференция «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (г. Новосибирск, 19 – 24 июня 2022 г.): сборник тезисов. – Новосибирск, РФ : Академиздат, 2022. – С. 50.

11. Казанцева, О. А. Умеренные бактериофаги: недооценённый потенциал профагов в экологии и эволюции бактерий / О. А. Казанцева, А. М. Шадрин // XIII Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Минск, 6 – 9 июня 2023 г.): материалы конференции. – Минск, Беларусь : Беларуская навука, 2023. – С. 53-54.

12. Казанцева, О. А. Умеренные бактериофаги B13 и B473, инфицирующие представителей группы *Bacillus cereus sensu lato* / О. А. Казанцева, А. М. Шадрин // 4-й Российский микробиологический конгресс (г. Томск, 24 – 29 сентября 2023 г.): материалы конгресса. – Томск, РФ : microbiology-congress.ru, 2023. – С. 189 – 190.

13. Казанцева, О. А. Фаготерапия как альтернатива антибиотикам. создание перспективной библиотеки бактериофагов. критерии фага-кандидата / О. А. Казанцева, А. М. Шадрин // Конференция «Проблема антибиотикоустойчивости микроорганизмов и пути ее решения» (г. Санкт-Петербург, 16 – 17 июля 2022 г.): сборник тезисов. – Санкт-Петербург, РФ : СПбПУ, 2022.

14. Новые бактериофаги Sam46 и Sam112, инфицирующие *Bacillus cereus sensu lato* / Э. Г. Пилигримова, О. А. Казанцева, В. А. Загородный, А. М. Шадрин // VI Пушинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пушино, 2 – 6 декабря 2019 г.): сборник тезисов. – Пушино, РФ, 2019. – С. 8.

15. Перспективы использования генетического материала вирусов бактерий / А. М. Шадрин, Э. Г. Пилигримова, С. Д. Байчер [и др.] // 2-ой Российский микробиологический конгресс (г. Саранск, 23 – 27 сентября 2019 г.): сборник тезисов. – Саранск, РФ : microbiology-

congress.ru, 2019. – С. 80.

16. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – Мир. – 1991. – 544 с.
17. Физиологические особенности бактериофагов, заражающих *Bacillus cereus sensu lato* / О. А. Казанцева, Э. Г. Пилиgrimова, В. А. Загородный [и др.] // 4-ая конф.: «Бактериофаги. Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (24–26 сентября 2018 г.): сбор. тез. – Нижний Новгород, РФ, 2018. – С. 46.
18. A composite bacteriophage alters colonization by an intestinal commensal bacterium / B. A. Duerkop, C. V. Clements, D. Rollins [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2012. – Т. 109. – № 43. – С. 17621-17626.
19. A Genomic analysis of the *Bacillus* bacteriophage *Kirovirus kirovense* Kirov and its ability to preserve milk / O. A. Kazantseva, A. V. Skorynina, E. G. Piligrimova [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – № 16. – С. 12584.
20. A low-polynomial algorithm for assembling clusters of orthologous groups from intergenomic symmetric best matches / D. M. Kristensen, L. Kannan, M. K. Coleman [и др.] // Bioinformatics. – 2010. – Т. 26. – № 12. – С. 1481-1487.
21. A mutant bacteriophage evolved to infect resistant bacteria gained a broader host range / M. Habusha, E. Tzipilevich, O. Fiyaksel, S. Ben-Yehuda // Molecular Microbiology. – 2019. – Т. 111. – № 6. – С. 1463-1475.
22. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments / P. A. Loannou, C. T. Amemiya, J. Garnes [и др.] // Nature Genetics. – 1994. – Т. 6. – № 1. – С. 84-89.
23. A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly / I. Y. Chung, H. J. Jang, H. W. Bae, Y. H. Cho // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – Т. 111. – № 31. – С. 11503-11508.
24. Abedon, S. T. Bacteriophage secondary infection / S. T. Abedon // Virologica Sinica. – 2015. – Т. 30. – № 1. – С. 3-10.
25. Abraha, H. B. Bacteriophages for detection and control of foodborne bacterial pathogens – the case of *Bacillus cereus* and their phages / H. B. Abraha, K. P. Kim, D. B. Sbhatu // Journal of Food Safety. – 2021. – Т. 43. – № 2. – С. e12906.
26. Abshire, T. G. Production and validation of the use of gamma phage for identification of *Bacillus anthracis* / T. G. Abshire, J. E. Brown, J. W. Ezzell // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – Т. 43. – № 9. – С. 4780-4788.
27. Ackermann, H. W. 5500 Phages examined in the electron microscope / H. W. Ackermann // Archives of Virology. – 2007. – Т. 152. – № 2. – С. 227-243.

28. Ackermann, H. W. Bacteriophage observations and evolution / H. W. Ackermann // *Research in Microbiology*. – 2003. – Т. 154. – № 4. – С. 245-251.
29. Ackermann, H. W. Tailed bacteriophages: the order *Caudovirales* / H. W. Ackermann // *Advances in virus research*. – 1998. – Т. 51. – С. 135-201.
30. Allison, G. E. Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. Т. 8 / G. E. Allison, N. K. Verma. – 2000.
31. Alternate *atxA* and *acpA* dependent response of *Bacillus anthracis* to serum, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and CO<sub>2</sub> / I. Glinert, E. Bar-David, A. Ben-Shmuel [и др.] // *PLoS ONE*. – 2023. – Т. 18. – № 2. – С. e0281879.
32. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations / A. Chopin, A. Bolotin, A. Sorokin [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2001. – Т. 29. – № 3. – С. 644-651.
33. Andrews, S. FastQC – a quality control tool for high throughput sequence data. / S. Andrews. – Текст: электронный // *Babraham Bioinformatics*. – 2010. – URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (дата обращения: 20.06.2019).
34. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome / S. R. Modi, H. H. Lee, C. S. Spina, J. J. Collins // *Nature*. – 2013. – Т. 499. – № 7457. – С. 219-222.
35. *Bacillus*-infecting bacteriophage Izhevsk harbors thermostable endolysin with broad range specificity / A. V. Skorynina, E. G. Piligrimova, O. A. Kazantseva [и др.] // *PLoS ONE*. – 2020. – Т. 15. – № 11. – С. e0242657.
36. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning / M. H. Guinebretière, S. Auger, N. Galleron [и др.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2013. – Т. 63. – № 1. – С. 31-40.
37. *Bacillus mycoides* PM35 reinforces photosynthetic efficiency, antioxidant defense, expression of stress-responsive genes, and ameliorates the effects of salinity stress in maize / B. Ali, X. Wang, M. H. Saleem [и др.] // *Life*. – 2022. – Т. 12. – № 2. – С. 219.
38. *Bacillus* phage vB\_BtS\_b83 previously designated as a plasmid may represent a new *Siphoviridae* genus / E. G. Piligrimova, O. A. Kazantseva, N. A. Nikulin, A. M. Shadrin // *Viruses*. – 2019. – Т. 11. – № 7. – С. 624.
39. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition / A. K. Saxena, M. Kumar, H. Chakdar [и др.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2020. – Т. 128. – № 6. – С. 1583-1594.
40. *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 DNA packaging motor requires terminase and portal

proteins / A. G. Camacho, A. Gual, R. Lurz [и др.] // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Т. 278. – № 26. – С. 23251-23259.

41. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide / A. Bravo, S. Likitvivatanavong, S. S. Gill, M. Soberón // Insect Biochemistry and Molecular Biology. – 2011. – Т. 41. – № 7. – С. 423-431.

42. *Bacillus thuringiensis* Cry5B is active against *Strongyloides stercoralis in vitro* / S. Charuchaibovorn, V. Sanprasert, N. Sutthanont [и др.] // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2019. – Т. 101. – № 5. – С. 1177-1182.

43. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group / S. Lechner, R. Mayr, K. P. Francis [и др.] // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1998. – Т. 48. – № 4. – С. 1373-1382.

44. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments / R. A. Miller, S. M. Beno, D. J. Kent [и др.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – Т. 66. – № 11. – С. 4744-4753.

45. Bacteriolytic potential of *Enterococcus* phage iF6 isolated from “Sextaphag®” therapeutic phage cocktail and properties of its endolysins, Gp82 and Gp84 / R. M. Buzikov, O. A. Kazantseva, E. G. Pilgrimova [и др.] // Viruses. – 2023. – Т. 15. – № 3. – С. 767.

46. Bacteriophage-based biocontrol technology to enhance the efficiency of wastewater treatment and reduce targeted bacterial biofilms / K. B. Shivaram, P. Bhatt, B. Applegate, H. Simsek // Science of the Total Environment. – 2023. – Т. 862. – С. 160723.

47. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity / J. J. Barr, R. Auro, M. Furlan [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2013. – Т. 110. – № 26. – С. 10771-10776.

48. Bacteriophage Mu genome sequence: analysis and comparison with Mu-like prophages in *Haemophilus*, *Neisseria* and *Deinococcus* / G. J. Morgan, G. F. Hatfull, S. Casjens, R. W. Hendrix // Journal of Molecular Biology. – 2002. – Т. 317. – № 3. – С. 337-359.

49. Bacteriophage of the skin microbiome in patients with psoriasis and healthy family controls / H. Wang, H. H. Chan, M. Y. Ni [и др.] // Journal of Investigative Dermatology. – 2020. – Т. 140. – № 1. – С. 182-190.

50. Bacteriophage P1 *cre* gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation / N. Sternberg, B. Sauer, R. Hoess, K. Abremski // Journal of Molecular Biology. – 1986. – Т. 187. – № 2. – С. 197-212.

51. Bacteriophage P22 SieA mediated superinfection exclusion / J. C. Leavitt, B. M. Woodbury, E. B. Gilcrease [и др.] // mBio. – 2024. – Т. 15. – № 2. – С. e0216923.

52. Bacteriophage SPP1 DNA replication strategies promote viral and disable host replication *in vitro* / E. M. Seco, J. C. Zinder, C. M. Manhart [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Т. 41. – № 3. – С. 1711-1721.
53. Bacteriophages: biology, applications and role in health and disease. Chapter. The use of phage: therapy, biocontrol and commercial microbiology / R. S. Dias, M. R. Eller, R. L. Salgado [и др.] // *Bacteriophages: Biology, Applications and Role in Health and Disease* / ред. C. D. Denton, R. J. Crosby. – Nova Science Publishers, 2013. – С. 1-34.
54. Bacteriophages BCP1-1 and BCP8-2 require divalent cations for efficient control of *Bacillus cereus* in fermented foods / N. Bandara, J. Jo, S. Ryu, K. P. Kim // *Food Microbiology*. – 2012. – Т. 31. – № 1. – С. 9-16.
55. Bacteriophages in natural and artificial environments / S. Batinovic, F. Wassef, S. A. Knowler [и др.] // *Pathogens*. – 2019. – Т. 8. – № 3. – С. 100.
56. Bacteriophages in sewage: abundance, roles, and applications / E. Ballesté, A. R. Blanch, M. Muniesa [и др.] // *FEMS Microbes*. – 2022. – Т. 3. – С. xtac009.
57. Bacteriophages in wastewater treatment: can they be an approach to optimize biological treatment processes? T. 29 / A. C. Bolsan, H. C. Rodrigues, H. C. Z. Abilhôa [и др.]. – 2022.
58. Baillie, L. *Bacillus anthracis*, a bug with attitude! / L. Baillie, T. D. Read // *Current Opinion in Microbiology*. – 2001. – Т. 4. – № 1. – С. 78-81.
59. Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies / R. R. Wick, M. B. Schultz, J. Zobel, K. E. Holt // *Bioinformatics*. – 2015. – Т. 31. – № 20. – С. 3350–3352.
60. Barre, F. X. FtsK and SpoIIIE: the tale of the conserved tails / F. X. Barre // *Molecular Microbiology*. – 2007. – Т. 66. – № 5. – С. 1051-1055.
61. Bartoszewicz, M. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk / M. Bartoszewicz, B. M. Hansen, I. Swiecicka // *Food Microbiology*. – 2008. – Т. 25. – № 4. – С. 588-596.
62. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller [и др.] // *Journal of Molecular Biology*. – 1990. – Т. 215. – № 3. – С. 403-410.
63. Bensing, B. A. Proteins PblA and PblB of *Streptococcus mitis*, which promote binding to human platelets, are encoded within a lysogenic bacteriophage / B. A. Bensing, I. R. Siboo, P. M. Sullam // *Infection and Immunity*. – 2001. – Т. 69. – № 10. – С. 6186-6192.
64. Bertozzi Silva, J. Host receptors for bacteriophage adsorption / J. Bertozzi Silva, Z. Storms, D. Sauvageau // *FEMS Microbiology Letters*. – 2016. – Т. 363. – № 4. – С. fnw002.
65. Biodegradation of pendimethalin by three strains of bacteria isolated from pesticide-polluted soils / I. B. Share, A. O. Abdelbag, E. A. E. Elsheikh [и др.] // *University of Khartoum Journal of Agricultural Sciences*. – 2023. – Т. 21. – № 2. – С. 233-252.

66. Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review / G. E. H. Osman, R. Already, A. S. A. Assaeedi [и др.] // Egyptian Journal of Biological Pest Control. – 2015. – Т. 25. – № 1. – С. 271-288.
67. Bioremediation of cadmium-contaminated soil through cultivation of maize inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria / E. Malekzadeh, H. A. Alikhani, G. R. Savaghebi-Firoozabadi, M. Zarei // Bioremediation Journal. – 2012. – Т. 16. – № 4. – С. 204-211.
68. Black box of phage-bacterium interactions: exploring alternative phage infection strategies / S. Mäntynen, E. Laanto, H. M. Oksanen [и др.] // Open Biology. – 2021. – Т. 11. – № 9. – С. 210188.
69. Black, L. W. Old, new, and widely true: the bacteriophage T4 DNA packaging mechanism. Т. 479 / L. W. Black. – 2015.
70. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons / N. F. Alikhan, N. K. Petty, N. L. Ben Zakour, S. A. Beatson // BMC Genomics. – 2011. – Т. 12. – № 1. – С. 1-10.
71. Bobay, L. M. Pervasive domestication of defective prophages by bacteria / L. M. Bobay, M. Touchon, E. P. C. Rocha // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – Т. 111. – № 33. – С. 12127-12132.
72. Bolger, A. M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics. – 2014. – Т. 30. – № 15. – С. 2114-2120.
73. Botstein, D. A theory of modular evolution for bacteriophages / D. Botstein // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1980. – Т. 354. – № 1. – С. 484-490.
74. Bottone, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen / E. J. Bottone // Clinical Microbiology Reviews. – 2010. – Т. 23. – № 2. – С. 382-398.
75. Boyd, E. F. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. Т. 10 / E. F. Boyd, H. Brüssow. – 2002.
76. Bradley, D. E. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins / D. E. Bradley // Bacteriological reviews. – 1967. – Т. 31. – № 4. – С. 230-314.
77. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes / L. J. Marinelli, M. Piuri, Z. Swigoňová [и др.] // PLoS ONE. – 2008. – Т. 3. – № 12. – С. e3957.
78. Brown-Jaque, M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements / M. Brown-Jaque, W. Calero-Cáceres, M. Muniesa // Plasmid. – 2015. – Т. 79. – С. 1-7.
79. Brüssow, H. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion / H. Brüssow, C. Canchaya, W.-D. Hardt // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2004. – Т. 68. – № 3. – С. 560-602.

80. Bryant, D. Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks / D. Bryant, V. Moulton // *Molecular Biology and Evolution*. – 2004. – T. 21. – № 2. – С. 255-265.
81. Bukhari, A. I. Ends of bacteriophage Mu DNA / A. I. Bukhari, S. Froshauer, M. Botchan // *Nature*. – 1976. – T. 264. – № 5586. – С. 580-583.
82. Bukhari, A. I. Influence of insertions on packaging of host sequences covalently linked to bacteriophage Mu DNA / A. I. Bukhari, A. L. Taylor // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1975. – T. 72. – № 11. – С. 4399-4403.
83. Campbell, A. Comparative molecular biology of lambdoid phages / A. Campbell // *Annual Review of Microbiology*. – 1994. – T. 48. – № 1. – С. 193-222.
84. Campbell, A. Evolution of the lambdoid phages / A. Campbell, D. Botstein // *Cold Spring Harbor Monograph Archive*. – 1983. – T. 13. – С. 365-380.
85. Casas, V. Role of bacteriophage-encoded exotoxins in the evolution of bacterial pathogens / V. Casas, S. Maloy // *Future Microbiology*. – 2011. – T. 6. – № 12. – С. 1461-1473.
86. Casjens, S. R. Determining DNA packaging strategy by analysis of the termini of the chromosomes in tailed-bacteriophage virions / S. R. Casjens, E. B. Gilcrease // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – 2009. – T. 502. – С. 91-111.
87. Casjens, S. R. Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly / S. R. Casjens, P. A. Thuman-Commike // *Virology*. – 2011. – T. 411. – № 2. – С. 393-415.
88. Casjens, S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? / S. Casjens // *Molecular Microbiology*. – 2003. – Vol. 49. – № 2. – P. 277-300.
89. Causes and consequences of bacteriophage diversification via genetic exchanges across lifestyles and bacterial taxa / J. A. Moura de Sousa, E. Pfeifer, M. Touchon, E. P. C. Rocha // *Molecular Biology and Evolution*. – 2021. – T. 38. – № 6. – С. 2497-2512.
90. Cazares, A. Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages / A. Cazares, G. Mendoza-Hernández, G. Guarneros // *BMC Genomics*. – 2014. – T. 15. – № 1. – С. 1146.
91. Centers for disease control and prevention expert panel meetings on prevention and treatment of anthrax in adults / K. A. Hendricks, M. E. Wright, S. V. Shadomy [и др.] // *Emerging infectious diseases*. – 2014. – T. 20. – № 2. – С. e130687.
92. Characterization and complete genome sequence of a virulent bacteriophage B4 infecting food-borne pathogenic *Bacillus cereus* / J. H. Lee, H. Shin, B. Son [и др.] // *Archives of Virology*. – 2013. – T. 158. – № 10. – С. 2101-2108.
93. Characterization of emetic and diarrheal *Bacillus cereus* strains from a 2016 foodborne

outbreak using whole-genome sequencing: addressing the microbiological, epidemiological, and bioinformatic challenges / L. M. Carroll, M. Wiedmann, M. Mukherjee [и др.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Т. 10. – С. 420842.

94. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4 / B. Son, J. Yun, J. A. Lim [и др.] // *BMC Microbiology*. – 2012. – Т. 12. – № 33. – С. 1-9.

95. Chevalier, B. S. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility / B. S. Chevalier, B. L. Stoddard // *Nucleic Acids Research*. – 2001. – Т. 29. – № 18. – С. 3757-3774.

96. Chiang, Y. N. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: the new and noncanonical / Y. N. Chiang, J. R. Penadés, J. Chen // *PLoS Pathogens*. – 2019. – Т. 15. – № 8. – С. e1007878.

97. Clark, C. A. The *oac* gene encoding a lipopolysaccharide O-antigen acetylase maps adjacent to the integrase-encoding gene on the genome of *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6 / C. A. Clark, J. Beltrame, P. A. Manning // *Gene*. – 1991. – Т. 107. – № 1. – С. 43-52.

98. Clokie, M. R. Bacteriophages, methods and protocols. Volume III. Т. 1681 / M. R. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne; ред. R. L. Martha R.J. Clokie, Andrew M. Kropinski. – Humana Press Inc., 2018. – 327 с.

99. Co-evolution of segregation guide DNA motifs and the FtsK translocase in bacteria: identification of the atypical *Lactococcus lactis* KOPS motif / S. Nolivos, F. Touzain, C. Pages [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Т. 40. – № 12. – С. 5535-5545.

100. Coevolution with bacteriophages drives genome-wide host evolution and constrains the acquisition of abiotic-beneficial mutations / P. D. Scanlan, A. R. Hall, G. Blackshields [и др.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2015. – Т. 32. – № 6. – С. 1425-1435.

101. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions / Z. Erez, I. Steinberger-Levy, M. Shamir [и др.] // *Nature*. – 2017. – Т. 541. – № 7638. – С. 488-493.

102. Complete genome sequence of *Bacillus cereus sensu stricto* VKM B-370, isolated from the *Silkworm bombyx mori* / E. G. Pilgrimova, R. M. Buzikov, O. A. Kazantseva, A. M. Shadrin // *Microbiology Resource Announcements*. – 2021. – Т. 10. – № 20. – С. e00386-21.

103. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* bacteriophage BMBtp2 / Z. Dong, D. Peng, Y. Wang [и др.] // *Genome Announcements*. – 2013. – Т. 1. – № 1. – С. e00011-12.

104. Complete genome sequence of bacteriophage T5 / J. Wang, Y. Jiang, M. Vincent [и др.] // *Virology*. – 2005. – Т. 332. – № 1. – С. 45-65.

105. Conservation of the N-terminus of some phage tail proteins / R. Villafane, S. Costa, R. Ahmed, C. Salgado // *Archives of Virology*. – 2005. – Т. 150. – № 12. – С. 2609-2621.

106. Contreras-Moreira, B. GET\_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable

and robust microbial pangenome analysis / B. Contreras-Moreira, P. Vinuesa // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – Т. 79. – № 24. – С. 7696-7701.

107. Coren, J. S. Headful packaging revisited: the packaging of more than one DNA molecule into a bacteriophage P1 head / J. S. Coren, J. C. Pierce, N. Sternberg // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – Т. 249. – № 1. – С. 176-184.

108. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau [и др.] // *Science*. – 2007. – Т. 315. – № 5819. – С. 1709-1712.

109. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments / X. Wang, Y. Kim, Q. Ma [и др.] // *Nature Communications*. – 2010. – Т. 1. – № 1. – С. 147.

110. Crystal structure of P22 tailspike protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer / S. Steinbacher, R. Seckler, S. Miller [и др.] // *Science*. – 1994. – Т. 265. – № 5170. – С. 383-386.

111. *cse15*, *cse60*, and *csk22* are new members of mother-cell-specific sporulation regulons in *Bacillus subtilis* / A. O. Henriques, E. M. Bryan, B. W. Beall, C. P. Moran // *Journal of Bacteriology*. – 1997. – Т. 179. – № 2. – С. 389-398.

112. Database resources of the national center for biotechnology information / E. W. Sayers, E. E. Bolton, J. R. Brister [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2022. – Т. 50. – № D1. – С. D20-D26.

113. Davidson, A. R. A common trick for transferring bacterial DNA / A. R. Davidson // *Science*. – 2018. – Т. 362. – № 6411. – С. 152-153.

114. Debroas, D. Viruses as key reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment / D. Debroas, C. Siguret // *ISME Journal*. – 2019. – Т. 13. – № 11. – С. 2856-2867.

115. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations / G. Jiménez, M. Urdiain, A. Cifuentes [и др.] // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2013. – Т. 36. – № 6. – С. 383-391.

116. Detection of *Bacillus anthracis* spores from environmental water using bioluminescent reporter phage / C. Nguyen, R. Makkar, N. J. Sharp [и др.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2017. – Т. 123. – № 5. – С. 1184-1193.

117. Development of a P1 phagemid system for the delivery of DNA into Gram-negative bacteria / C. Westwater, D. A. Schofield, M. G. Schmidt [и др.] // *Microbiology*. – 2002. – Т. 148. – № 4. – С. 943-950.

118. Diagnostic challenges within the *Bacillus cereus*-group: finding the beast without teeth / V. Muigg, A. Cuénod, S. Purushothaman [и др.] // *New Microbes and New Infections*. – 2022. – Т. 49-50. – С. 101040.

119. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease / J. M. Norman, S. A. Handley, M. T. Baldrige [и др.] // *Cell*. – 2015. – Т. 160. – № 3. – С. 447-460.

120. Drake, J. W. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes / J. W. Drake // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1991. – T. 88. – № 16. – С. 7160-7164.
121. Dröge, A. Bacteriophage SPP1 DNA Packaging / A. Dröge, P. Tavares // Viral Genome Packaging Machines: Genetics, Structure, and Mechanism. – Springer, 2005. – С. 89-101.
122. Dunn, J. J. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements / J. J. Dunn, F. W. Studier, M. Gottesman // Journal of Molecular Biology. – 1983. – T. 166. – № 4. – С. 111-112.
123. Edgell, D. R. Free-Standing Homing Endonucleases of T-even Phage: Freeloaders or Functionaries? / D. R. Edgell // Homing Endonucleases and Inteins / ред. М. Belfort [и др.]. – Springer Berlin, 2005. – С. 147-160.
124. Edgell, D. R. Mobile DNA elements in T4 and related phages. Т. 7 / D. R. Edgell, E. A. Gibb, M. Belfort. – 2010.
125. Effects of actin-like proteins encoded by two *Bacillus pumilus* phages on unstable lysogeny, revealed by genomic analysis / Y. Yuan, Q. Peng, D. Wu [и др.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – Т. 81. – № 1. – С. 339-350.
126. Ehling-Schulz, M. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential / M. Ehling-Schulz, D. Lereclus, T. M. Koehler // Microbiology Spectrum. – 2019. – Т. 7. – № 3. – С. 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018.
127. Ellis, D. M. Nucleotide sequence of the cohesive single-stranded ends of *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage phi 105 / D. M. Ellis, D. H. Dean // Journal of Virology. – 1985. – Т. 55. – № 2. – С. 513-515.
128. Encyclopedia of entomology / ред. J. L. Capinera. – 2. – Springer Science & Business Media, 2008. – 4308 с.
129. Endersen, L. The use of bacteriophages for food safety. Т. 36 / L. Endersen, A. Coffey. – 2020.
130. Erill, I. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* group phage TsarBomba / I. Erill, S. M. Caruso // Genome Announcements. – 2015. – Т. 3. – № 5. – С. e01178-15.
131. Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes / R. S. Kaas, C. Friis, D. W. Ussery, F. M. Aarestrup // BMC Genomics. – 2012. – Т. 13. – С. 1-13.
132. Evolution of virulence in emerging epidemics / T. W. Berngruber, R. Froissart, M. Choisy, S. Gandon // PLoS Pathogens. – 2013. – Т. 9. – № 3. – С. e1003209.
133. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage / R. W. Hendrix, M. C. M. Smith, R. N. Burns [и др.] // Proceedings of the National Academy

of Sciences of the United States of America. – 1999. – Т. 96. – № 5. – С. 2192-2197.

134. Faelen, M. Bacteriophage Mu-1: a tool to transpose and to localize bacterial genes / M. Faelen, A. Toussaint // *Journal of Molecular Biology*. – 1976. – Т. 104. – № 3. – С. 525-539.

