

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

**Научный
руководитель:**

кандидат биологических наук
Шадрин Андрей Михайлович

**Официальные
оппоненты:**

Тикунова Нина Викторовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, главный научный сотрудник (г. Новосибирск)

Корниенко Мария Андреевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», старший научный сотрудник (г. Москва)

**Ведущая
организация:**

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (г. Москва)

Защита диссертации состоится «19» сентября 2024 г. в 14 ч 00 мин на заседании Диссертационного совета **24.1.232.01** (Д 002.285.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3 и на сайте <https://www.pbcras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета 24.1.232.01
доктор биологических наук

Дегтярева Ольга Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. Бактериофаги являются важной частью генетического обмена в окружающей среде и влияют на микробную эволюцию.

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. Этот факт открывает перспективы для разработки и дизайна препаратов на основе фагов и/или их литических белков. На сегодняшний день фаги и их белки уже нашли применение в качестве диагностических и генетических инструментов, а также стали основой для новых терапевтических средств. 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. Анализ молекулярно-генетических и физиологических особенностей большого 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. *B. cereus* s. l. играют важную роль в процессах поддержания биологического равновесия в почвенных экосистемах. Однако некоторые представители могут быть патогенными для человека, вызывая пищевые отравления и серьезные инфекции, в том числе сибирскую язву. 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, 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* B13.

Цели и задачи исследования

Цель: изучение физиологических и генетических особенностей новых вирулентных и умеренных бактериофагов группы *Bacillus cereus sensu lato*.

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 маркеры выделенных бактериофагов, которые могут вносить вклад в адаптацию и эволюцию бактерий группы *Bacillus cereus sensu lato*.

Научная новизна. Данное исследование позволило расширить знания биологии хвостатых бактериофагов: были открыты и охарактеризованы 3 новых вида бактериофагов – вирулентные бактериофаги *Samaravirus samarensis* vB_BcM_Sam46-T и *Samaravirus samarensis* vB_BcM_Sam46-C (два штамма одного вида, сокращенное наименование которого Sam46) и умеренные бактериофаги

Kirovirus kirovense Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13. Все исследуемые бактериофаги являются представителями и основателями новых таксонов высокого ранга, что позволило расширить современную таксономию вирусов на три новых рода: *Samaravirus*, *Kirovirus* и *Bunatrivirus*.

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

Впервые обнаружена и описана малая субъединица терминазы с атипичной двухдоменной структурной организацией, включающей типичный домен «Terminase_2» и дополнительный домен «FtsK_gamma». Впервые была предложена роль фаговых белков, содержащих домен «FtsK_gamma».

Научно-практическое значение. На основании полученных результатов были предоставлены заявки на формирование новых таксонов бактериофагов (видов и родов) в Международный комитет по таксономии вирусов (Committee on Taxonomy of Viruses, сокр. ICTV): *Samaravirus samarense* 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.

Методология и 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.

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 экспериментов 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». 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 Н.А. на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100С (JEOL, Япония).

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*.

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

Основные результаты диссертации были представлены на конференциях и конгрессах: 4-ом Российском микробиологическом конгрессе (Томск, 2023 г.); конференции «От микробиологии к генетическим технологиям» (Новосибирск, 2023 г.); XIII Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2023 г.); VI и VIII Пущинской конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»/школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие» (Пущино, 2019 г. и 2022 г.); 8-ой и 10-ой Всероссийской научно-практической конференции «Геномное секвенирование и редактирование – NGS» (Москва, 2020 г. и 2022 г.); III Всероссийской конференции «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 2022 г.); конференции «Проблема антибиотикоустойчивости микроорганизмов и пути ее решения» (Санкт-Петербург, 2022 г.); 3-ем Российском микробиологическом конгрессе (Псков, 2021 г.); III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов / VII съезде биохимиков России. (Дагомыс, 2021 г.); 2-ом Российском микробиологическом конгрессе (Саранск, 2019 г.); 22-ой и 23-ей Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2018 г. и 2019 г.); 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» (Нижний Новгород, 2018 г.).

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 цитируемой литературы включает 362 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск, выделение и очистка бактериофагов. Три из четырех исследуемых 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. Для получения препаратов бактериофагов в высоком титре в качестве чувствительных штаммов были использованы штамм *B. cereus* ВКМ В-370 (Pilgrimova, 2021) (для фагов Sam46-T, Sam46-C и B13) и штамм *B. tropicus* ATCC 4342 (для Kirov). Культивирование фаго-бактериальной смеси проводили при разных температурах (28°C или 37°C) и в течение определенного времени (от 4 до 7 ч) в зависимости от исследуемого фага. После инкубации добавляли NaCl и хлороформ и продолжали инкубацию еще 30 мин. 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 и инкубацией в течение ночи при 4°C. После повторного центрифугирования при тех же параметрах осадок растворяли в SM+ буфере и фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм с последующим определением титра с помощью метода спот-теста. Полученные концентрированные с помощью осаждения ПЭГ препараты хранили при 4°C.

Морфология негативных колоний. Для определения морфологического типа бляшек фагов использовали метод агаровых слоев.

Трансмиссионная электронная микроскопия вирионов. Препарат фага с высоким титром использовали для получения очищенной суспензии фага центрифугированием в градиенте плотности CsCl. 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. Полученную 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.

Диапазон чувствительных к фаговой инфекции штаммов группы *Bacillus cereus sensu lato*. Спектр специфичности для каждого фага оценивали на 38 штаммах группы *B. cereus* s. l. методом спот-теста с использованием серийных разведений тестируемого препарата.

Определение температурной и рН стабильностей. 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. Стабильность фагов при различных значениях рН (в диапазоне от 2,2 до 12,0) оценивали с использованием пяти буферов: глицин-HCl-буфера, натрий-ацетатного буфера, фосфатного буфера, глицин-NaOH буфера и Na₂HPO₄-NaOH буфера. В качестве контроля использовали препарат фага в SM+ буфере.

Анализ литической активности бактериофагов. Для оценки литической активности фагов бактериальные культуры чувствительных штаммов заражали фагами при разных значениях множественности инфекции (МИ). Фаго-бактериальные смеси инкубировали в 48-луночном микропланшете при встряхивании при 28°C (для B13) или 30°C (для Sam46-T, Sam46-C и Kirov) в течение 7-10 ч в микропланшетном ридере FilterMax F5 (Molecular Devices, США), измеряя OD₅₉₅ каждые 10 мин.

Секвенирование ДНК бактериофагов, сборка и аннотация их геномов. ДНК бактериофагов выделяли двумя методами: стандартным фенол-хлороформным методом и методом с использованием коммерческого набора «DNeasy Blood & Tissue Kit» для экстракции ДНК. ДНК секвенировали на платформе Illumina MiSeq. Контроль качества, отбор подвыборки и тримминг парных прочтений осуществляли с помощью FastQC v.0.11.9, Seqtk v.0.5.0 и Trimmomatic v0.39, соответственно. Сборка геномов *de novo* осуществлялась с помощью программного обеспечения SPAdes v.3.11.0 – SPAdes v.3.12.0. Открытые рамки считывания (ОРС) были идентифицированы с помощью RASTtk. Предполагаемые функции ОРС были предсказаны BLASTp (NCBI) и HHpred. ARAGORN v1.2.41 использовали для идентификации генов тРНК и транспортно-мессенджерных РНК. Карты геномов бактериофагов были визуализированы с помощью BRIG v.0.95.

Определение стратегии упаковки ДНК и локализация концов фаговой хромосомы. Для определения стратегии упаковки ДНК исследуемых бактериофагов использовали биоинформатический (программу PhageTerm и филогенетический анализ – на основе построения филогенетического дерева больших субъединиц терминаз) и экспериментальный метод рестрикционного анализа. Для филогенетического дерева аминокислотные последовательности больших субъединиц терминаз выровнены с помощью MAFFT. Филограмма построена из выравнивания в MEGA X с использованием метода Neighbor-Joining с параметром «bootstrap» 1000. Филогенетическое дерево белков визуализировано в программе FigTree v1.4.4 с укоренением. 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). В данной работе метод RAGE был модифицирован для каждого конкретного механизма упаковки ДНК: «headful», «short DTR» и «3'-COS».

Тест на возникновение лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 в ходе инфекции Sam46-Т. Для проверки предположения о возникновении лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 при инфекции фагом Sam46-Т из центральной части мутных бляшек (состоящих из предполагаемых лизогенных бактерий) были отобраны пять образцов бактериальных культур. Далее проводили оценку литической активности фагов на предполагаемых лизогенах при значениях МИ равном 2, согласно протоколу «Анализ литической активности бактериофагов», описанному выше.

Анализ адсорбции и одноступенчатая кривая роста. Анализ адсорбции фагов проводился только для вирулентных фагов Sam46-Т и Sam46-С. Для определения времени, необходимого фагам для прикрепления к клеткам *B. cereus* ВКМ В-370, был проведен анализ адсорбции в соответствии с протоколом, описанным Кропински. Для определения латентного периода и среднего размера потомства фагов Sam46-Т и Sam46-С был проведен одноэтапный эксперимент по культивированию фагов, как было описано ранее Кропински.

