

Характеристика литического фага Ph_15, активного в отношении биопленок *Pseudomonas aeruginosa*

Н.В.Колупаева, В.В.Кузин, О.А.Щербакова, Л.В.Колупаева, О.В.Калмантаева,
Н.А.Сухаричева, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, Е.С.Кузина

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Мультирезистентные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* относятся к числу наиболее важных нозокомиальных патогенов, вызывающих инфекции с высоким уровнем смертности. Благодаря наличию у них большого числа факторов вирулентности эти бактерии вызывают обширное повреждение тканей макроорганизма, а их биопленки ассоциированы с переходом инфекционного процесса в хронический. Для лечения заболеваний, вызванных штаммами, устойчивыми к антимикробным препаратам, а также для борьбы с биопленками *P. aeruginosa* в последние годы разрабатываются альтернативные подходы. Одним из них является использование литических бактериофагов и их ферментов. Применение бактериофагов для борьбы с биопленками, образованными штаммами *P. aeruginosa*, основано на способности некоторых фагов с помощью своих ферментов разрушать внеклеточный матрикс биопленок. В данном исследовании представлена характеристика нового литического бактериофага Ph_15, активного в отношении *P. aeruginosa*. Наличие у фага разрушающей активности в отношении экзополисахаридного матрикса биопленок открывает новые перспективы в борьбе с нарастающей антибиотикорезистентностью.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, разрушение биопленок, бактериофаги, ферменты, экзополисахаридный матрикс, антибактериальная терапия

Для цитирования: Колупаева Н.В., Кузин В.В., Щербакова О.А., Колупаева Л.В., Калмантаева О.В., Сухаричева Н.А., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Кузина Е.С. Характеристика литического фага Ph_15, активного в отношении биопленок *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2025; 10(3): 42–50. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-42-50

Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms

N.V.Kolupaeva, V.V.Kuzin, O.A.Shcherbakova, L.V.Kolupaeva, O.V.Kalmantaeva,
N.A.Sukharicheva, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, E.S.Kuzina

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow region,
Russian Federation

Multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* are among the most important nosocomial pathogens causing infections with high mortality rate. Due to the presence of a large number of virulence factors, these bacteria cause extensive tissue damage in the macroorganism, and their biofilms are associated with the transition of the infectious process to chronicity. To treat diseases caused by antimicrobial-resistant strains and to control *P. aeruginosa* biofilms, alternative approaches have been developed in recent years. One of the alternative ways to treat infections caused by *P. aeruginosa* is the use of lytic bacteriophages and their enzymes. The use of bacteriophages to combat biofilms formed by *P. aeruginosa* strains is based on the ability of some phages, with the help of their enzymes, to degrade the extracellular matrix of biofilms. This study presents the characterization of a new lytic bacteriophage Ph_15 active against *P. aeruginosa* biofilms. This study presents the characterization of a new lytic bacteriophage Ph_15 active against *P. aeruginosa*. The presence of phage destructive activity against exopolysaccharide matrix of biofilms opens new perspectives in the fight against growing antibiotic resistance.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm destruction, bacteriophages, enzymes, exopolysaccharide matrix, antibacterial therapy

For citation: Kolupaeva N.V., Kuzin V.V., Shcherbakova O.A., Kolupaeva L.V., Kalmantaeva O.V., Sukharicheva N.A., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Kuzina E.S. Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Bacteriology. 2025; 10(3): 42–50. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-42-50

Для корреспонденции:

Колупаева Надежда Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 31-2182

Статья поступила 11.08.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Nadezhda V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 31-2182

The article was received 11.08.2025, accepted for publication 30.09.2025

Pseudomonas aeruginosa – грамотрицательная условно-патогенная бактерия, вызывающая широкий спектр внутрибольничных заболеваний [1]. Данный патоген отнесен к группе ESKAPE и представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения из-за растущей антибиотикоустойчивости [2]. Карбапенем-резистентная синегнойная палочка занимает 10-е место в списке приоритетных патогенов, опубликованном Всемирной организацией здравоохранения в 2024 г. [3].

Благодаря способности к образованию биологических пленок бактерия колонизирует различные поверхности, в т.ч. медицинские материалы и оборудование пищевой промышленности. Повсеместное распространение *P. aeruginosa* как на биотических, так и на абиотических поверхностях делает данный микроорганизм отличной моделью для изучения бактериальных биопленок [4]. Клетки в форме биопленки приобретают повышенную устойчивость к условиям окружающей среды, антибиотикам и дезинфицирующим средствам, а также к иммунной системе и различным методам облучения [5]. Устойчивость патогена к антибиотикам приводит к неэффективности лечения, и, несмотря на разработку новых антибактериальных препаратов, уровень смертности от инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, остается достаточно высоким и составляет 20–60% [6, 7].