135. Federhen, S. The NCBI taxonomy database / S. Federhen // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Т. 40. – № D1. – С. D136-D143.

136. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications / J. Rakonjac, N. J. Bennett, J. Spagnuolo [и др.] // *Current issues in molecular biology*. – 2011. – Т. 13. – № 2. – С. 51-76.

137. First steps in the analysis of prokaryotic pan-genomes. Т. 14 / S. S. Costa, L. C. Guimarães, A. Silva [и др.]. – 2020.

138. Flexible genes establish widespread bacteriophage pan-genomes in cryoconite hole ecosystems / C. M. Bellas, D. C. Schroeder, A. Edwards [и др.] // *Nature Communications*. – 2020. – Т. 11. – № 1. – С. 4403.

139. Fokine, A. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages / A. Fokine, M. G. Rossmann // *Bacteriophage*. – 2014. – Т. 4. – № 2. – С. e28281.

140. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy / D. J. Malik, I. J. Sokolov, G. K. Vinner [и др.] // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2017. – Т. 249. – С. 100-133.

141. Fortier, L. C. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens / L. C. Fortier, O. Sekulovic // *Virulence*. – 2013. – Т. 4. – № 5. – С. 354-365.

142. Frankland, G. C. Studies on some new micro-organisms obtained from air / G. C. Frankland, P. F. Frankland // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.)*. – 1887. – Т. 178. – С. 257-287.

143. Freeman, V. J. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae* / V. J. Freeman // *Journal of bacteriology*. – 1951. – Т. 61. – № 6. – С. 675-688.

144. FtsK, a literate chromosome segregation machine / S. Bigot, V. Sivanathan, C. Possoz [и др.] // *Molecular Microbiology*. – 2007. – Т. 64. – № 6. – С. 1434-1441.

145. Functional genomic analysis of two *Staphylococcus aureus* phages isolated from the dairy environment / P. García, B. Martínez, J. M. Obeso [и др.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2009. – Т. 75. – № 24. – С. 7663-7673.

146. Gallet, R. Effects of bacteriophage traits on plaque formation / R. Gallet, S. Kannoly, I. N. Wang // *BMC Microbiology*. – 2011. – Т. 11. – С. 181.

147. Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family *Leviviridae*) / S. D. Friedman, F. J. Genthner, J. Gentry

[и др.] // Journal of Virology. – 2009. – Т. 83. – № 21. – С. 11233-11243.

148. Genetic and phenotypic diversity in *Burkholderia*: contributions by prophage and phage-like elements / С. М. Ronning, L. Losada, L. Brinkac [и др.] // BMC Microbiology. – 2010. – Т. 10. – С. 1–17.

149. Genome hypermobility by lateral transduction / J. Chen, N. Quiles-Puchalt, Y. N. Chiang [и др.] // Science. – 2018. – Т. 362. – № 6411. – С. 207-212.

150. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group / Y. Liu, Q. Lai, M. Göker [и др.] // Scientific Reports. – 2015. – Т. 5. – С. 14082.

151. Genomic sequence and analysis of the atypical temperate bacteriophage N15 / V. Ravin, N. Ravin, S. Casjens [и др.] // Journal of Molecular Biology. – 2000. – Т. 299. – № 1. – С. 53-73.

152. Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages / R. J. Juhala, M. E. Ford, R. L. Duda [и др.] // Journal of Molecular Biology. – 2000. – Т. 299. – № 1. – С. 27-51.

153. Ghosh, K. Complete nucleotide sequence analysis of a novel *Bacillus subtilis*-infecting phage, BSP38, possibly belonging to a new genus in the subfamily *Spounavirinae* / K. Ghosh, K. P. Kim // Archives of Virology. – 2019. – Т. 164. – № 3. – С. 875-878.

154. Gillis, A. Phages preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: past, present and future / A. Gillis, J. Mahillon // Viruses. – 2014. – Т. 6. – № 7. – С. 2623-2672.

155. Glonti, T. *In vitro* techniques and measurements of phage characteristics that Are important for phage therapy success / T. Glonti, J. P. Pirnay // Viruses. – 2022. – Т. 14. – № 7. – С. 1490.

156. Glycosyltransferases encoded by viruses / N. Markine-Goriaynoff, L. Gillet, J. L. Van Etten [и др.] // Journal of General Virology. – 2004. – Т. 85. – № 10. – С. 2741-2754.

157. Gordillo Altamirano, F. L. Phage therapy in the postantibiotic era / F. L. Gordillo Altamirano, J. J. Barr // Clinical Microbiology Reviews. – 2019. – Т. 32. – № 2. – С. e00066-18.

158. Gpwc of the T4-type bacteriophages: structure, function, and evolution of a segmented coiled-coil protein that controls viral infectivity / A. Letarov, X. Manival, C. Desplats, H. M. Krisch // Journal of Bacteriology. – 2005. – Т. 187. – № 3. – С. 1055–1066.

159. Granum, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins / P. E. Granum // Journal of Applied Bacteriology. – 1994. – Т. 76. – С. 61S-66S.

160. Groman, N. B. Evidence for the induced nature of the change from nontoxigenicity to toxigenicity in *Corynebacterium diphtheriae* as a result of exposure to specific bacteriophage / N. B. Groman // Journal of bacteriology. – 1953. – Т. 66. – № 2. – С. 184-191.

161. Guidance for creating individual and batch latinized binomial virus species names / T. S. Postler, L. Rubino, E. M. Adriaenssens [и др.] // Journal of General Virology. – 2022. – Т. 103. – № 12.

– C. 001800.

162. Haggard-Ljungquist, E. DNA sequences of the tail fiber genes of bacteriophage P2: evidence for horizontal transfer of tail fiber genes among unrelated bacteriophages / E. Haggard-Ljungquist, C. Halling, R. Calendar // *Journal of Bacteriology*. – 1992. – T. 174. – № 5. – C. 1462-1477.

163. Hampton, H. G. The arms race between bacteria and their phage foes. T. 577 / H. G. Hampton, B. N. J. Watson, P. C. Fineran. – 2020.

164. Hashem, F. M. Rhizobiophage effects on nodulation, nitrogen fixation, and yield of field-grown soybeans (*Glycine max* L. Merr.) / F. M. Hashem, J. S. Angle // *Biology and Fertility of Soils*. – 1990. – T. 9. – № 4. – C. 330-334.

165. Hatfull, G. F. Bacteriophage genomics / G. F. Hatfull // *Current Opinion in Microbiology*. – 2008. – T. 11. – № 5. – C. 447-453.

166. Hatfull, G. F. Dark matter of the biosphere: the amazing world of bacteriophage diversity / G. F. Hatfull // *Journal of Virology*. – 2015. – T. 89. – № 16. – C. 8107-8110.

167. Hatfull, G. F. Bacteriophages and their genomes. T. 1 / G. F. Hatfull, R. W. Hendrix. – 2011.

168. Hay, I. D. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy / I. D. Hay, T. Lithgow // *EMBO reports*. – 2019. – T. 20. – № 6. – C. e47427.

169. Heller, K. J. Identification of the phage gene for host receptor specificity by analyzing hybrid phages of T5 and BF23 / K. J. Heller // *Virology*. – 1984. – T. 139. – № 1. – C. 11-21.

170. Hershey, A. D. Complementary structure of interacting sites at the ends of lambda DNA molecules / A. D. Hershey, E. Burgi // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1965. – T. 53. – № 2. – C. 325-328.

171. Heterogeneity of soil bacterial and bacteriophage communities in three rice agroecosystems and potential impacts of bacteriophage on nutrient cycling / Y. Wang, Y. Liu, Y. Wu [и др.] // *Environmental Microbiomes*. – 2022. – T. 17. – № 1. – C. 17.

172. High-throughput identification of viral termini and packaging mechanisms in virome datasets using PhageTermVirome / J. R. Garneau, V. Legrand, M. Marbouty [и др.] // *Scientific Reports*. – 2021. – T. 11. – № 1. – C. 18319.

173. Hoess, R. H. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites / R. H. Hoess, M. Ziese, N. Sternberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1982. – T. 79. – № 11 I. – C. 3398-3402.

174. Hofer, B. The superinfection exclusion gene (*sieA*) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product / B. Hofer, M. Ruge, B. Dreiseikelmann // *Journal of Bacteriology*. – 1995. – T. 177. – № 11. – C. 3080-3086.

175. Hoffmaster, A. R. Control of virulence gene expression in *Bacillus anthracis* / A. R.

- Hoffmaster, T. M. Koehler // *Journal of Applied Microbiology*. – 1999. – Т. 87. – № 2. – С. 279-281.
176. Homologous-pairing activity of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replication protein G35P / S. Ayora, R. Missich, P. Mesa [и др.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Т. 277. – № 39. – С. 35969-35979.
177. Hunter, M. Superinfection exclusion: a viral strategy with short-term benefits and long-term drawbacks / M. Hunter, D. Fusco // *PLoS Computational Biology*. – 2022. – Т. 18. – № 5. – С. e1010125.
178. Huson, D. H. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies / D. H. Huson, D. Bryant // *Molecular Biology and Evolution*. – 2006. – Т. 23. – № 2. – С. 254-267.
179. Huss, P. Engineered bacteriophages as programmable biocontrol agents / P. Huss, S. Raman // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2020. – Т. 61. – С. 116-121.
180. Hyman, P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. Т. 12 / P. Hyman. – 2019.
181. Hyman, P. Practical methods for determining phage growth parameters / P. Hyman, S. T. Abedon // *Methods in molecular biology*. – 2009. – Т. 501. – С. 175-202.
182. Identification, genetic diversity and cereulide producing ability of *Bacillus cereus* group strains isolated from Beninese traditional fermented food condiments / L. Thorsen, P. Azokpota, B. M. Hansen [и др.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2010. – Т. 142. – № 1-2. – С. 247-250.
183. Identification of the pXO1 plasmid in attenuated *Bacillus anthracis* vaccine strains / X. Liang, H. Zhang, E. Zhang [и др.] // *Virulence*. – 2016. – Т. 7. – № 5. – С. 578-586.
184. Identification of the repressor-encoding gene of the *Lactobacillus* bacteriophage A2 / V. Ladero, P. García, V. Bascarán [и др.] // *Journal of Bacteriology*. – 1998. – Т. 180. – № 13. – С. 3474-3476.
185. Impact of phages on soil bacterial communities and nitrogen availability under different assembly scenarios / L. P. P. Braga, A. Spor, W. Kot [и др.] // *Microbiome*. – 2020. – Т. 8. – № 1. – С. 52.
186. Improved single-cell genome amplification by a high-efficiency phi29 DNA polymerase / J. Zhang, X. Su, Y. Wang [и др.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023. – Т. 11. – С. 1233856.
187. In vivo *Bacillus anthracis* gene expression requires, PagR as an intermediate effector of the AtxA signalling cascade / T. Mignot, E. Couture-Tosi, S. Mesnage [и др.] // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2004. – Т. 293. – № 7-8. – С. 619-624.
188. In vivo bypass of chaperone by extended coiled-coil motif in T4 tail fiber / Y. Qu, P. Hyman, T. Harrah, E. Goldberg // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Т. 186. – № 24. – С. 8363-8369.
189. Influence of environmental factors on phage-bacteria interaction and on the efficacy and

infectivity of phage P100 / S. Fister, C. Robben, A. K. Witte [и др.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Т. 7. – С. 197487.

190. Inhibition of spontaneous induction of lambdoid prophages in *Escherichia coli* cultures: simple procedures with possible biotechnological applications. Т. 1 / A. Czyz, M. Los, B. Wrobel, G. Wegrzyn. – 2001.

191. Insights into a viral motor: the structure of the HK97 packaging termination assembly / D. E. D. P. Hawkins, O. W. Bayfield, H. K. H. Fung [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Т. 51. – № 13. – С. 7025-7035.

192. Isolation, partial characterization and application of bacteriophages in eradicating biofilm formation by *Bacillus cereus* on stainless steel surfaces in food processing facilities / M. Gdoura-Ben Amor, A. Culot, C. Techer [и др.] // *Pathogens*. – 2022. – Т. 11. – № 8. – С. 872.

193. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* bacteriophage DZ1 and its application in foods / Z. Huang, X. Yuan, Z. Zhu [и др.] // *Food chemistry*. – 2024. – Т. 431. – С. 137128.

194. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages against *Staphylococcus aureus* from India: newer therapeutic agents against *Bovine mastitis* / M. Y. Ganaie, S. Qureshi, Z. Kashoo [и др.] // *Veterinary Research Communications*. – 2018. – Т. 42. – № 4. – С. 289-295.

195. Isolation and characterization of two novel *Siphoviruses* Novomoskovsk and Bolokhovo, encoding polysaccharide depolymerases active against *Bacillus pumilus* / A. V. Skorynina, O. N. Korosova, O. A. Kazantseva [и др.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Т. 23. – № 21. – С. 12988.

196. Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain / S. Miold, W. Rabsch, M. Rohde [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1999. – Т. 96. – № 17. – С. 9845-9850.

197. Jakočiūnė, D. A rapid bacteriophage dna extraction method / D. Jakočiūnė, A. Moodley // *Methods and Protocols*. – 2018. – Т. 1. – № 3. – С. 27.

198. JPred4: A protein secondary structure prediction server / A. Drozdetskiy, C. Cole, J. Procter, G. J. Barton // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Т. 43. – № W1. – С. W389-W394.