Сравнительный филогенетический анализ. Дерево больших субъединиц терминаз построено в MEGA X с использованием алгоритма Neighbor-Joining с параметром «bootstrap» 1000 и визуализировано с помощью FigTree v1.4.4. Выравнивание аминокислотных последовательностей белка Gp25 выполнено с помощью CLUSTAL O. Предсказание вторичной структуры XkdW-подобного белка выполнили на сервера JPRED4. График вероятности

образования мотива «спиральная катушка» построен LOGICOIL. Филогенетическая сеть «FtsK_gamma» доменов была построена из выравнивания последовательностей MAFFT версии 7 с помощью «Neighbor-Net» анализа и визуализирована с помощью SplitTree4 v.4.16.1 с параметром «bootstr», равным 1000.

Сравнительный филогеномный 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы были выделены и охарактеризованы новые вирулентные *Samaravirus samarensis* vB_VcM_Sam46-T и vB_VcM_Sam46-C и умеренные *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13 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.

Морфология негативных колоний. На газонах чувствительного бактериального штамма *B. cereus* ВКМ В-370 бактериофаги Sam46-C и Sam46-T стабильно продуцировали один морфотип бляшек: прозрачный и мутный, соответственно (Рис. 1, А и Б). Морфотипы фагов отражены в наименовании фагов Sam46-T и Sam46-C, где буквы «С» и «Т» соответствуют английским словам «clear» и «turbid». Kirov образовывал на газоне штамма *B. tropicus* ATCC 4342 – крупные прозрачные бляшки (Рис.1, В), в то время как B13 на газоне *B. cereus* ВКМ В-370 мелкие мутные бляшки (Рис. 1, Г).

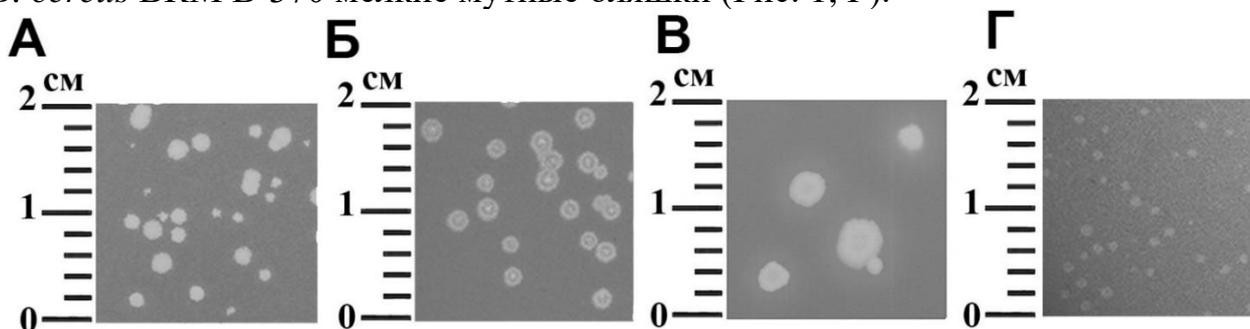


Рисунок 1. Морфология бляшек бактериофагов (А) Sam46-C, (Б) Sam46-T, (В) Kirov и (Г) B13 на газонах чувствительных штаммов (А, Б и Г) *B. cereus* ВКМ В-370 и (В) *B. tropicus* ATCC 4342. Рисунок из (Kazantseva, 2023; 2022; 2021).

Трансмиссионная электронная микроскопия вирионов. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) было установлено, что фаги Sam46-T и Sam46-C обладают одинаковым морфотипом миовирус (Рис. 2, А) с икосаэдрическим капсидом диаметром $57,62 \pm 1,2$ нм, сокращающимся хвостом длиной $160,0 \pm 5,5$ нм и шириной $16,9 \pm 1,3$ нм., в то время как фаг Kirov демонстрирует морфотип сифовирус (Рис. 2, Б) с икосаэдрическим капсидом диаметром $78,3 \pm 2,1$ нм и несокращающимся хвостом длиной $437,6 \pm 12,1$ нм и шириной $12,3 \pm 0,9$ нм. Анализ ТЭМ согласуется с соответствующими наборами хвостовых генов фагов (Рис. 6 и Рис. 7, соответственно). ТЭМ фага B13 не дала ожидаемых результатов из-за деградации вирионов. Тем не менее, набор и структурная организация генов хвоста фага B13 (Рис. 8) соответствуют

характерным особенностям бактериофагов с морфотипом сифивирус, которые характеризуются наличием длинного и несокращающегося хвоста.

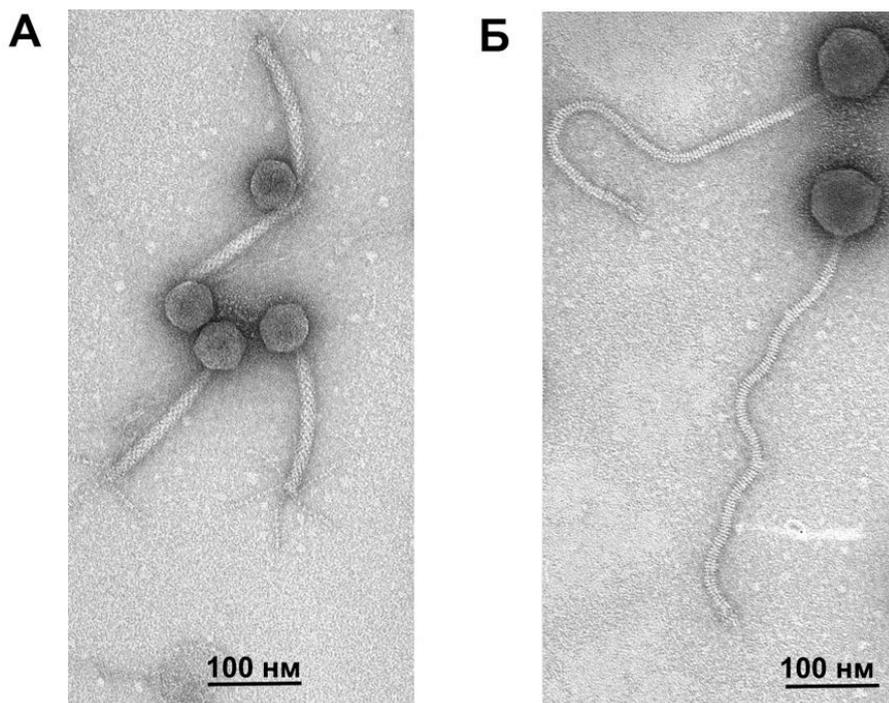


Рисунок 2. Трансмиссионная электронная микроскопия вирионов фагов (А) Sam46-Т и (Б) Kirov с использованием 1% уранилацетата для негативного контрастирования. Рисунок из (Kazantseva, 2023; 2021).

Диапазон чувствительных к фаговой инфекции штаммов группы *B. cereus* s. l. Анализ спектра чувствительных штаммов к инфекции исследуемыми фагами, проведенный на 38 штаммах *B. cereus* s. l. показал, что Sam46-Т и Sam46-С заражали 17 штаммов (~50%) из 38, Kirov – 12 (32%) и В13 – 21 (55%).

Определение температурной и рН стабильностей. Потеря активности фага во время хранения, транспортировки или инактивация фага из-за условий окружающей среды *in vivo* (например, рН) может усложнить процесс исследования этого фага, а также привести к непредсказуемым результатам в случае использования фаго-препаратов на основе «нестабильных» фагов. Исследование температурной и рН-устойчивости фагов Sam46-Т, Sam46-С, Kirov и В13 показали, что их спектры устойчивости в различных условиях среды являются характерными для хвостатых фагов (Рис. 3 и Рис. 4). 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 (Рис. 3).