199. Katoh, K. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability / K. Katoh, D. M. Standley // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. – Т. 30. – № 4. – С. 772-780.

200. Kazantseva, O. A. Novel *Bacillus*-infecting bacteriophage B13 – the founding member of the proposed new genus *Bunatrivirus* / O. A. Kazantseva, E. G. Pilgrimova, A. M. Shadrin // *Viruses*. – 2022. – Т. 14. – № 10. – С. 2300.

201. Kazantseva, O. A. vB\_BcM\_Sam46 and vB\_BcM\_Sam112, members of a new

bacteriophage genus with unusual small terminase structure / O. A. Kazantseva, E. G. Pilgrimova, A. M. Shadrin // *Scientific Reports*. – 2021. – T. 11. – № 1. – C. 12173.

202. Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. T. 62 / L. M. Carroll, R. A. Cheng, M. Wiedmann, J. Kovac. – 2022.

203. Kong, M. Bacteriophage PBC1 and its endolysin as an antimicrobial agent against *Bacillus cereus* / M. Kong, S. Ryu // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2015. – T. 81. – № 7. – C. 2274-2283.

204. Koonin, E. V. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: the ultimate modularity. T. 479 / E. V. Koonin, V. V. Dolja, M. Krupovic. – 2015.

205. Koonin, E. V. Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria / E. V. Koonin, K. S. Makarova, Y. I. Wolf // *Annual Review of Microbiology*. – 2017. – T. 71. – C. 233-261.

206. Koonin, E. V. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world / E. V. Koonin, Y. I. Wolf // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – T. 36. – № 21. – C. 6688-6719.

207. KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase / S. Bigot, O. A. Saleh, C. Lesterlin [и др.] // *EMBO Journal*. – 2005. – T. 24. – № 21. – C. 3770-3780.

208. Koskella, B. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities / B. Koskella, S. Meaden // *Viruses*. – 2013. – T. 5. – № 3. – C. 806-823.

209. Kropinski, A. M. Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells / A. M. Kropinski // *Methods in molecular biology* / ред. M. R. J. Clokie, A. M. Kropinski. – Humana Press, 2009. – T. 501. – C. 151-155.

210. Kühn, R. Cre/loxP recombination system and gene targeting / R. Kühn, R. M. Torres // *Methods in molecular biology*. – 2002. – T. 180. – C. 175-204.

211. Kurniawan, A. Rhizobacterial *Bacillus mycoides* functions in stimulating the antioxidant defence system and multiple phytohormone signalling pathways to regulate plant growth and stress tolerance / A. Kurniawan, H. W. Chuang // *Journal of Applied Microbiology*. – 2022. – T. 132. – № 2. – C. 1260-1274.

212. Kuzminov, A. Double-strand end repair via the RecBC pathway in *Escherichia coli* primes DNA replication / A. Kuzminov, F. W. Stahl // *Genes and Development*. – 1999. – T. 13. – № 3. – C. 345-356.

213. Kwoh, D. Y. Bacteriophage P22-mediated specialized transduction in *Salmonella typhimurium*: high frequency of aberrant prophage excision / D. Y. Kwoh, J. Kemper // *Journal of Virology*. – 1978. – T. 27. – № 3. – C. 519-534.

214. Labrie, S. J. Bacteriophage resistance mechanisms / S. J. Labrie, J. E. Samson, S.

Moineau // Nature Reviews Microbiology. – 2010. – Т. 8. – № 5. – С. 317-327.

215. Lambowitz, A. M. Introns as mobile genetic elements / A. M. Lambowitz, M. Belfort // Annual Review of Biochemistry. – 1993. – Т. 62. – № 1. – С. 587-622.

216. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // Nature Methods. – 2012. – Т. 9. – № 4. – С. 357-359.

217. Laslett, D. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences / D. Laslett, B. Canback // Nucleic Acids Research. – 2004. – Т. 32. – № 1. – С. 11-16.

218. Lee, T. J. Construction of bacteriophage Phi29 DNA packaging motor and its applications in nanotechnology and therapy / T. J. Lee, C. Schwartz, P. Guo // Annals of Biomedical Engineering. – 2009. – Т. 37. – № 10. – С. 2064-2081.

219. Li, H. Seqtk: toolkit for processing sequences in FASTA/Q formats. – URL: <https://github.com/lh3/seqtk/> (дата обращения: 20.06.2019). – Текст : электронный.

220. Lin, D. M. Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance / D. M. Lin, B. Koskella, H. C. Lin // World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics. – 2017. – Т. 8. – № 3. – С. 162–173.

221. Lin, H. DNA requirements in vivo for phage T4 packaging / H. Lin, L. W. Black // Virology. – 1998. – Т. 242. – № 1. – С. 118-127.

222. Liss, A. *Acholeplasma laidlawii* cells acutely and chronically infected with group 1 *Acholeplasmavirus* / A. Liss, B. E. Ritter // Journal of General Microbiology. – 1985. – Т. 131. – № 7. – С. 1713-1718.

223. Little, S. F. Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection / S. F. Little, B. E. Ivins // Microbes and Infection. – 1999. – Т. 1. – № 2. – С. 131-139.

224. Livingstone, P. G. Genome sequencing and pan-genome analysis of 23 *Corallocooccus* spp. Strains reveal unexpected diversity, with particular plasticity of predatory gene sets / P. G. Livingstone, R. M. Morphey, D. E. Whitworth // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Т. 9. – С. 3187.

225. Long noncontractile tail machines of bacteriophages / A. R. Davidson, L. Cardarelli, L. G. Pell [и др.] // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2012. – Т. 726. – С. 115-142.

226. Low-level predation by lytic phage phiIPLA-RODI promotes biofilm formation and triggers the stringent response in *Staphylococcus aureus* / L. Fernández, S. González, A. B. Campelo [и др.] // Scientific Reports. – 2017. – Т. 7. – № 1. – С. 40965.

227. Lund, T. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis / T. Lund, M. L. De Buyser, P. E. Granum // Molecular Microbiology. – 2000. – Т. 38. – № 2. – С. 254-261.

228. Lund, T. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus* / T. Lund, P. E. Granum // Microbiology. – 1997. – Т. 143. – № 10. – С. 3329-3336.

229. Lupas, A. N. The structure and topology of  $\alpha$ -helical coiled coils / A. N. Lupas, J. Bassler, S. Dunin-Horkawicz // *Sub-Cellular Biochemistry*. – 2017. – T. 82. – C. 95-129.
230. LysPBC2, a novel endolysin harboring a *Bacillus cereus* spore binding domain / M. Kong, H. Na, N. C. Ha, S. Ryu // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2018. – T. 85. – № 5. – C. e02462-18.
231. Mahan, M. J. Bacteriophage P22 transduction of integrated plasmids: single-step cloning of *Salmonella typhimurium* gene fusions / M. J. Mahan, J. M. Schlauch, J. J. Mekalanos // *Journal of Bacteriology*. – 1993. – T. 175. – № 21. – C. 7086-7091.
232. Makela, P. H. Glucosylation of lipopolysaccharide in *Salmonella*: mutants negative for O antigen factor 122 / P. H. Makela // *Journal of Bacteriology*. – 1973. – T. 116. – № 2. – C. 847-856.
233. Marinelli, L. J. Recombineering: a powerful tool for modification of bacteriophage genomes / L. J. Marinelli, G. F. Hatfull, M. Piuri // *Bacteriophage*. – 2012. – T. 2. – № 1. – C. 5-14.
234. Martel, B. CRISPR-Cas: an efficient tool for genome engineering of virulent bacteriophages / B. Martel, S. Moineau // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – T. 42. – № 14. – C. 9504-9513.
235. Martínez-Jiménez, M. I. *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1-encoded gene 34.1 product is a recombination-dependent DNA replication protein / M. I. Martínez-Jiménez, J. C. Alonso, S. Ayora // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – T. 351. – № 5. – C. 1007-1019.
236. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li [и др.] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – T. 35. – № 6. – C. 1547-1549.
237. Mining of thousands of prokaryotic genomes reveals high abundance of prophages with a strictly narrow host range / G. López-Leal, L. C. Camelo-Valera, J. M. Hurtado-Ramírez [и др.] // *mSystems*. – 2022. – T. 7. – № 4. – C. e0032622.
238. Mizuuchi, K. Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of Mu and other elements / K. Mizuuchi // *Annual Review of Biochemistry*. – 1992. – T. 61. – № 1. – C. 1011-1051.
239. Moderate high-pressure superdormancy in *Bacillus* spores: properties of superdormant spores and proteins potentially influencing moderate high-pressure germination / A. I. Delbrück, Y. Tritten, P. Nanni [и др.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2022. – T. 88. – № 4. – C. e02406-21.
240. Molecular characterization of a new efficiently transducing bacteriophage identified in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / M. Varga, R. Pantůček, V. Růžicková, J. Doškař // *Journal of General Virology*. – 2016. – T. 97. – № 1. – C. 258-268.
241. Molecular characterization of the O-acetyl transferase gene of converting bacteriophage

SF6 that adds group antigen 6 to *Shigella flexneri* / N. K. Verma, J. M. Brandt, D. J. Verma, A. A. Lindberg // *Molecular Microbiology*. – 1991. – Т. 5. – № 1. – С. 71-75.

242. Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK / J. Löwe, A. Ellonen, M. D. Allen [и др.] // *Molecular Cell*. – 2008. – Т. 31. – № 4. – С. 498-509.

243. Molecular mechanisms that contribute to horizontal transfer of plasmids by the bacteriophage SPP1 / A. Valero-Rello, M. López-Sanz, A. Quevedo-Olmos [и др.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Т. 8. – С. 1816.

244. Molecular substructure of a viral receptor-recognition protein. The gp17 tail-fiber of bacteriophage T7 / A. C. Steven, B. L. Trus, J. V. Maizel [и др.] // *Journal of Molecular Biology*. – 1988. – Т. 200. – № 2. – С. 351-365.

245. Morse, M. L. Transduction in *Escherichia Coli* K-12 / M. L. Morse, E. M. Lederberg, J. Lederberg // *Genetics*. – 1956. – Т. 41. – № 1. – С. 142.

246. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. T. 34 / H. Kim, M. Kim, S. K. Im, S. Fang. – 2018.

247. Multilocus sequence type profiles of *Bacillus cereus* isolates from infant formula in China / Y. Yang, X. Yu, L. Zhan [и др.] // *Food Microbiology*. – 2017. – Т. 62. – С. 46-50.

248. Nakamura, L. K. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. / L. K. Nakamura // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1998. – Т. 48. – № 3. – С. 1031-1035.

249. Nanda, A. M. Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions / A. M. Nanda, K. Thormann, J. Frunzke // *Journal of Bacteriology*. – 2015. – Т. 197. – № 3. – С. 410-419.

250. New insights into intestinal phages / R. Sausset, M. A. Petit, V. Gaboriau-Routhiau, M. De Paepe // *Mucosal Immunology*. – 2020. – Т. 13. – № 2. – С. 205–215.

251. Nilsson, A. S. Detection of homologous recombination among bacteriophage P2 relatives / A. S. Nilsson, E. Haggård-Ljungquist // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2001. – Т. 21. – № 2. – С. 259-269.

252. Novel giant siphovirus from *Bacillus anthracis* features unusual genome characteristics / H. H. Ganz, C. Law, M. Schmuki [и др.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Т. 9. – № 1. – С. e85972.

253. Nucleotide sequence and properties of the cohesive DNA termini from bacteriophage HP1c1 of *Haemophilus influenzae* Rd / W. P. Fitzmaurice, A. S. Waldman, R. C. Benjamin [и др.] // *Gene*. – 1984. – Т. 31. – № 1-3. – С. 197-203.

254. Okker, R. J. Partial exclusion of bacteriophage T2 by bacteriophage T4: induction of early enzymes by excluded T2 / R. J. Okker // *The Journal of general virology*. – 1981. – Т. 56. – № Pt 2. – С. 267-274.

255. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes / M. L. Pedulla, M. E. Ford, J. M.

Houtz [и др.] // Cell. – 2003. – Т. 113. – № 2. – С. 171-182.

256. Padmanabhan, R. Complete nucleotide sequence of the cohesive ends of bacteriophage P2 deoxyribonucleic acid / R. Padmanabhan, R. Wu, R. Calendar // Journal of Biological Chemistry. – 1974. – Т. 249. – № 19. – С. 6197-6207.

257. Parkinson, J. S. Deletion mutants of bacteriophage lambda. I. Isolation and initial characterization / J. S. Parkinson, R. J. Huskey // Journal of Molecular Biology. – 1971. – Vol. 56. – № 2. – P. 369-384.

258. Pees, E. Partial exclusion of genes of bacteriophage T2 with T4-glucosylated DNA in crosses with bacteriophage T4 / E. Pees, B. De Groot // Genetica. – 1970. – Т. 41. – № 1. – С. 541-550.

259. Perspective on taxonomic classification of uncultivated viruses / B. E. Dutilh, A. Varsani, Y. Tong [и др.] // Current Opinion in Virology. – 2021. – Т. 51. – С. 207-215.

260. Phage-host interaction: an ecological perspective / S. Chibani-Chennoufi, A. Bruttin, M. L. Dillmann, H. Brüßow // Journal of Bacteriology. – 2004. – Т. 186. – № 12. – С. 3677-3686.

261. Phage-host interactions during pseudolysogeny / W. Cenens, A. Makumi, M. T. Mebrhatu [и др.] // Bacteriophage. – 2013. – Т. 3. – № 1. – С. e25029.

262. Phage G structure at 6.1 Å resolution, condensed DNA, and host identity revision to a *Lysinibacillus* / B. González, L. Monroe, K. Li [и др.] // Journal of Molecular Biology. – 2020. – Т. 432. – № 14. – С. 4139-4153.

263. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials / L. Rodríguez-Rubio, D. Gutiérrez, D. M. Donovan [и др.] // Critical Reviews in Biotechnology. – 2016. – Т. 36. – № 3. – С. 542-552.

264. Phage morons play an important role in *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes / Y. F. Tsao, V. L. Taylor, S. Kala [и др.] // Journal of Bacteriology. – 2018. – Т. 200. – № 22. – С. e00189-18.

265. Phage puppet masters of the marine microbial realm / M. Breitbart, C. Bonnain, K. Malki, N. A. Sawaya // Nature Microbiology. – 2018. – Т. 3. – № 7. – С. 754-766.

266. Phage T4 SegB protein is a homing endonuclease required for the preferred inheritance of T4 tRNA gene region occurring in co-infection with a related phage / V. S. Brok-Volchanskaya, F. A. Kadyrov, D. E. Sivogrivov [и др.] // Nucleic Acids Research. – 2008. – Т. 36. – № 6. – С. 2094-2105.

267. Phage therapy: combating infections with potential for evolving from merely a treatment for complications to targeting diseases / A. Górski, R. Miedzybrodzki, B. Weber-Dabrowska [и др.] // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Т. 7. – С. 218981.

268. Phage therapy as a revolutionary medicine against Gram-positive bacterial infections / A. Loganathan, P. Manohar, K. Eniyan [и др.] // Beni-Suef University Journal of Basic and Applied

Sciences. – 2021. – Т. 10. – № 1. – С. 49.

269. Phage vB\_BveM-Goe7 represents a new genus in the subfamily *Bastillevirinae* / A. D. Furrer, M. Bömeke, M. Hoppert, R. Hertel // *Archives of Virology*. – 2020. – Т. 165. – № 4. – С. 959-962.

270. Phages in nature / M. R. J. Clokie, A. D. Millard, A. V. Letarov, S. Heaphy // *Bacteriophage*. – 2011. – Т. 1. – № 1. – С. 31-45.

271. PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data / J. R. Garneau, F. Depardieu, L. C. Fortier [и др.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Т. 7. – № 1. – С. 8292.

272. Pires, D. P. Understanding the complex phage-host interactions in biofilm communities / D. P. Pires, L. D. R. Melo, J. Azeredo // *Annual Review of Virology*. – 2021. – Т. 8. – № 1. – С. 73-94.

273. Polanczyk, R. A. The american *Bacillus thuringiensis* based biopesticides market / R. A. Polanczyk, K. van Frankenhuyzen, G. Pauli // *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus* / ред. L. Fiuza [и др.]. – Springer, Cham., 2017. – С. 173–184.

274. Possible use of bacteriophages active against *Bacillus anthracis* and other *B. cereus* group members in the face of a bioterrorism threat. Т. 2014 / E. Jończyk-Matysiak, M. Kłak, B. Weber-Dąbrowska [и др.]. – 2014.

275. Practical method for isolation of phage deletion mutants / D. Gutiérrez, L. Fernández, A. Rodríguez, P. García // *Methods and Protocols*. – 2018. – Т. 1. – № 1. – С. 6.

276. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85 / J. L. Milner, L. Silo-Suh, J. C. Lee [и др.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – Т. 62. – № 8. – С. 3061-3065.

277. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms / J. Bondy-Denomy, J. Qian, E. R. Westra [и др.] // *ISME Journal*. – 2016. – Т. 10. – № 12. – С. 2854-2866.

278. Public discussion on a proposed revision of the international code of nomenclature of prokaryotes / A. Oren, D. R. Arahal, R. Rosselló-Móra [и др.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – Т. 71. – № 6. – С. 004918.

279. Putative plasmid prophages of *Bacillus cereus sensu lato* may hold the key to undiscovered phage diversity / E. G. Pilgrimova, O. A. Kazantseva, A. N. Kazantsev [и др.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Т. 11. – № 1. – С. 7611.

280. Rambaut, A. FigTree. Tree figure drawing tool / A. Rambaut. – Текст : электронный. – 2009. – URL: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (дата обращения: 30.06.2019).

281. Ramirez, M. A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae* / M. Ramirez, E. Severina, A. Tomasz // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – Т. 181. – № 12. – С. 3618-3625.

282. Rao, V. B. Mechanisms of DNA packaging by large double-stranded DNA viruses / V.

- B. Rao, M. Feiss // *Annual Review of Virology*. – 2015. – Т. 2. – № 1. – С. 351-78.
283. Rapid detection of *Bacillus anthracis* in complex food matrices using phage-mediated bioluminescence / N. J. Sharp, J. P. Vandamm, I. J. Molineux, D. A. Schofield // *Journal of Food Protection*. – 2015. – Т. 78. – № 5. – С. 963-968.
284. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes / T. Brettin, J. J. Davis, T. Disz [и др.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Т. 5. – № 1. – С. 1-6.
285. Recombination and modular exchange in the genesis of new lambdoid phages / J. Baker, R. Limberger, S. J. Schneider, A. Campbell // *New Biologist*. – 1991. – Т. 3. – № 3. – С. 297-308.
286. Reeve, J. N. Lambda encodes an outer membrane protein: the *lom* gene / J. N. Reeve, J. E. Shaw // *Molecular and General Genetics MGG*. – 1979. – Т. 172. – № 3. – С. 243-248.
287. Revenge of the phages: defeating bacterial defences / J. E. Samson, A. H. Magadán, M. Sabri, S. Moineau // *Nature Reviews Microbiology*. – 2013. – Т. 11. – № 10. – С. 675-687.
288. Ribosylnicotinamide kinase domain of NadR protein: Identification and implications in NAD biosynthesis / O. V. Kurnasov, B. M. Polanuyev, S. Ananta [и др.] // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – Т. 184. – № 24. – С. 6906-6917.
289. Ripp, S. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment / S. Ripp, R. V. Miller // *Microbiology*. – 1997. – Т. 143. – № 6. – С. 2065-2070.
290. Role of *acpA* and *acpB* in *Bacillus anthracis* capsule accumulation and toxin independent pathogenicity in rabbits / A. Sittner, E. Bar-David, I. Glinert [и др.] // *Microbial Pathogenesis*. – 2021. – Т. 155. – С. 104904.
291. Russell, D. A. Sequencing, assembling, and finishing complete bacteriophage genomes / D. A. Russell // *Methods in Molecular Biology* / ред. М. Clokie [и др.]. – Humana Press, 2018. – С. 109–125.
292. Safa, A. Cholera toxin phage: structural and functional diversity between *Vibrio cholerae* biotypes / A. Safa, J. S. Jime, F. Shahel // *AIMS Microbiology*. – 2020. – Т. 6. – № 2. – С. 144.
293. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Molecular biology and evolution*. – 1987. – Т. 4. – № 4. – С. 406-425.
294. Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual* / J. Sambrook, D. W. Russell. – 3. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 2344 с.
295. Schofield, D. Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens / D. Schofield, N. J. Sharp, C. Westwater // *Bacteriophage*. – 2012. – Т. 2. – № 2. – С. 105-283.
296. Schuch, R. Detailed genomic analysis of the W $\beta$  and  $\gamma$  phages infecting *Bacillus*

*anthracis*: implications for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance / R. Schuch, V. A. Fischetti // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – Т. 188. – № 8. – С. 3037-3051.

297. Scrutinizing virus genome termini by high-throughput sequencing / S. Li, H. Fan, X. An [и др.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Т. 9. – № 1. – С. e85806.

298. Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in *Bacillus subtilis* / J. L. Ptacin, M. Nollmann, E. C. Becker [и др.] // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2008. – Т. 15. – № 5. – С. 485-493.

299. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes / R. T. Okinaka, K. Cloud, O. Hampton [и др.] // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – Т. 181. – № 20. – С. 6509-6515.

300. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product? / G. Plunkett, D. J. Rose, T. J. Durfee, F. R. Blattner // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – Т. 181. – № 6. – С. 1767-1778.

301. Shan, X. Mutation-induced infections of phage-plasmids / X. Shan, R. E. Szabo, O. X. Cordero // *Nature Communications*. – 2023. – Т. 14. – № 1. – С. 2049.

302. Shapiro, J. A. Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements / J. A. Shapiro // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1979. – Т. 76. – № 4. – С. 1933-1937.

303. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea / A. D. O'Brien, J. W. Newland, S. F. Miller [и др.] // *Science*. – 1984. – Т. 226. – № 4675. – С. 694-696.

304. Shkoporov, A. N. Bacteriophages of the human gut: the «known unknown» of the microbiome / A. N. Shkoporov, C. Hill // *Cell Host and Microbe*. – 2019. – Т. 25. – № 2. – С. 195-209.

305. Silver-Mysliwiec, T. H. Bacteriophage-enhanced sporulation: comparison of spore-converting bacteriophages PMB12 and SP10 / T. H. Silver-Mysliwiec, M. G. Bramucci // *Journal of Bacteriology*. – 1990. – Т. 172. – № 4. – С. 1948-1953.

306. Söding, J. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction / J. Söding, A. Biegert, A. N. Lupas // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Т. 33. – № suppl\_2. – С. W244-W248.

307. Software-based analysis of bacteriophage genomes, physical ends, and packaging strategies / B. D. Merrill, A. T. Ward, J. H. Grose, S. Hope // *BMC Genomics*. – 2016. – Т. 17. – № 1. – С. 679.

308. Soil viruses are underexplored players in ecosystem carbon processing / G. Trubl, H. Bin Jang, S. Roux [и др.] // *mSystems*. – 2018. – Т. 3. – № 5. – С. e00076-18.

309. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing

/ A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov [и др.] // *Journal of Computational Biology*. – 2012. – Т. 19. – № 5. – С. 455-477.

310. Srikant, S. The evolution of a counter-defense mechanism in a virus constrains its host range / S. Srikant, C. K. Guegler, M. T. Laub // *eLife*. – 2022. – Т. 11. – С. e79549.

311. Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism / G. Ram, J. Chen, K. Kumar [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Т. 109. – № 40. – С. 16300-16305.

312. Stenfors Arnesen, L. P. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins / L. P. Stenfors Arnesen, A. Fagerlund, P. E. Granum // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2008. – Т. 32. – № 4. – С. 579-606.

313. Sternbach, G. The history of anthrax / G. Sternbach // *Journal of Emergency Medicine*. – 2003. – Т. 24. – № 4. – С. 463-467.

314. Sternberg, N. Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at lox sites / N. Sternberg // *Journal of Molecular Biology*. – 1981. – Т. 150. – № 4. – С. 603-608.

315. Strategies for editing virulent *Staphylococcal* phages using CRISPR-Cas10 / S. M. N. Bari, F. C. Walker, K. Cater [и др.] // *ACS Synthetic Biology*. – 2017. – Т. 6. – № 12. – С. 2316-2325.

316. Streisinger, G. Properties of bacteriophages T2 and T4 with unusual inheritance / G. Streisinger, J. Weigle // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1956. – Т. 42. – № 8. – С. 504-510.

317. Structure of bacteriophage T4 fibrin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain / Y. Tao, S. V. Strelkov, V. V. Mesyanzhinov, M. G. Rossmann // *Structure*. – 1997. – Т. 5. – № 6. – С. 789-798.

318. Structure of HK97 small terminase: DNA complex unveils a novel DNA binding mechanism by a circular protein / M. Chechik, S. J. Greive, A. A. Antson, H. T. Jenkins // *bioRxiv [Preprint]* doi: 10.1101/2023.07.17.549218. – 2023.

319. Structure of the bacteriophage lambda cohesive end site: location of the sites of terminase binding (cosB) and nicking (cosN) / M. Feiss, W. Widner, G. Miller [и др.] // *Gene*. – 1983. – Т. 24. – № 2-3. – С. 207-218.

320. Studying of preventive and medical effectiveness of bacteriophages' preparation at mastitis of cows in the conditions of lactic and commodity farm / N. V. Pimenov, E. A. Glazunov, L. F. Sotnikova [и др.] // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. – 2016. – Т. 5. – № 53. – С. 83-89.

321. Suttle, C. A. Marine viruses – major players in the global ecosystem / C. A. Suttle // *Nature Reviews Microbiology*. – 2007. – Т. 5. – № 10. – С. 801-812.