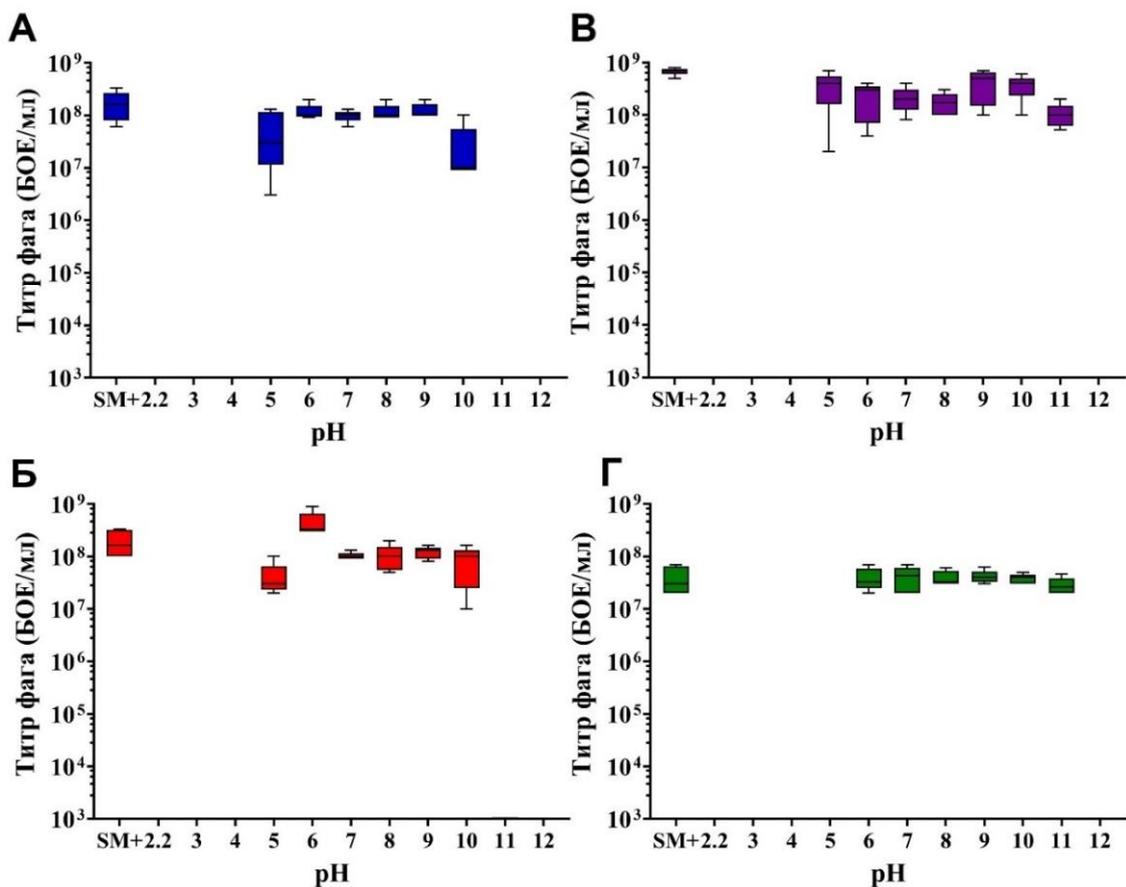


Рисунок 3. pH-стабильность фагов (А) Sam46-С, (Б) Sam46-Т, (В) Kirov и (Г) B13. Остаточное количество фагов после 1-часовой инкубации при значениях pH от 2,2 до 12,0. Рисунок из (Kazantseva, 2023; 2022; 2021).

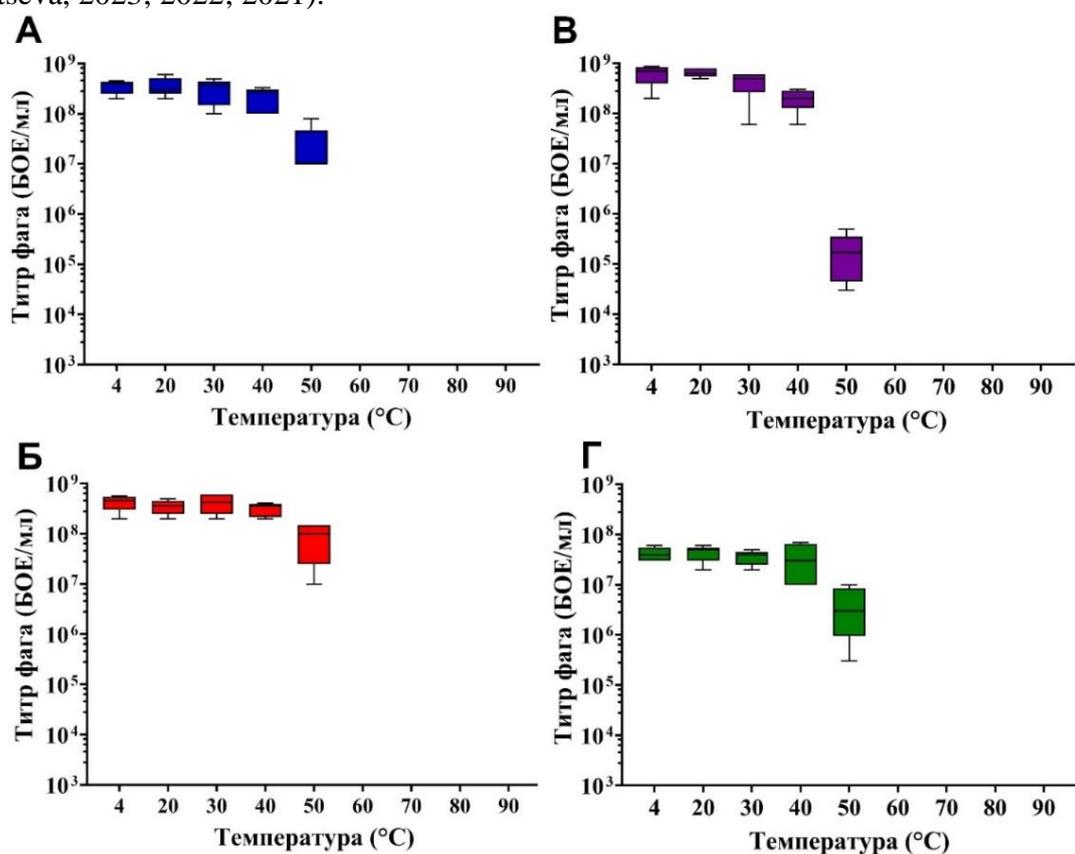


Рисунок 4. Температурная стабильность фагов (А) Sam46-С, (Б) Sam46-Т, (В) Kirov и (Г) B13. Остаточное количество фагов после 1-часовой инкубации в диапазоне температур от 4 до 90°C. Рисунок из (Kazantseva, 2023; 2022; 2021).

Анализ литической активности бактериофагов. Заражение как Sam46-T, так и Sam46-C приводило к ингибированию роста бактерий, которое становилось сильнее при увеличении значения МИ. Однако характер кривых роста *V. cereus* VKM В-370 при инфекции Sam46-C и Sam46-T достоверно различался при МИ 0,01, 0,1 и 1 (Рис. 5, А и Б). При заражении бактериальных культур фагами Sam46-C и Kirov наблюдался полный лизис культуры при разных значениях МИ, что характерно для вирулентных фагов. В то время как инфекции Sam46-T и В13, даже при самой высокой МИ, не обеспечивали полного лизиса культуры, а лишь временно ингибировали рост бактерий (Рис. 5). Такая динамика лизиса с отсутствием устойчивого ингибирования бактериального роста характерна для умеренных фагов. Однако, несмотря на физиологические характеристики, такие как морфология бляшек и литическая активность, окончательные выводы о жизненной стратегии фага должны быть основаны на геномном анализе.