322. Swift, M. L. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing / M. L. Swift // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 1997. – Т. 37. – № 2. – С. 411-412.
323. T4-like phages reveal the potential role of viruses in soil organic matter mineralization / X. Wei, T. Ge, C. Wu [и др.] // *Environmental Science and Technology*. – 2021. – Т. 55. – № 9. – С. 6440-6448.
324. Temperate phages acquire DNA from defective prophages by relaxed homologous recombination: the role of Rad52-like recombinases / M. De Paere, G. Hutinet, O. Son [и др.] // *PLoS Genetics*. – 2014. – Т. 10. – № 3. – С. e1004181.
325. The *Bacillus cereus* Food Infection as Multifactorial Process. Vol. 12 / N. Jessberger, R. Dietrich, P. E. Granum, E. Märklbauer. – 2020.
326. The bacteriophage decides own tracks: when they are with or against the bacteria / S. Makky, A. Dawoud, A. Safwat [и др.] // *Current Research in Microbial Sciences*. – 2021. – Т. 2. – С. 100050.
327. The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein / N. Cumby, A. M. Edwards, A. R. Davidson, K. L. Maxwell // *Journal of Bacteriology*. – 2012. – Т. 194. – № 18. – С. 5012-5019.
328. The Bacteriophage Pf-10 – a component of the biopesticide «Multiphage» used to control agricultural crop diseases caused by *Pseudomonas syringae* / O. A. Kazantseva, R. M. Buzikov, T. A. Pilipchuk [и др.] // *Viruses*. – 2022. – Т. 14. – № 1. – С. 42.
329. The bacteriophage  $\phi$ 29 portal motor can package DNA against a large internal force / D. E. Smith, S. J. Tans, S. B. Smith [и др.] // *Nature*. – 2001. – Т. 413. – № 6857. – С. 748-752.
330. The complete nucleotide sequence and functional organization of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 / J. C. Alonso, G. Lüder, A. C. Stiege [и др.] // *Gene*. – 1997. – Т. 204. – № 1-2. – С. 201-212.
331. The diverse impacts of phage morons on bacterial fitness and virulence / V. L. Taylor, A. D. Fitzpatrick, Z. Islam, K. L. Maxwell // *Advances in Virus Research*. – 2019. – Т. 103. – С. 1-31.
332. The DNA site utilized by bacteriophage P22 for initiation of DNA packaging / H. Wu, L. Sampson, R. Parr, S. Casjens // *Molecular Microbiology*. – 2002. – Т. 45. – № 6. – С. 1631-1646.
333. The FtsK  $\gamma$  domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS / V. Sivanathan, M. D. Allen, C. De Bekker [и др.] // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2006. – Т. 13. – № 11. – С. 965-972.
334. The genome of *Bacillus subtilis* Bacteriophage SPO1 / C. R. Stewart, S. R. Casjens, S. G. Cresawn [и др.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2009. – Т. 388. – № 1. – С. 48-70.
335. The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny / Y. Sakaguchi, T. Hayashi, K. Kurokawa [и др.] //

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – Т. 102. – № 48. – С. 17472-17477.

336. The genomes, proteomes, and structures of three novel phages that infect the *Bacillus cereus* group and carry putative virulence factors / J. H. Grose, D. M. Belnap, J. D. Jensen [и др.] // Journal of Virology. – 2014. – Т. 88. – № 20. – С. 11846-11860.

337. The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife / C. J. Carlson, I. T. Kracalik, N. Ross [и др.] // Nature Microbiology. – 2019. – Т. 4. – № 8. – С. 1337-1343.

338. The human gut phageome: origins and roles in the human gut microbiome / E. M. Townsend, L. Kelly, G. Muscatt [и др.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2021. – Т. 11. – С. 643214.

339. The human skin double-stranded DNA virome: topographical and temporal diversity, genetic enrichment, and dynamic associations with the host microbiome / G. D. Hannigan, J. S. Meisel, A. S. Tyldsley [и др.] // mBio. – 2015. – Т. 6. – № 5. – С. e01578-15.

340. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis* / T. Mignot, M. Mock, D. Robichon [и др.] // Molecular Microbiology. – 2001. – Т. 42. – № 5. – С. 1189-1198.

341. The *ltp* gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis* / X. Sun, A. Göhler, K. J. Heller, H. Neve // Virology. – 2006. – Т. 350. – № 1. – С. 146-157.

342. Therapeutic potential of *Bacillus* phage lysin PlyB in ocular infections / M. H. Mursalin, R. Astley, P. S. Coburn [и др.] // mSphere. – 2023. – Т. 8. – № 4. – С. e00044-23.

343. Thierauf, A. Generalized transduction / A. Thierauf, G. Perez, A. S. Maloy // Bacteriophages: methods and protocols / ред. А. М. Clokie, М. R., Kropinski. – Humana Press, 2009. – Т. 501. – С. 267-286.

344. Thousands of previously unknown phages discovered in whole-community human gut metagenomes / S. Benler, N. Yutin, D. Antipov [и др.] // Microbiome. – 2021. – Т. 9. – № 1. – С. 78.

345. Three *Prochlorococcus cyanophage* genomes: signature features and ecological interpretations / M. B. Sullivan, M. L. Coleman, P. Weigle [и др.] // PLoS Biology. – 2005. – Т. 3. – № 5. – С. e144.

346. Touchon, M. Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria / M. Touchon, A. Bernheim, E. P. C. Rocha // ISME Journal. – 2016. – Т. 10. – № 11. – С. 2744-2754.

347. Turner, D. A roadmap for genome-based phage taxonomy / D. Turner, A. M. Kropinski, E. M. Adriaenssens // Viruses. – 2021. – Т. 13. – № 3. – С. 506.

348. Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12 / G. Blakely, G. May, R. McCulloch [и др.] // *Cell*. – 1993. – Т. 75. – № 2. – С. 351-361.
349. Tye, B. K. Non-random circular permutation of phage P22 DNA / B. K. Tye, J. A. Huberman, D. Botstein // *Journal of Molecular Biology*. – 1974. – Т. 85. – № 4. – С. 501-528.
350. Vaca Pacheco, S. The *lom* gene of bacteriophage  $\lambda$  is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal epithelial cells / S. Vaca Pacheco, O. García González, G. L. Paniagua Contreras // *FEMS Microbiology Letters*. – 1997. – Т. 156. – № 1. – С. 129-132.
351. Vincent, T. L. LOGICOIL – multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state / T. L. Vincent, P. J. Green, D. N. Woolfson // *Bioinformatics*. – 2013. – Т. 29. – № 1. – С. 69-76.
352. Vincze, T. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes / T. Vincze, J. Posfai, R. J. Roberts // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Т. 31. – № 13. – С. 3688-3691.
353. ViPTree: the viral proteomic tree server / Y. Nishimura, T. Yoshida, M. Kuronishi [и др.] // *Bioinformatics*. – 2017. – Т. 33. – № 15. – С. 2379-2380.
354. Wagner, P. L. Bacteriophage control of bacterial virulence / P. L. Wagner, M. K. Waldor // *Infection and Immunity*. – 2002. – Т. 70. – № 8. – С. 3985-3993.
355. Wang, X. «Muprints» of the *lac* operon demonstrate physiological control over the randomness of *in vivo* transposition / X. Wang, N. P. Higgins // *Molecular Microbiology*. – 1994. – Т. 12. – № 4. – С. 665-677.
356. Weigel, C. Bacteriophage replication modules / C. Weigel, H. Seitz // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2006. – Т. 30. – № 3. – С. 321-381.
357. Weinbauer, M. G. Ecology of prokaryotic viruses / M. G. Weinbauer // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2004. – Т. 28. – № 2. – С. 127-181.
358. Wommack, K. E. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems / K. E. Wommack, R. R. Colwell // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2000. – Т. 64. – № 1. – С. 69-114.
359. Woolfson, D. N. Understanding a protein fold: the physics, chemistry, and biology of  $\alpha$ -helical coiled coils / D. N. Woolfson // *Journal of Biological Chemistry*. – 2023. – Т. 299. – № 4. – С. 104579.
360. Yasbin, R. E. Transduction in *Bacillus subtilis* by bacteriophage SPP1 / R. E. Yasbin, F. E. Young // *Journal of Virology*. – 1974. – Т. 14. – № 6. – С. 1343-1348.
361. Zhang, X. Genome analysis of deep-sea thermophilic phage D6E / X. Zhang, Y. Wang // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – Т. 76. – № 23. – С. 7861-7866.
362. Zhang, X. Analyzing genome termini of bacteriophage through high-throughput sequencing / X. Zhang, Y. Wang, Y. Tong // *Bacteriophages: methods and protocols* / ред. R. Clokie, M., Kropinski, A., Lavigne. – Humana Press, 2018. – С. 139-163.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

**Таблица III.** Перечень больших субъединиц терминаз исследуемых фагов и бактериофагов, у которых известна стратегия упаковки ДНК, используемых для построения протеомного древа Рис. 9 в тексте диссертации. Исследуемые фаги Sam46, Kirov и B13 выделены светло-серым цветом.

Тип концов геномов и механизм упаковки		Бактериофаг	Большая субъединица терминазы, Number GenBank
<b>Точные прямые терминальные повторы</b>	Короткие DTRs (T7)	<i>Pseudomonas</i> phage Pf-10	YP_009145642
		<i>Enterobacteria</i> phage T7	QRE00040
		<i>Enterobacteria</i> phage T3	YP_009792972
		<i>Yersinia</i> phage phiYeO3-12	NP_052122
		<i>Pseudomonas</i> phage phi15	YP_004286227
		<i>Pseudomonas</i> phage PFP1	YP_009804025
	Короткие DTRs (N4)	<i>Escherichia</i> phage N4	YP_950546
		<i>Achromobacter</i> phage JWDelta	AHC56597
		<i>Erwinia</i> phage vB_EamP-S6	YP_007005834
	Короткие DTRs (c-st)	<i>Clostridium</i> phage c-st	YP_398598
		<i>Bacillus</i> phage Izhevsk	QIW89903
		<i>Bacillus</i> phage vB_BanS-Tsamsa	AGI11737
		<i>Bacillus</i> phage Basilisk	AGR46580
		<i>Bacillus</i> phage PBC2	YP_010679401
	Короткие DTRs (Kirov)	<b><i>Bacillus</i> phage Kirov</b>	YP_010679460
	Длинные DTRs (SPO1)	<i>Bacillus</i> virus SPO1	YP_002300330
		<i>Listeria</i> phage A511	YP_001468454

	Длинные DTRs (T5)	<i>Brochothrix</i> phage A9	YP_004301396
		<i>Enterobacteria</i> phage T5	YP_006983
		<i>Salmonella</i> virus SPC35	YP_004306624
		<i>Providencia</i> phage vB_PreS_PR1	YP_009599184
Жогезивные концы	5' COS (lambda)	Bacteriophage N15	NP_046897
		<i>Enterobacteria</i> phage lambda	NP_040581
	5' COS (P2)	<i>Escherichia</i> virus P2	NP_046758
		<i>Escherichia</i> virus 186	NP_052251
		<i>Pseudomonas</i> phage phiCTX	NP_490600
	3' COS (HK97)	<i>Escherichia</i> virus HK97	NP_037698
		<i>Escherichia</i> virus HK022	NP_037663
		<i>Rhizobium</i> phage 16-3	YP_002117560
		<b><i>Bacillus</i> phage B13</b>	UUW40188
	ДНК хозяина на концах	Host ends (Mu)	<i>Escherichia</i> virus Mu
<i>Pseudomonas</i> phage B3			YP_164067
<i>Burkholderia</i> virus BcepMu			YP_024701
Host ends (D3112)		<i>Pseudomonas</i> virus MP22	YP_001469154
		<i>Haemophilus</i> phage SuMu	YP_007002934
		<i>Pseudomonas</i> virus D3112	NP_938233
Циклически пермутированные прямые терминальные повторы	Headful (P22)	<i>Salmonella</i> virus P22	YP_063734
		<i>Salmonella</i> phage ST64T	NP_720326
		<i>Enterobacteria</i> phage LP7	AAA88220
	Headful (Sf6)	<i>Shigella</i> phage Sf6	NP_958178
		<i>Hamiltonella</i> virus APSE1	NP_050979

		<i>Enterobacteria</i> phage CUS-3	ABQ88401
Headful (933W)		<i>Enterobacteria</i> phage 933W	NP_049511
		<i>Burkholderia</i> virus Bcep22	NP_944278
Headful (phiKZ)		<i>Pseudomonas</i> phage phiKZ	NP_803591
		<i>Pseudomonas</i> phage 201phi2-1	YP_001956731
		<i>Erwinia</i> phage phiEaH2	YP_007237828
Headful (T4)		<i>Enterobacteria</i> phage T4	NP_049776
		<i>Vibrio</i> phage KVP40	NP_899601
		<i>Enterobacteria</i> phage RB49	NP_891724
Headful (phiPLPE)		<i>Yersinia</i> phage PY100	CAJ28416
		<i>Klebsiella</i> phage JD001	YP_007392855
		<i>Iodobacterterriophage</i> phiPLPE	YP_002128452
Headful (SPP1)		<b><i>Bacillus</i> phage vB_BcM_Sam46</b>	QIQ61203
		<i>Bacillus</i> phage SPP1	NP_690654
		<i>Staphylococcus</i> virus CNPH82	YP_950600
Headful (B83)		<i>Bacillus</i> Phage vB_BtS_B83	QCQ57785
		<i>Bacillus</i> phage vB_BtS_BMBtp14	YP_009830709
<b>Ковалентный концевой белок (phi29)</b>	Белковый механизм	<i>Bacillus</i> phage phi29	YP_002004545
		<i>Bacillus</i> phage Nf	YP_009910733

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

**Таблица П2.** Список праймеров, использованных для определения упаковки ДНК исследуемых бактериофагов (Sam46, Kirov и B13) в методе RAGE. Выделенные праймеры (полу жирный шрифт) использовали в реакциях секвенирования по Сэнгеру.