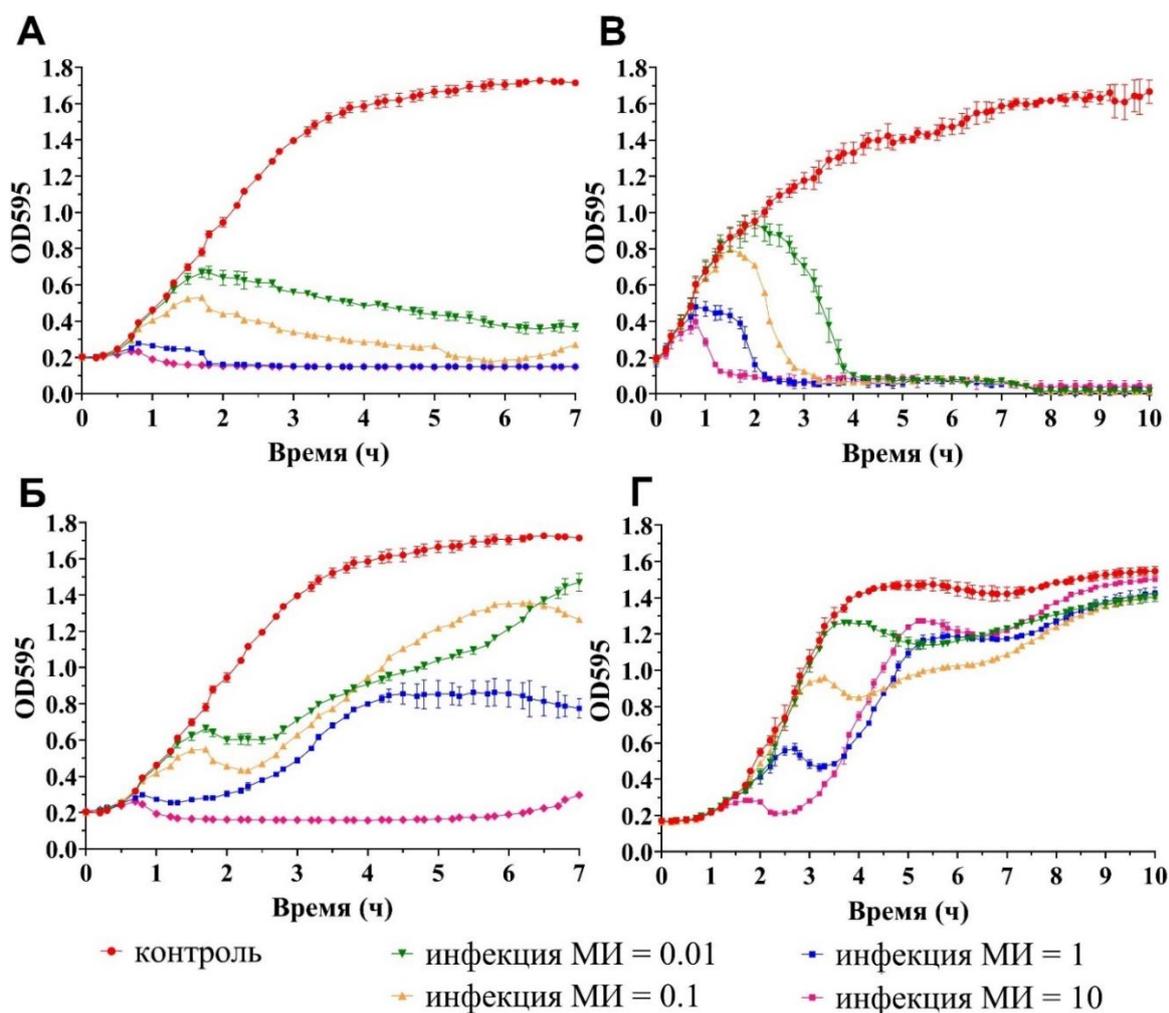


Рисунок 5. Кривые роста чувствительных штаммов (А, Б и Г) *V. cereus* VKM В-370 и (В) *V. tropicus* ATCC 4342 при инфекции фагами (А) Sam46-C, (Б) Sam46-T, (В) Kirov и (Г) В13, соответственно, при различных значениях множественности инфекции (МИ). Рисунок из (Kazantseva, 2023; 2022; 2021).

Секвенирование ДНК бактериофагов, сборка и аннотация их геномов. Основные параметры геномов фагов представлены в Таблице 1. Карты геномов с функциональной аннотацией генов представлены на Рис. 6-8. Согласно данным полногеномного анализа различия в геномах Sam46-T и Sam46-C локализуются в гене *gp25* (Рис. 14). Таким образом, исходя из установленных критериев

видовой классификации ICTV, Sam46-T и Sam46-C являются двумя отдельными штаммами в рамках одного вида бактериофага *Samaravirus samarensis* (далее сокращенно именуемый как Sam46).

Таблица 1. Биоинформатический анализ геномов исследуемых фагов. ОРС – открытая рамка считывания.

Фаг	Генетический материал	Длина генома, н.п.	GC-состав, %	Кол-во ОРС	Функционально аннотированные ОРС, (% от всех ОРС)	Кол-во гРНК
Sam46-T Sam46-C	линейная дцДНК	45 419	41,6	77	44 (57,1%)	-
Kirov	линейная дцДНК	165 383	35,5	275	108 (39,3%)	5
B13	линейная дцДНК	36 864	34,8	53	30 (56,6%)	-

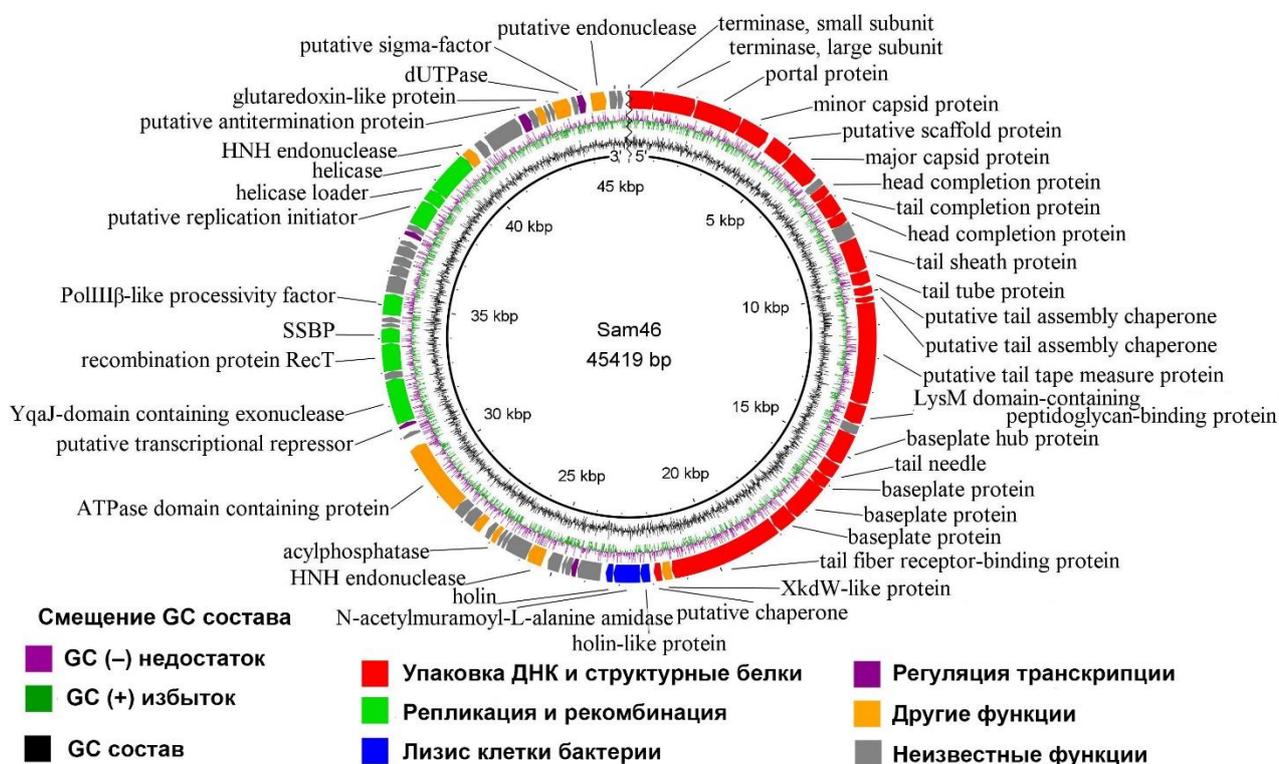


Рисунок 6. Карта генома бактериофага Sam46. ОРС окрашены исходя из функций белков, которые они кодируют (см. обозначения). Рисунок из (Kazantseva, 2021).

Определение стратегии упаковки ДНК и локализация концов фаговой хромосомы. Для понимания организации геномов фагов, с целью их депонирования в различные базы геномных данных, а также корректного проведения филогенетического анализа, требуется определить тип упаковки и связанные с этим процессом границы генома фагов. Чтобы установить механизм упаковки ДНК фага в прокапсид у исследуемых фагов использовали биоинформатические (программа PhageTerm и филогенетический анализ больших субъединиц терминаз) и экспериментальные (рестрикционный анализ) методы. Для определения точных границ генома как правило используется стандартный метод секвенирования по Сэнгеру.

Однако для этих целей необходимо достаточно большое количество ДНК, что может быть сложной задачей в случае механизмов упаковки ДНК «headful» и «COS», поскольку требует выделение рестрикционных фрагментов ДНК, содержащих концы генома. Таким образом, в данной работе для определения точных границ геномов фагов впервые было предложено использовать метод RAGE (метод быстрой амплификации концов генома), модифицированный в соответствии с конкретными механизмами упаковки ДНК. Этот метод позволяет использовать небольшое количество ДНК, таких как рестрикционные фрагменты ДНК. Изначально реакция проводится с участием терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (ТдТ), которая добавляет дезоксирибонуклеотиды (в данной работе – dATP) на 3'-концах ДНК (выделенного рестрикционного фрагмента, содержащего один из концов генома). Далее происходит увеличение необходимого ампликона в двух последующих ПЦР («гнездовая») с использованием системы специфичных праймеров. В конечном итоге требуется выделить и очистить ПЦР-фрагмент в достаточном количестве для последующего секвенирования методом Сэнгера.

Для биоинформатического предсказания стратегии упаковки геномов, проведен филогенетический анализ больших субъединиц терминаз фагов с установленным механизмом упаковки и белков исследуемых фагов (Рис. 9). Было показано, что фаги Sam46 и B13 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).

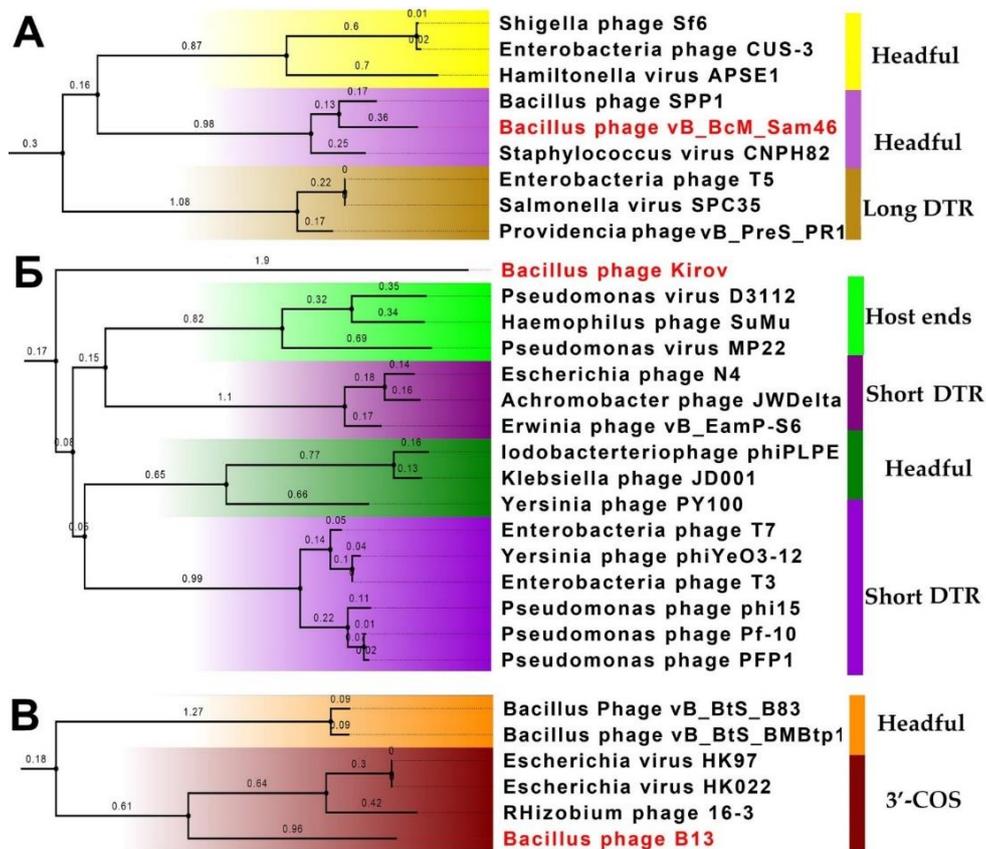


Рисунок 9. Филогенетический анализ больших субъединиц терминаз исследуемых фагов и фагов с хорошо изученными механизмами упаковки. Ветви дерева, содержащие белки фагов (А) Sam46, (Б) Kirov, (В) B13. Исследуемые фаги выделены красным цветом. Масштабная линейка обозначает количество аминокислотных замен на сайт.

Рестрикционный анализ и использование модифицированного метода RAGE позволили экспериментально установить механизмы упаковки ДНК и точно определить границы геномов фагов: фаг Sam46 обладает механизмом упаковки «headful» с точной сайт специфичной инициацией (Рис. 10), Kirov – «short DTR», где один повтор составил 284 н.п. (Рис. 11) и B13 – «3'-COS», с последовательностью *cos*-сайта: 5'-CGAGAGGGG-3' (Рис. 12). 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» (Рис. 10-12).

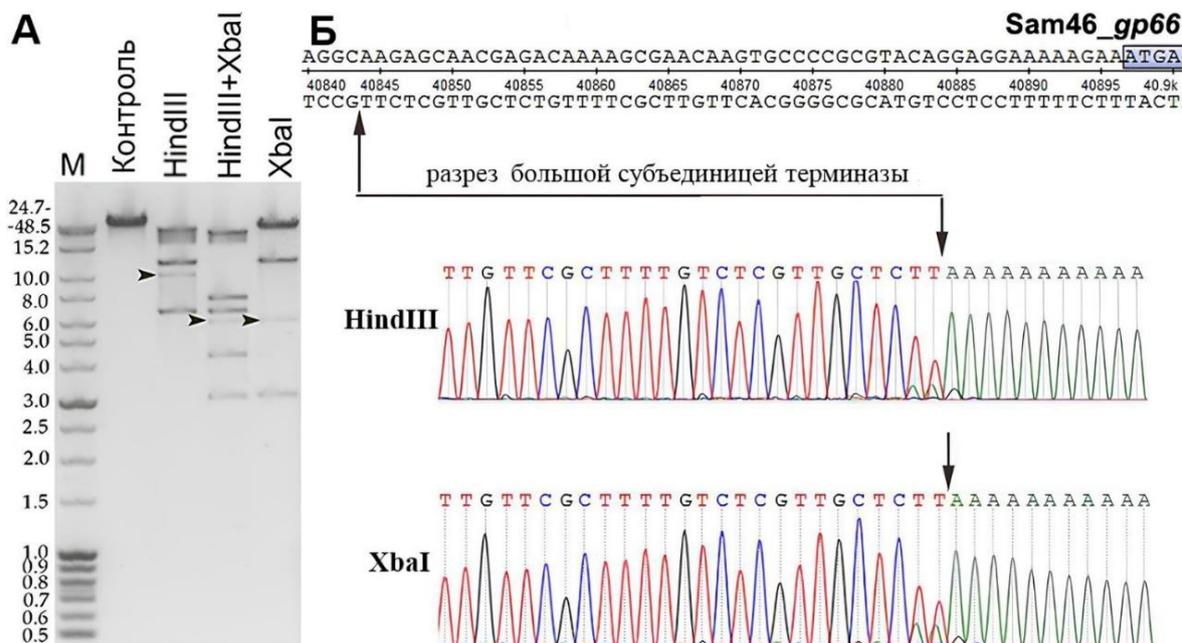


Рисунок 10. (А) Рестрикционный анализ ДНК Sam46-Т. М – маркеры длин ДНК-фрагментов; черные стрелки – *pac*-фрагменты. (Б) На хромотограммах секвенирования показаны концевые области последовательностей продуктов ПЦР, полученных с помощью метода RAGE. Рисунок из (Kazantseva, 2021).

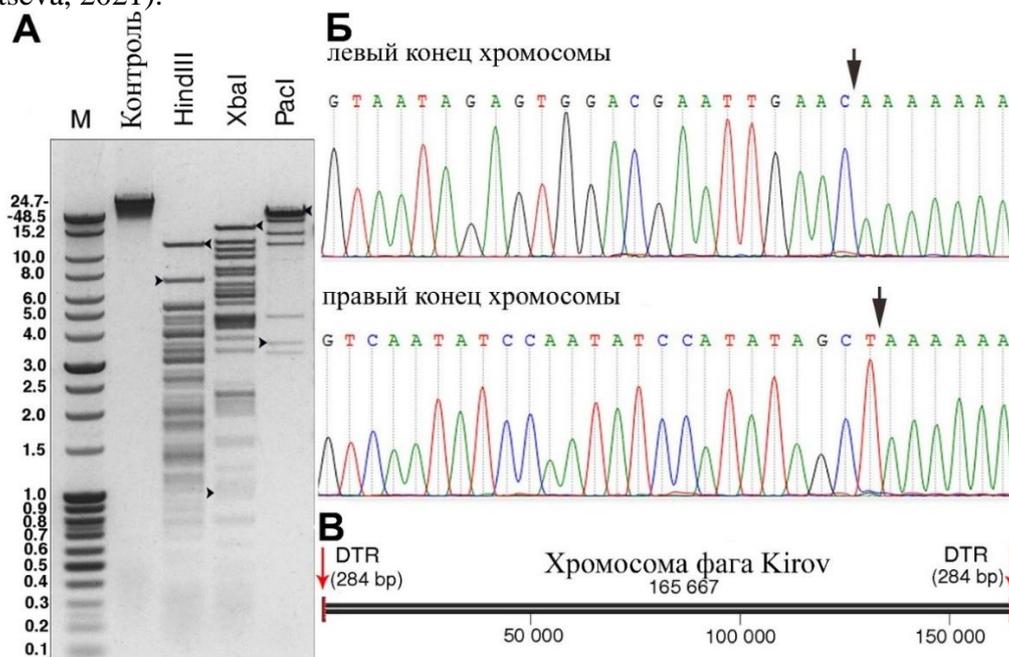


Рисунок 11. (А) Рестрикционный анализ ДНК Kirov. М – маркеры длин ДНК-фрагментов. Черные стрелки – фрагменты ДНК, содержащие концы хромосомы. (Б) Хромотограммы секвенирования: черные стрелки – концевые последовательности хромосомы фага. (В) Схема хромосомы фага Kirov: красные стрелки – повторы. Рисунок из (Kazantseva, 2023).