Бактериофаг	Цель	Наименование праймера	Последовательность праймера (5'-3')	№PCR	Матрица
Sam46	определение рас-фрагмента при рестрикции HindIII или XbaI	Sam_rev2	ААСТААТTCGTCGCTGCTCATA	1-ая ПЦР	Экстрагированный фрагмент ДНК после обработки терминальной трансферазой
		AncherdT16V	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV		
		<b>Sam_rev1</b>	<b>СТСААТТGCTGCCGCTGTG</b>	2-ая ПЦР	
		Ancher	GACCACGCGTATCGATGTCGAC		
Kirov	определение левого конца генома Kirov	kir1_end3_L_rev	ТТАТGCTGTCTАТТGAGAGGАТТА	1-ая ПЦР	Геномная ДНК фага Kirov после обработки терминальной трансферазой
		AncherdT16V	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV		
		<b>kir1_end2_L_rev</b>	<b>СТGAGTGGTCGGGTGTAG</b>	2-ая ПЦР	
		Ancher	GACCACGCGTATCGATGTCGAC		
	определение правого конца генома Kirov	kir1_end4_R_for	ССАААТGGTATGAGTTGGGTТА	1-ая ПЦР	Геномная ДНК фага Kirov после обработки терминальной трансферазой
		AncherdT16V	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV		
		<b>kir1_end5_R_for</b>	<b>TGGTGTТТАТТGCGGTGTТА</b>	2-ая ПЦР	
		Ancher	GACCACGCGTATCGATGTCGAC		

B13	определение 3'- последовательности левого конца генома B13	AncherdT16V	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV	аПЦР	Геномная ДНК фага B13 после обработки терминальной трансферазой
		AncherdT16V	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV	1-ая ПЦР	Продукт после аПЦР
		B13_rev1	TCCGTTTTGGTATTGTTCCG		
		Anch	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	2-ая ПЦР	Продукт после 1- ой ПЦР
		<b>B13_rev2</b>	<b>GACAGCCATAAAAAGCAGCGT</b>		
	определение 3'- последовательности правого конца генома B13	AncherdT16V	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV	аПЦР	Геномная ДНК фага B13 после обработки терминальной трансферазой
		AncherdT16V	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTV	1-ая ПЦР	Продукт после аПЦР
		B13_for1	ACATGTGATGTAGAGCGGGT		
		Ancher	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	2-ая ПЦР	Продукт после 1- ой ПЦР
		<b>B13_for2</b>	<b>TTGATACCAAGGAАCTAGATGGACA</b>		

**Таблица ПЗ.** Список пар праймеров для проверки эффективности праймеров, применяемых в методе RAGE

<b>Бактериофаг</b>	<b>Наименование праймера</b>	<b>Последовательность праймера (5'-3')</b>	<b>Проверка праймеров для RAGE</b>
Sam46	Sam_for	TCATCCACCAGTAGCAGACATTG	Sam_rev1 и Sam_rev2
Kirov	kir1_end1_L_for	AATGTTTGAGTGATTCATACATGC	kir1_end3_L_rev и kir1_end2_L_rev
	kir1_end6_R_rer	GTTATGAAATTTGCGGGATTTGG	kir1_end4_R_for и kir1_end5_R_for
B13	B13-for	TGGTCATGGGAGGAGTGAAA	B13_rev1 и B13_rev2
	B13-rev	TTTTGTTCCTGATTCTTTTCTGCT	B13_for1 и B13_for2

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица П4. Геномы бактериофагов, используемые для филогенетического анализа фага *Samaravirus samarense* Sam46.

№	Название	Genome Accession number	Длина генома	GC-состав, %	SDCs	Число tRNAs/tmRNAs	BLASTn «nucleotide identity» с фагом Sam46, %*	Количество общих белков с фагом Sam46**	
								число	%
1	<i>Bacillus</i> phage vB_BcM_Sam46 (T)	MN604698	45419	41.7	77	0/0	-	-	-
2	<i>Bacillus</i> phage SPP1	NC_004166	44010	43.7	77	0	3.9	16	20.8
3	<i>Geobacillus</i> phage GBK2	NC_023612	39078	43.1	61	0	3.2	10	16.4
4	Deep-sea thermophilic phage D6E	NC_019544	49335	46.0	90	0	0.6	20	22.2
5	<i>Geobacillus</i> virus E2	NC_009552	40863	44.8	66	0	0	4	6.1
6	<i>Bacillus</i> phage 1	NC_009737	35055	44.8	53	0	0	4	7.5
7	<i>Geobacillus</i> phage GBSV1	NC_008376	34683	44.4	55	0	0	4	7.3
8	<i>Thermus</i> phage phi OH2	NC_021784	38099	44.7	63	0	1.3	6	9.5
9	Bacteriophage Lily	NC_028841	44952	42.7	73	0	0	2	2.7
10	<i>Paenibacillus</i> phage Vegas	NC_028767	45653	43.6	75	0	0	0	-
11	<i>Paenibacillus</i> phage Tripp	NC_028930	54439	48.3	90	0	0	1	1.1
12	<i>Bacillus</i> phage Eoghan	NC_020477	49458	42.2	79	0	0	3	4.0
13	<i>Bacillus</i> phage Taylor	NC_041858	49492	42.3	81	0	0	3	3.7
14	<i>Bacillus</i> phage Blastoid	NC_022773	50354	42.2	83	0	0	3	3.6
15	<i>Bacillus</i> phage Finn	NC_020480	50161	41.7	83	0	0	3	3.6
16	<i>Bacillus</i> phage Riggi	NC_022765	49836	41.5	82	0	0	3	3.5

17	<i>Bacillus</i> phage Gemini	KC330681	49362	41.9	80	0	0	3	3.8
18	<i>Bacillus</i> phage Andromeda	NC_020478	49259	41.9	80	0	0	3	3.8
19	<i>Bacillus</i> phage Glittering	NC_022766	49246	42.1	83	0	0	3	3.6
20	<i>Bacillus</i> phage Curly	NC_020479	49425	41.8	81	0	0	3	3.7
21	<i>Bacillus</i> phage PM1	NC_020883	50861	41.3	92	0	0	4	4.3

\*Определено с использованием BLASTn анализа для Sam46 (умножение «% coverage» на «% identity»); \*\*Определено с помощью GET\_HOMOLOGUES (алгоритм COGtriangles, -G -t 0 -C 75).

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблица П5. Бактериофаги, используемые для филогенетического анализа фага *Kirovirus kirovense* Киров.

№	Название	Genome Accession number	Длина генома	GC- состав, %	SDCs	Число tRNAs/tmRNAs	BLASTn «nucleotide identity» с фагом Киров, %*	Количество общих белков с фагом Киров**	
								число	%
1	<i>Bacillus</i> phage Киров	NC_071041	165383	35.5	275	5/0	-	-	
2	<i>Bacillus</i> phage PBC2	NC_071040	168689	34.4	259	17/0	60.3	154	57.68
3	<i>Bacillus</i> phage Izhevsk	NC_071045	168638	34.3	259	18/0	45.2	138	51.69
4	<i>Bacillus</i> phage Diildio	-	171148	34.3	267	18/0	47.6	138	50.92
5	<i>Bacillus</i> phage vB_BanS-Tsamsa	NC_023007	168876	34.3	267	19/0	45.8	137	50.55
6	<i>Bacillus</i> phage vB_BanS_MrDarsey	NC_071047	164998	34.2	245	17/0	42.4	134	51.54
7	<i>Bacillus</i> phage vB_BanS_Chewbecca	NC_071048	161151	34.3	237	20/0	41.5	130	50.78
8	<i>Bacillus</i> phage vB_BanS_Nate	NC_071044	166879	33.6	264	16/0	39.2	131	48.60
9	<i>Bacillus</i> phage vB_BanS_Sophrta	NC_071042	167995	32.4	259	4/0	37.2	118	44.20
10	<i>Bacillus</i> phage pW2	NC_071043	160627	32.5	254	4/0	36.5	120	45.40
11	<i>Bacillus</i> phage vB_BcoS-136	NC_071049	160590	32.2	241	18/0	26.9	97	37.60
12	<i>Bacillus</i> phage vB_BsuS_PJN02	NC_071050	165868	33.6	230	13/0	23.9	84	33.27
13	<i>Geobacillus</i> virus E3	NC_029073	141298	29.6	224	0/0	13.3	32	12.83

14	<i>Bacillus</i> phage TsarBomba	NC_028890	162486	40.1	248	19/0	7.9	15	5.74
15	<i>Bacillus</i> phage BCU4	NC_047735	154371	39.9	225	19/0	7.6	14	5.60
16	<i>Bacillus</i> phage BCPST	NC_070845	81528	33.9	132	2/0	6.6	12	5.90
17	<i>Bacillus</i> phage PBC4	NC_070843	80647	34.0	126	2/0	6.6	12	6.00
18	<i>Bacillus</i> phage pW4	NC_070844	80919	34.0	133	2/0	6.6	12	5.88
19	<i>Bacillus</i> phage Basilisk	NC_070841	82008	33.9	123	3/0	6.6	13	6.53
20	<i>Bacillus</i> phage v_B-Bak10	NC_070842	82931	33.8	127	2/0	6.6	13	6.47
21	<i>Bacillus</i> phage Slash	NC_022774	80382	35.2	111	0/0	0	6	3.11
22	<i>Bacillus</i> phage Staley	NC_022767	81656	35.4	113	0/0	0	6	3.10
23	<i>Bacillus</i> phage Stahl	NC_028856	80148	35.3	108	0/0	0	6	3.13
24	<i>Bacillus</i> phage Stills	NC_028777	80798	35.5	107	0/0	0	6	3.14
25	<i>Bacillus</i> phage Troll	NC_022088	163019	37.8	289	0/0	0	14	4.96
26	<i>Bacillus</i> phage BigBertha	NC_022769	165238	37.8	288	0/0	0	13	4.62
27	<i>Bacillus</i> phage Bastille	NC_018856	153962	38.1	271	7/0	0	11	4.03
28	<i>Bacillus</i> phage Evoli	NC_024207	159656	38.1	287	7/0	0	11	3.92
29	<i>Bacillus</i> phage Spock	NC_022763	164297	37.6	281	0/0	0	14	5.04
30	<i>Bacillus</i> phage B4	NC_018863	162596	37.7	285	0/0	0	13	4.64

\*Определено с использованием BLASTn анализа для Kirov (умножение «% coverage» на «% identity»); \*\*Определено с помощью GET\_HOMOLOGUES (алгоритм COGtriangles, -G -t 0 -C 75). Дополнительный фаговый геном Diildio (отсутствующий в базе VipTree), загружен из базы данных *Bacillus*-инфицирующих фагов (<http://bacillus.phagesdb.org/>), используя полногеномную последовательность фага Kirov в качестве последовательности запроса; фаг Diildio выделен светло-серым цветом.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Таблица П6. Бактериофаги, используемые для филогенетического анализа фага *Bunatrivirus bunatris* B13.

№	Название	Genome Accession number	Длина генома	GC- состав, %	SDCs	Число tRNAs/tmRNAs	BLASTn «nucleotide identity» с фагом B13, %*	Количество общих белков с фагом B13**	
								число	%
1	<i>Bacillus</i> phage B13	OP066531	36864	34.8	53	0/0	-	-	-
2	<i>Bacillus</i> phage BMBtp1	KT852578.1	35838	34.9	58	0/0	27.73	26	46.85
3	Uncultured <i>Caudovirales</i> phage clone 9AX_2, partial genome	MF417893.1	43032	34.7	61	0/0	29.20	22	38.60
4	<i>Bacillus</i> phage phi4J1	NC_029008.1	41486	35.9	64	0/0	31.28	22	37.60
5	<i>Bacillus</i> phage vB_BanS_Athena	OK500002.1	37369	35.3	62	0/0	21.54	16	27.83
6	<i>Bacillus</i> phage Waukesha92	NC_025424.1	45648	35.5	71	0/0	12.60	13	20.97
7	<i>Bacillus</i> phage phiS58	KT970646.1	46635	35.4	70	0/0	12.60	13	21.14
8	<i>Bacillus</i> phage vB_BthS-TP21T	MK843319.1	51949	35.5	82	0/0	12.60	13	19.26
9	<i>Bacillus</i> phage vB_BtS_BMBtp3	NC_028748.2	51366	35.4	72	0/0	9.12	10	16.00
10	<i>Bacillus anthracis</i> phage Cherry	DQ222851.1	36615	35.3	53	0/0	8.48	9	17.00
11	<i>Bacillus</i> phage Gamma	NC_007458.1	37253	35.2	55	0/0	8.49	9	16.70
12	<i>Bacillus anthracis</i> phage Gamma isolate d'Herelle	DQ289556.1	37373	35.1	56	0/0	7.85	9	16.50
13	<i>Bacillus</i> phage AP631	MK085976.1	39549	35.0	56	0/0	7.78	9	16.50
14	<i>Bacillus</i> phage WBeta	NC_007734.1	40867	35.3	57	0/0	7.84	9	16.36
15	<i>Bacillus</i> phage phi4B1	NC_028886.1	38663	35.9	64	0/0	15.31	9	15.38
16	<i>Bacillus</i> phage Fah	NC_007814.1	37974	34.9	54	0/0	7.79	8	14.95
17	<i>Bacillus</i> phage phiS3501	NC_019502.1	44401	34.9	69	1/0	11.15	7	11.48
18	<i>Bacillus</i> phage phiCM3	NC_023599.1	38772	35.5	56	0/0	9.60	6	11.01