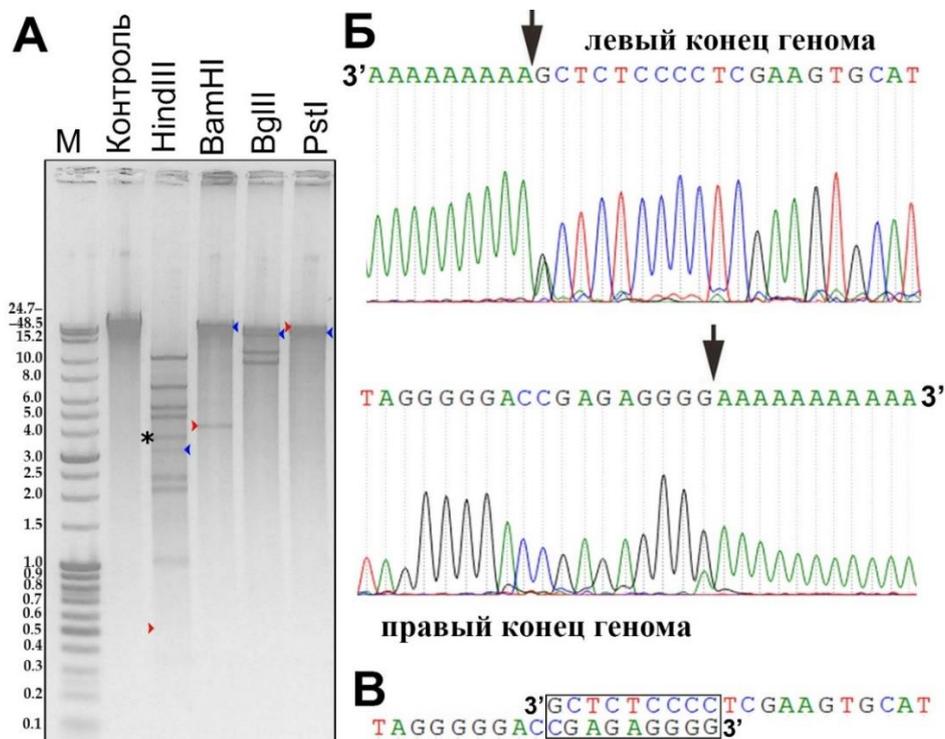


Рисунок 12. (А) Рестрикционный анализ ДНК В13. М – маркеры длин ДНК-фрагментов; красные и синие стрелке – фрагменты ДНК, содержащие левый и правый концы генома; звездой обозначен «объединенный» фрагмент ДНК. (Б) Хроматограммы секвенирования: черные стрелки – концевые последовательности генома фага В13. (В) Детектированные по результатам секвенирования 3'-COS-когезионные концы выделены черной рамкой. Рисунок из (Kazantseva, 2022).

Тест на возникновение лизогенного штамма *B. cereus* ВКМ В-370 в ходе инфекции Sam46-Т. Умеренные фаги, находясь в форме профага, придают своим лизогенным бактериям-хозяевам «иммунитет» к близкородственным фагам – «иммунитет к суперинфекции». Было выдвинуто предположение, что различие в морфотипах бляшек Sam46-С и Sam46-Т (Рис. 1), а также разница в характере лизиса бактериальных клеток *B. cereus* ВКМ В-370 (Рис. 5) могут быть связаны с образованием лизогенного бактериального штамма в ходе фаговой инфекции Sam46-Т. Анализ результатов исследования кривых роста бактериальных штаммов *B. cereus* ВКМ В-370: как исходного штамма (Рис. 6, А), так и предполагаемых лизогенных штаммов (Рис. 6, Б-Е), не выявил каких-либо значимых различий в характере инфекций, что опровергает выдвинутое предположение. Наблюдаемое разнообразие морфотипов бляшек (Рис. 1) и различия в темпах лизиса *B. cereus* ВКМ В-370 при фаговой инфекции Sam46-Т и Sam46-С (Рис. 5) не обусловлены процессами образования бактериальных лизогенов и исключения суперинфекции.

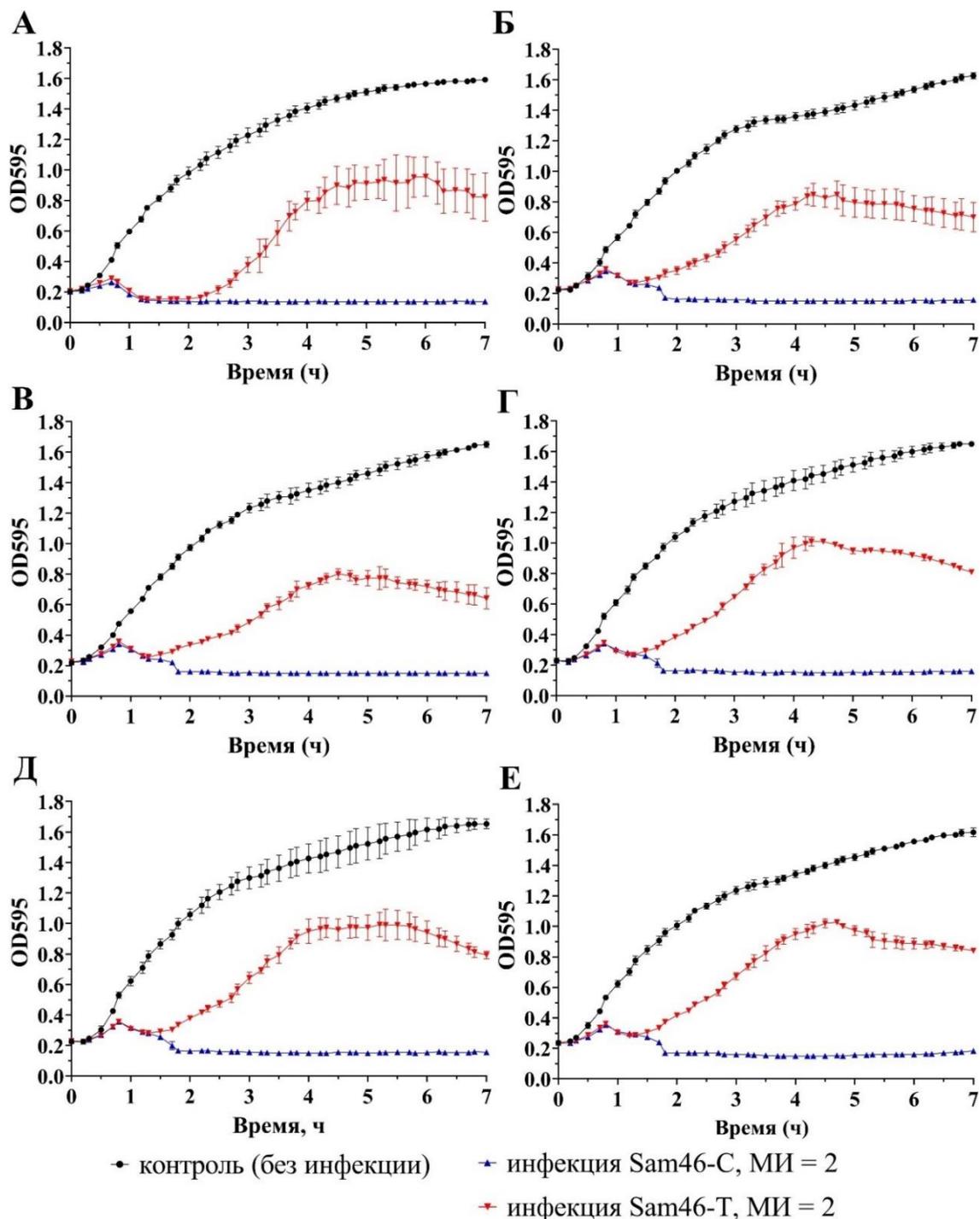


Рисунок 13. Кинетика роста предполагаемых лизогенных штаммов *B. cereus* VKM B-370 при повторном заражении бактериофагами Sam46-Т и Sam46-С. Рисунок из (Kazantseva, 2021).

Мутации в гене *gp25* определяют различия в физиологических характеристиках между штаммами Sam46-Т и Sam46-С. Полногеномный сравнительный анализ фагов Sam46-С и Sam46-Т показал, что различия в морфологии бляшек обусловлены точечными мутациями в гене *gp25*, который кодирует ХkdW-подобный белок Gp25 с неизвестной функцией. Сравнительный аминокислотный анализ белков Gp25 фагов Sam46-С, Sam46-Т и белков полученных мутантных фагов Sam46-С (из Т→ мутант С), а также структурный анализ белка Gp25 показал, что обнаруженные мутации расположены в последовательности «спиральной катушки» (coiled-coil) (Рис. 14). Исходя из результатов экспериментов и принимая во внимание соседство гена *gp25* с генами, связанными с морфогенезом фагового хвоста (*gpN*-подобный белок

предположение в рамках данной исследовательской работы не было проверено, поскольку эксперименты были поставлены в условиях экспоненциальной фазы роста бактериальной культуры. Для более глубокого понимания функциональной роли XkdW-подобного белка Gr25 в жизненных циклах фагов Sam46-T и Sam46-C необходимы дополнительные исследования.

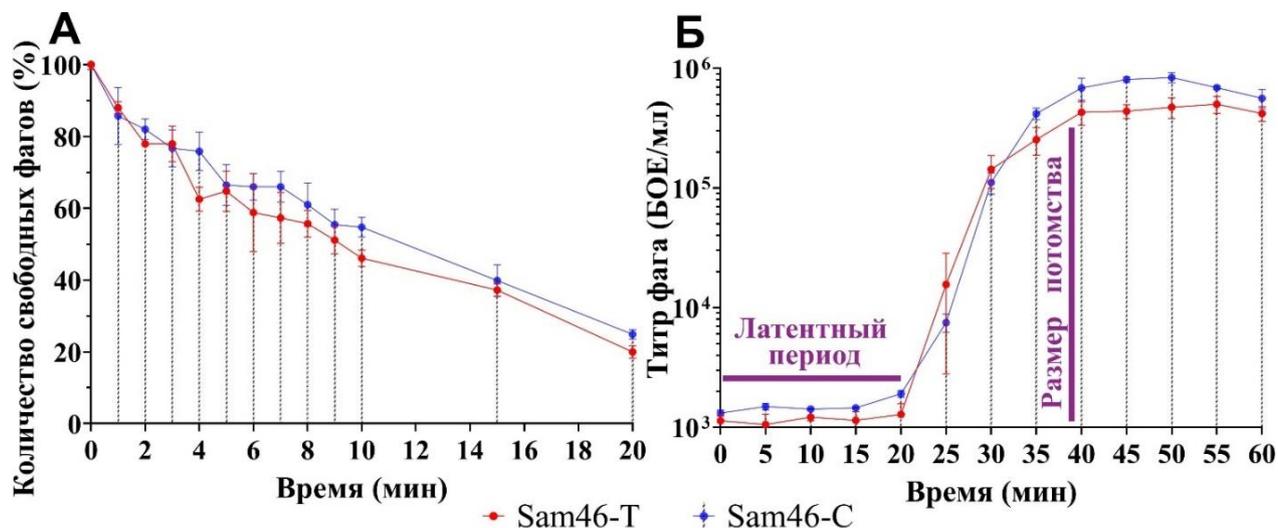


Рисунок 15. Параметры инфекции: (А) Анализ адсорбции и (Б) Одноступенчатая кривая роста фагов Sam46-T и Sam46-C. Рисунок из (Kazantseva, 2021).

Исследуемые фаги и фаготерапия. Первым и решающим этапом в разработке успешного препарата для фаготерапии является формирование качественной библиотеки бактериофагов. Для того чтобы бактериофаг попал в эту библиотеку, он должен соответствовать строго определенным критериям фага-кандидата, из которых основным и, по сути, единственным генетическим маркером является облигатная вирулентность фага (отсутствие интеграз).

Фаг В13 не проходит критерии отбора фага-кандидата, поскольку является умеренным бактериофагом: при анализе генома был обнаружен ген, кодирующий сайт-специфичную интегразу.

Несмотря на физиологические характеристики фагов Sam46-C и Kirov, такие как высокая литическая активность, рН- и температурная стабильность, а также спектр чувствительных штаммов группы *V. cereus*, эти фаги также 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 атипичную по структуре малую субъединицу 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. 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. 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) или FRS (FtsK Recognition Sequence), а в случае SpoIIIЕ известные как SRS сайты (SpoIIIЕ Recognition Sequence). По всей видимости,

«FtsK_gamma» домен малой субъединицы терминазы Sam46 был приобретен у бактериальных хозяев в ходе ко-эволюции. Согласно аминокислотному выравниванию и филогенетическому анализу «FtsK_gamma» домен Sam46 имеет высокую гомологию с доменами «FtsK_gamma» *B. cereus* и *B. subtilis* (Рис. 16). 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 прокапсиды, т.е. осуществляется ГПГ за счёт генерализованной трансдукции.

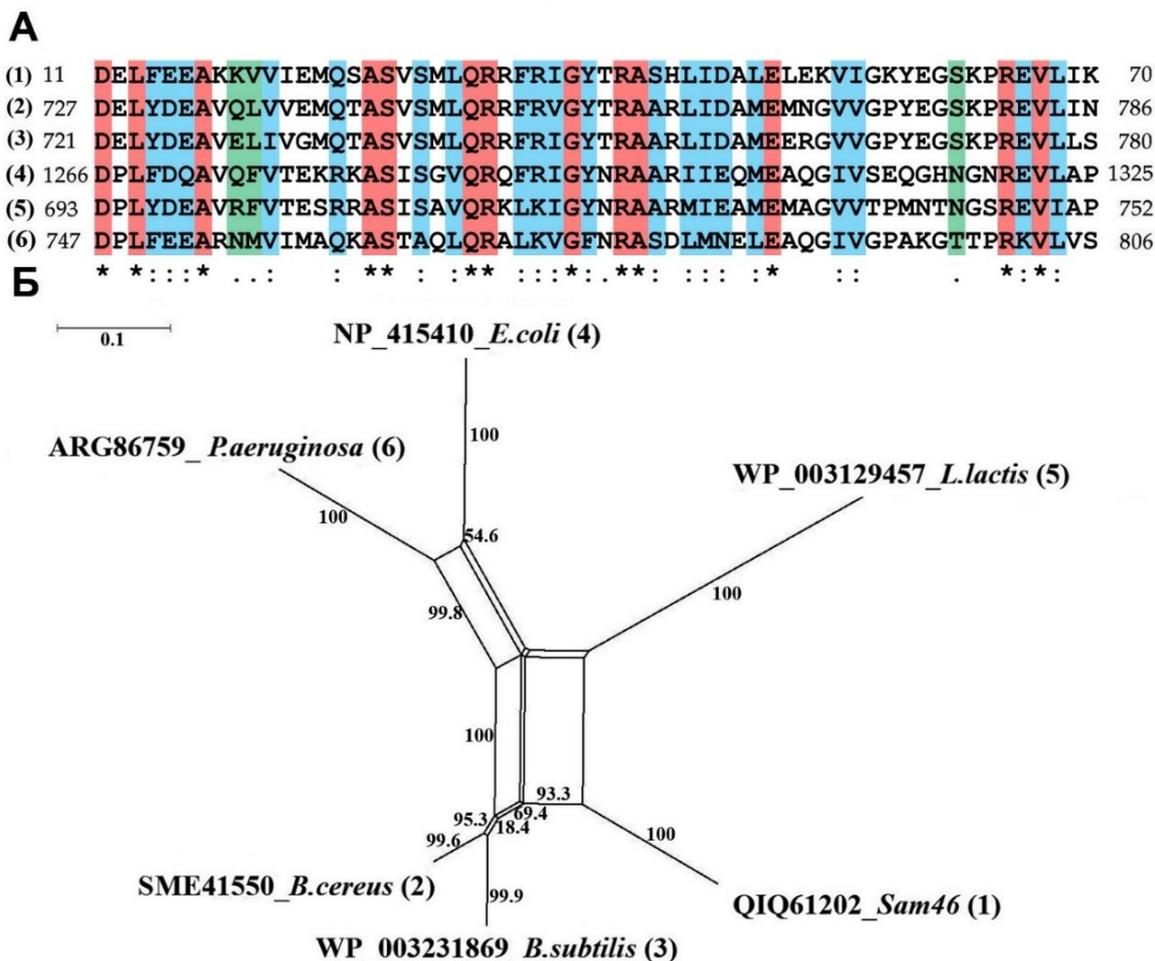


Рисунок 16. Сравнительный анализ «FtsK_gamma» доменов малой субъединицы терминазы бактериофага Sam46 и «FtsK_gamma» доменов бактериальных белков. (А) Выравнивание аминокислотных последовательности «FtsK_gamma» доменов. (Б) «Neighbor-Net» дерево «FtsK_gamma» доменов. Рисунок из (Kazantseva, 2021).

В случае фага Kirov анализ его полного генома позволяет предположить, что данный фаг имеет умеренный образ жизни (Рис. 7). В геноме Kirov были обнаружены, помимо гена сайт-специфичной интегразы, гены, связанные с репликацией и сегрегацией плазмиды и кодирующих следующие белки: белок суперсемейства Replic_Relax, ParM-подобный белок и предполагаемый ParG-подобный белок (Рис. 7). По-видимому, Kirov может не только интегрировать свой геном в геном бактерии, но и существовать в форме кольцевого плазмидного профага в цитоплазме хозяина. 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, в качестве дополнительных генов-маркеров могут быть 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 должно быть учтено при формировании библиотеки бактериофагов, поскольку может сигнализировать о потенциальных рисках и ограничениях в использовании фагов для фаготерапии.

Вклад исследуемых бактериофагов в адаптацию и эволюцию бактерий группы *Bacillus cereus sensu lato*. В ходе геномного анализа исследуемых фагов были выявлены гены, белки которых потенциально могут участвовать в адаптации и эволюции бактериального хозяина. В таблице 2 представлен список этих белков, а также указаны процессы, в которых они могут участвовать.

Таблица 2. Фаговые гены, кодирующие белки, которые могут влиять на жизнедеятельность бактерий.