19	<i>Bacillus</i> phage BtCS33	NC_018085.1	41992	35.2	59	0/0	7.57	6	10.71
20	<i>Bacillus</i> phage BceA1	NC_048628.1	42932	35.7	63	0/0	9.10	6	10.35
21	<i>Staphylococcus</i> phage SpaA1	NC_018277.1	42784	35.6	65	0/0	9.10	6	10.17
22	<i>Bacillus</i> phage PfEFR-5	NC_031055.1	43773	35.	68	0/0	7.81	6	9.92
23	<i>Bacillus</i> phage PfEFR-4	NC_048641.1	43223	35.4	69	0/0	7.81	6	9.84
24	<i>Bacillus</i> phage vB_BceS-MY192	NC_048633.1	44696	35.0	66	0/0	7.10	5	8.40
25	<i>Bacillus</i> phage vB_BtS_B83	NC_048762.1	49952	35.8	71	0/0	8.49	4	6.45
26	<i>Bacillus</i> phage vB_BtS_BMBtp14	NC_048640.1	50740	36.8	77	0/0	3.41	4	6.15
27	<i>Bacillus</i> phage TP21-L	NC_011645.1	37456	37.	61	0/0	2.97	3	5.26
28	<i>Bacillus</i> phage vB_BtS_BMBtp2	NC_019912.1	36932	37.8	55	0/0	2.72	2	
29	<i>Bacillus</i> phage phBC6A51	NC_004820.1	61395	37.7	94	0/0	5.56	0	
30	<i>Bacillus</i> phage vB_BboS-125	NC_048735.1	58528	48.6	87	0/0	0.00	0	

\*Определено с использованием BLASTn анализа для B13 (умножение «% coverage» на «% identity»); \*\*Определено с помощью GET\_HOMOLOGUES (алгоритм COGtriangles, -G -t 0 -C 75). Дополнительные шесть фаговых геномов (отсутствующих в базе VipTree), обнаруженные с помощью поиска BLASTn с использованием всей последовательности генома B13 в качестве запроса, выделены светло-серым цветом.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

**Таблица П7.** Спектр чувствительных штаммов бактерий рода *Bacillus* для исследуемых бактериофагов: *Samaravirus samarense* Sam46 (штаммы Sam46-T и Sam46-C), *Kirovirus kirovense* Kirov (штамм Kirov) и *Bunatrivirus bunatris* B13 (штамм B13).

T\* (turbid) и C\*\* (clear) – очищенные фаговые препараты Sam46-T и Sam46-C, продуцирующие только один тип бляшек на газоне *B. cereus* ВКМ В-370: прозрачные бляшки или мутные бляшки, соответственно. Специальные символы для диапазона чувствительных штаммов: «+» – штаммы, которые исследуемые фаги инфицировали; «-» – штаммы, которые были устойчивы к фаговой инфекции.

№	Вид	Штамм	Источник*	Sam46-T*	Sam46-C**	Kirov	B13
1	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-13	ВКМ	+	+	+	-
2	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-15	ВКМ	-	-	-	+
3	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-370	ВКМ	+	+	+	+
4	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-373	ВКМ	+	+	+	+
5	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-374	ВКМ	-	-	-	+
6	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-383	ВКМ	+	+	+	-
7	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-445	ВКМ	-	-	-	+
8	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-473	ВКМ	+	+	-	+
9	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-491	ВКМ	+	+	+	+
10	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-504 <sup>T</sup>	ВКМ	-	-	+	+
11	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-681	ВКМ	+	+	-	+
12	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-682	ВКМ	-	-	-	+
13	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-683	ВКМ	+	+	-	+
14	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-684	ВКМ	-	-	-	+
15	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-686	ВКМ	+	+	-	-

16	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-687	ВКМ	-	-	-	-
17	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-688	ВКМ	+	+	-	+
18	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-771	ВКМ	-	-	-	-
19	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-810	ВКМ	-	-	-	-
20	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-811	ВКМ	-	-	-	-
21	<i>B. cereus</i>	ВКМ В-812	ВКМ	-	-	+	-
22	<i>B. tropicus</i>	АТСС 4342	АТСС	-	-	+	-
			«Бактисубтил» Галеника, Белград, Югославия				
23	<i>B. cereus</i>	АТСС 14893 (IP 5832)	Контр. №47660887 (до VIII 1990)	-	-	+	-
24	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-83	ВКМ	-	-	+	+
25	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-84	ВКМ	-	-	+	+
26	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-85	ВКМ	-	-	+	+
27	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-440	ВКМ	+	+	-	-
28	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-443	ВКМ	-	-	-	-
29	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-446	ВКМ	+	+	-	-
30	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-447	ВКМ	-	-	-	-
31	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-450	ВКМ	+	+	-	+
32	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-453	ВКМ	+	+	-	+
33	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-454	ВКМ	+	+	-	+
34	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-1555	ВКМ	+	+	-	-

35	<i>B. thuringiensis</i>	ВКМ В-1557	ВКМ	+	+	-	-
36	<i>B. thuringiensis</i>	ATCC 35646	Лабораторная коллекция	-	-	-	+
37	<i>B. weihenstephanensis</i>	КВАВ4	Лабораторная коллекция	-	-	-	+
38	<i>B. flexus</i>	V1	Лабораторная коллекция	-	-	-	-

\* Аббревиатура источников штаммов: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов; ATCC – American Type Culture Collection (Коллекция американских типовых культур).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей, опубликованных в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендуемых ВАК для защиты кандидатских диссертаций

† – авторы внесли одинаковый вклад в работу (разделение первого авторства)

1. A genomic analysis of the *Bacillus* bacteriophage *Kirovirus kirovense* Kirov and its ability to preserve milk / **О. А. Kazantseva**<sup>†</sup>, A. V. Skorynina<sup>†</sup>, E. G. Piligrimova [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – № 16. – С. 12584.

2. **Kazantseva, O. A.** vB\_BcM\_Sam46 and vB\_BcM\_Sam112, members of a new bacteriophage genus with unusual small terminase structure / **О. А. Kazantseva**, E. G. Piligrimova, A. M. Shadrin // Scientific Reports. – 2021. – Т. 11. – № 1. – С. 12173.

3. **Kazantseva, O. A.** Novel *Bacillus*-infecting bacteriophage B13 – the founding member of the proposed new genus *Bunatrivirus* / **О. А. Kazantseva**, E. G. Piligrimova, A. M. Shadrin // Viruses. – 2022. – Т. 14. – № 10. – С. 2300.

4. Complete genome sequence of *Bacillus cereus sensu stricto* VKM B-370, isolated from the *Silkworm bombyx mori* / E. G. Piligrimova, R. M. Buzikov, **О. А. Kazantseva**, A. M. Shadrin // Microbiology Resource Announcements. – 2021. – Т. 10. – № 20. – С. e00386-21.

### Список работ, опубликованных в сборниках тезисов конференций и конгрессов

1. **Казанцева, О. А.** Умеренные бактериофаги B13 и B473, инфицирующие представителей группы *Bacillus cereus sensu lato* / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // 4-й Российский микробиологический конгресс (г. Томск, 24 – 29 сентября 2023 г.): материалы конгресса. – Томск, РФ : microbiology-congress.ru, 2023. – С. 189 – 190.
2. **Казанцева, О. А.** Sam46, Kirov и B13 – представители и основатели трех новых родов бактериофагов, инфицирующих бактерии из группы *Bacillus cereus sensu lato* / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // Всероссийская конференция «От микробиологии к генетическим технологиям» (г. Новосибирск, 22–25 сентября 2023 г.): сборник тезисов. – Новосибирск, РФ, 2023. – С. 46-47.
3. **Казанцева, О. А.** Умеренные бактериофаги: недооценённый потенциал профагов в экологии и эволюции бактерий / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // XIII Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Минск, 6 – 9 июня 2023 г.): материалы конференции. – Минск, Беларусь : Беларуская навука, 2023. – С. 53-54.

4. Использование бактериофага Kirov в качестве агента биоконтроля *B. cereus* в пищевых продуктах / А. В. Скорынина, Э. Г. Пилигримова, **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // VIII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пущино, 6–8 декабря 2022 г.): сборник тезисов. / ред. Т. А. Решетилова. – Пущино, РФ : ГЕОС, 2022. – С. 268–270.
5. **Казанцева, О. А.** Isolation, sequencing and characterization of the *Bacillus*-infecting temperate bacteriophage B13 / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // 10-ая Всероссийская научно-практическая конференция «Геномное секвенирование и редактирование» (NGS 2022), под эгидой Центров геномных (г. Москва, 19 мая 2022 г.): сборник тезисов исследований мирового уровня. – Москва, РФ : РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2022. – С. 9.
6. **Казанцева, О. А.** Определение механизма упаковки ДНК и концов хромосомы бактериофагов с использованием методов NGS и RAGE / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // III Всероссийская конференция «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (г. Новосибирск, 19 – 24 июня 2022 г.): сборник тезисов. – Новосибирск, РФ : Академиздат, 2022. – С. 50.
7. **Казанцева, О. А.** Фаготерапия как альтернатива антибиотикам. создание перспективной библиотеки бактериофагов. критерии фага-кандидата / **О. А. Казанцева**, А. М. Шадрин // Конференция «Проблема антибиотикоустойчивости микроорганизмов и пути ее решения» (г. Санкт-Петербург, 16 – 17 июля 2022 г.): сборник тезисов. – Санкт-Петербург, РФ : СПбПУ, 2022.
8. Бактериофаги и их ферменты как антибактериальные агенты / А. М. Шадрин, О. Н. Копосова, А. В. Скорынина, Р. М. Бузиков, **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, В. А. Кулябин, Н. А. Рябова, К. В. Хлопова, В. С. Тимофеев // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса / ред. Е. А. Бонч-Осмоловская [и др.]. – Псков, РФ : ООО «Конкорд», 2021. – С. 122.
9. **Казанцева, О. А.** Sam46 и Sam112, бактериофаги нового рода «*Samaravirus*» с необычной доменной структурой малой субъединицы терминазы / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // 3-ий Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса / ред. Е. А. Бонч-Осмоловская [и др.]. – Псков, РФ : ООО «Конкорд», 2021. – С. 191–192.
10. **Казанцева, О. А.** Бактериофаги vB\_VcM\_Sam46 и vB\_VcM\_Sam112, представители нового рода «*Samaravirus*» с необычной доменной структурой малой терминазы / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // III объединенный научный форум

физиологов, биохимиков и молекулярных биологов / VII съезд биохимиков России (г. Сочи, Дагомыс, 3 – 8 октября 2021 г.): материалы. – Москва, РФ : Перо, 2021. – Т. 2. – С. 111–112.

11. **Казанцева, О. А.** Выделение и характеристика умеренного бактериофага B13 , инфицирующего бактерии группы *Bacillus cereus sensu lato* / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, А. М. Шадрин // VII Пущинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пущино, 6 – 9 декабря 2021 г.): сборник тезисов / ред. Т. А. Решетилова. – Пущино, РФ : ГЕОС, 2021. – С. 48–50.
12. Выделение, секвенирование и характеристика двух штаммов Sam46 и Sam112 нового вида бактериофага, инфицирующего представителей группы *Bacillus cereus sensu lato* / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, В. А. Загородный, А. М. Шадрин // 8-ая Всероссийская научно-практическая конференция «Геномное секвенирование и редактирование» (NGS 2020) (г. Москва, 20–21 мая 2020 г.): сборник тезисов. – Москва, РФ : 978-5-88458-503-4, 2019. – С. 6.
13. Перспективы использования генетического материала вирусов бактерий / А. М. Шадрин, Э. Г. Пилигримова, С. Д. Байчер, В. А. Кулябин, **О. А. Казанцева** // 2-ой Российский микробиологический конгресс (г. Саранск, 23 – 27 сентября 2019 г.): сборник тезисов. – Саранск, РФ : microbiology-congress.ru, 2019. – С. 80.
14. Новые бактериофаги Sam46 и Sam112, инфицирующие *Bacillus cereus sensu lato* / Э. Г. Пилигримова, О. А. Казанцева, В. А. Загородный, А. М. Шадрин // VI Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пущино, 2 – 6 декабря 2019 г.): сборник тезисов. – Пущино, РФ, 2019. – С. 8.
15. Бактериофаги фB83, фKIR1 И фIZH57, инфицирующие бактерии группы *Bacillus cereus* / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, В. А. Загородный [и др.] // Биология – наука XXI века: 22-ая Международная пущинская школа-конференция молодых ученых (г. Пущино, 23 – 27 апреля 2018 г.): сборник тезисов. – Пущино, РФ, 2018. – С. 293.
16. Физиологические особенности бактериофагов, заражающих *Bacillus cereus sensu lato* / **О. А. Казанцева**, Э. Г. Пилигримова, В. А. Загородный [и др.] // 4-ая научно-практическая конференция с международным участием: к 70-летию профессора В.А. Алёшкина: «Бактериофаги. Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (24–26 сентября 2018 г.): сборник тезисов. – Нижний Новгород, РФ, 2018. – С. 46.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает огромную благодарность научному руководителю к.б.н. Андрею Михайловичу Шадрину и всему коллективу лаборатории биологии вирусов бактерий за практическую помощь, ценные советы и поддержку при подготовке диссертационного материала. Автор выражает отдельную благодарность к.б.н. Наталье Александровне Рябовой за помощь в получении результатов трансмиссионной электронной микроскопии исследуемых бактериофагов. Автор также выражает искреннюю благодарность к.б.н. Марине Викторовне Захаровой, ведущему научному сотруднику лаборатории молекулярной микробиологии, за ценные советы и помощь в освоении методов молекулярной биологии.