Фаг	Гены	Белки	Функции
Sam46	<i>gp1</i>	FtsK_gamma домен-содержащая малая субъединица терминазы	Горизонтальный перенос генов (генерализованная трансдукция)
Kirov	<i>gp208</i> <i>gp170</i> <i>gp132</i> <i>gp125</i> <i>gp115</i> <i>gp98</i> и др.	SAM-зависимая метилтрансфераза, Тимидилаткиназа, Нуклеотидилтрансфераза, Рибонуклеотид-дифосфатредуктаза, Гуанилаткиназа, Полинуклеотид киназа, др.	Метаболизм нуклеиновых кислот
	<i>gp123</i>	Тиоредоксин	Защита от активных форм кислорода и дисульфидного стресса
	<i>gp202</i> <i>gp201</i> <i>gp87</i>	PnuC-подобный переносчик никотинамидмононуклеотидов, Никотинамид-нуклеотид-аденилилтрансфераза NadR-типа, Никотинат-фосфорибозилтрансфераза	Метаболизм никотинамидадениндинуклеотида (НАД)
	<i>gp82, gp155, gp156, gp178, gp215, gp247</i>	6 липопротеинов с сигнальными последовательностями	Исключение суперинфекции, изменение вирулентности
	<i>gp85</i>	белок споруляции Cse60	Прорастание спор
B13	–	–	–

Таксономия исследуемых фагов. Согласно филогенетическому анализу, исследуемые фаги значительно удалены от своих ближайших родственных фагов (Рис. 17). Согласно критериям демаркации вида и рода, исследуемые фаги были 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. Исследуемые фаги являются представителями и основателями 3-х новых родов *Samaravirus*, *Kirovirus* и

Bunatrivirus, которые принадлежат к подсемейству *Andregratiavirinae* в классе *Caudoviricetes*.

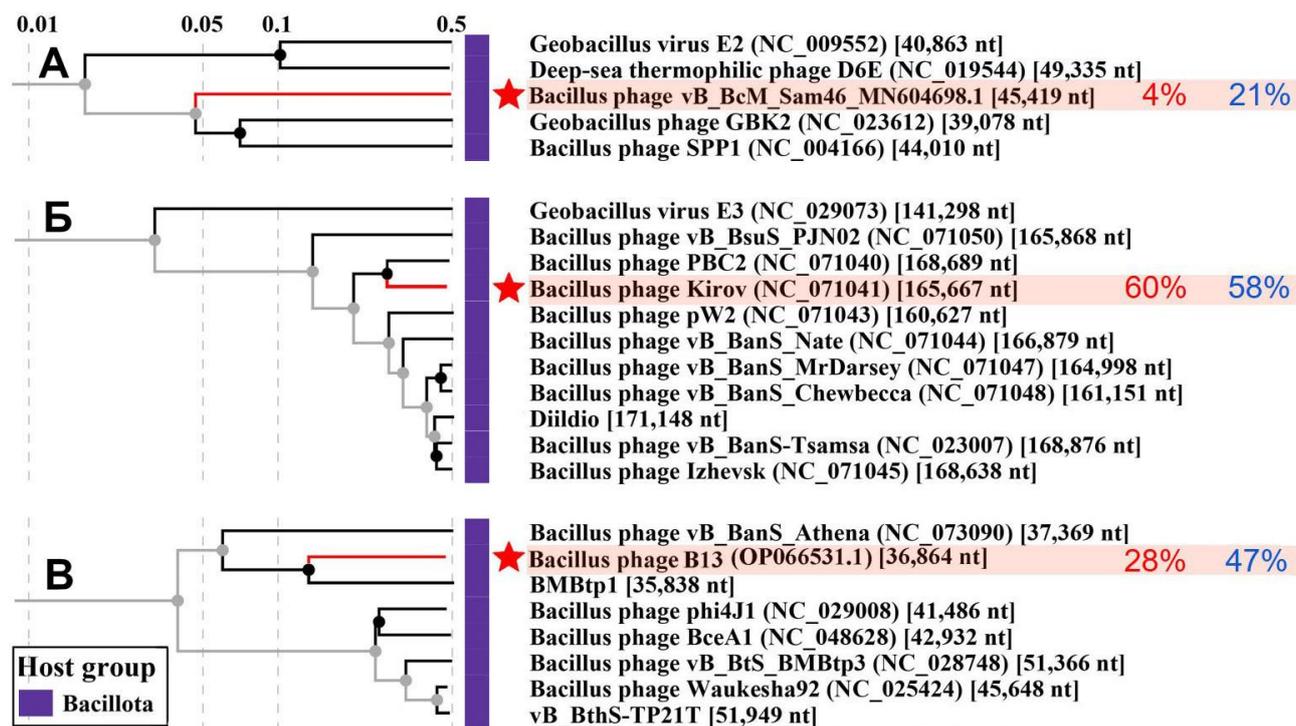


Рисунок 17. Ветви протеомного дерева, включающие бактериофаги (А) Sam46, (Б) Kirov, (В) B13 и другие близкородственные фаги. В «%» указаны полногеномная идентичность (красным) и количество общих белков (синим) с соответствующим ближайшим родственным фагом. Рисунок из (Kazantseva, 2023; 2022; 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были выделены и охарактеризованы четыре новых бактериофага, способных инфицировать представителей группы *B. cereus* s. l.: *Samaravirus samarensis* vB_BcM_Sam46-C, *Samaravirus samarensis* vB_BcM_Sam46-T, *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13. Были изучены основные физиологические характеристики данных фагов, включая морфологию негативных колоний, структуру вирионов, рН- 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 обладают потенциальным значением для дальнейшего применения бактериофагов в научных и прикладных исследованиях.

В ходе исследования были выявлены и впервые описаны несколько интересных особенностей фага Sam46. Два штамма этого фага, принадлежащего к морфотипу миовирус, обладают способностью образовывать два типа бляшек на чувствительном штамме *B. cereus* ВКМ В-370: прозрачные (С-тип) и мутные (Т-тип). Согласно геномному анализу и полученным экспериментальным данным было установлено, что разнообразие морфотипов и различия в характере литической активности штаммов Sam46 не связаны с образованием лизогенов и явлением исключения суперинфекции, а обусловлены мутациями в гене *gp25*, кодирующем XkdW-подобный белок. Роль XkdW-подобного белка остается предметом дальнейших исследований, направленных на выяснение его функциональной значимости в жизненных циклах фагов Sam46-T и Sam46-C. 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, содержащей 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.

Кроме того, на фоне существующего дисбаланса в исследованиях фагов, который проявляется в переизбытке исследований вирулентных фагов, в то время как умеренные фаги остаются малоизученными – исследования фага Kirov, предположительно плазмидного фага, и В13, 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. Этот метод предоставляет ценную альтернативу существующим экспериментальным методам, поскольку для определения границ генома можно использовать небольшое количество исходного ДНК материала.

Полногеномные последовательности ДНК представителей трех новых видов фагов были подробно аннотированы и загружены в базу данных National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI GenBank): *Samaravirus samarensis* vB_VcM_Sam46-T (MN604698), *Kirovirus kirovense* Kirov (MW084976; NC_071041), *Bunatrivirus bunatris* В13 (OP066531).

По результатам сравнительной геномики и филогенетического анализа было установлено, что три описанных новых вида фагов – вирулентные фаги *Samaravirus samarensis* vB_VcM_Sam46-T и *Samaravirus samarensis* vB_VcM_Sam46-C (два штамма одного вида), а также умеренные фаги *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* В13, являются представителями и основателями трех новых родов, названных *Samaravirus*, *Kirovirus* и *Bunatrivirus*, соответственно. Это расширяет существующую таксономию вирусов бактерий за счет добавления трех новых родов 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_BcM_Sam46-T и vB_BcM_Sam46-C и умеренные Kirov и B13 бактериофаги, инфицирующие группу *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 samarense* vB_BcM_Sam46-T и *Samaravirus samarense* vB_BcM_Sam46-C, *Kirovirus kirovense* Kirov и *Bunatrivirus bunatris* B13.
5. В геномах бактериофагов Sam46 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. 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.
2. **Kazantseva, O. A.** Novel *Bacillus*-infecting bacteriophage B13 – the founding member of the proposed new genus *Bunatrivirus* / **O. A. Kazantseva**, E. G. Piligrimova, A. M. Shadrin // Viruses. – 2022. – Т. 14. – № 10. – С. 2300.
3. **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. Piligrimova, A. M. Shadrin // Scientific Reports. – 2021. – Т. 11. – № 1. – С. 12173.
4. Complete genome sequence of *Bacillus cereus sensu stricto* VKM B-370, isolated from the *Silkworm bombyx mori* / E. G. Piligrimova, R. M. Buzikov, **O. A. Kazantseva**, A. M. Shadrin // Microbiology Resource Announcements. – 2021. – Т. 10. – № 20. – С. e00386-21.

16 тезисов, опубликованных в сборниках в сборниках материалов конференций и конгрессов

1. **Казанцева, О. А.** Умеренные бактериофаги В13 и В473, 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 В13 – 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 Пуцинская 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 В13 / **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_VсM_Sam46 и vB_VсM_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 φB83, φKIR1 И φIZH57, 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.

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 геной инженерии» (2022-2025 гг.).

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. От всей души автор выражает признательность к.б.н. Татьяне Владимировне Ивашиной, к.б.н. Марине Викторовне Захаровой и д.б.н. Виктории Артуровне Щербаковой за их ценные замечания и конструктивные советы в процессе написания диссертации.