Широкое распространение штаммов *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью и их способность образовывать биопленки создают необходимость поиска новых альтернативных средств лечения заболеваний, вызванных данным патогеном, и способов удаления биологических пленок с различных поверхностей.

Альтернативные способы лечения основаны на применении бактериофагов и их ферментов [8, 9]. Применение фагов как самостоятельных противомикробных препаратов не является новым подходом. Однако, несмотря на это, изучение литических фагов и их взаимодействия с бактериальными клетками остается перспективным направлением. Научные исследования демонстрируют высокую эффективность применения бактериофагов, их ферментов и коктейлей в отношении *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью не только в моделях *in vitro* и *in vivo*, но и в клинических исследованиях [10–14]. Это обуславливается способностью бактериофага проникать в биопленку и разрушать ее структуру используя различные механизмы, среди которых: способность разрушать структуру экзополисахаридного матрикса, способность атаковать и убивать бактериальные клетки и способность лизировать клетки после заражения [15]. Некоторые бактериофаги используют литические ферменты, такие как эндолизины и деполимеразы, обладающие ферментативной активностью в отношении бактериальных пленок [13, 16, 17]. Применение фаговых ферментов может существенно улучшить процессы лечения бактериальных инфекций. Однако, несмотря на все преимущества фаговой терапии, ее применение по-прежнему ограничено рядом факторов, одним из которых является недостаточная изученность этих антибактериальных агентов. Поэтому качественная молекулярно-генетическая характеристика бактериофагов может значительно улучшить процесс разработки новых препаратов на их основе.

Цель работы: микробиологическая, молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика фага Ph_15, активного в отношении экзополисахаридного матрикса биопленок *P. aeruginosa*.

Материалы и методы

Выделение и очистка бактериофага

Бактериофаг Ph_15 был выделен ранее из сточных вод Московской области методом обогащения [18]. Для очистки бактериофага фаголизат осаждали в присутствии ПЭГ 8000 (при конечной концентрации 10% и 500 мМ NaCl) в течение 24 ч с последующим центрифугированием при 10 000 g (ротатор Beckman SW50.1 Ti, Beckman Coulter Inc., Бри, Калифорния, США) в течение 10 мин при температуре +4°C. Для дальнейшей характеристики фага использовали бактериальный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk», обладающий высокой способностью к образованию биопленок.

Адсорбция фаговых частиц

Для определения кинетики адсорбции клетки *P. aeruginosa* ATCC 27853 выращивали в жидкой питательной среде ГРМ-бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия) до логарифмической фазы, смешивали с бактериофагом Ph_15, при кратности заражения MOI = 0,001 и инкубировали при температуре 37°C. Через определенные промежутки времени (0, 1, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 35, 40 мин) отбирали 100 мкл образца, смешивали с 850 мкл SM-буфера и 50 мкл хлороформа. Для удаления бактериальных клеток пробы центрифугировали при 10 000 g в течении 5 мин. Оставшиеся свободные частицы бактериофага титровали методом Грация [19]. Константу скорости адсорбции рассчитывали за 20-минутный период по формуле Адамса [19].

Одиночный цикл развития бактериофага

Клетки *P. aeruginosa* ATCC 27853, выращенные в жидкой питательной среде ГРМ-бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия) до оптической плотности (OD₆₀₀ = 0,5–0,6), осаждали центрифугированием при 7000 g в течение 10 мин при 4°C и ресуспендировали в 1 мл ГРМ-бульона. Затем вносили фаг при кратности заражения MOI = 0,001. После адсорбции смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 3 мин для удаления неабсорбированных частиц фага. Осадок растворяли в 20 мл используемой жидкой питательной среды и проводили отбор по 0,1 мл с интервалами в 5 мин на протяжении всего времени культивирования при температуре 37°C (120 мин). Для учета количества свободных вирусных частиц проводили титрование суспензии в полужидком агаре по методу Грация [19].

Устойчивость фага Ph_15 к температуре, pH среды

Температурный спектр устойчивости бактериофага Ph_15 изучали при путем выдерживания фага в диапазоне температур от 8 до 65°C в течение 1 ч. Для оценки стабильности Ph_15 в различных pH суспензию фага (10⁸ БОЕ/мл) инкубировали в растворах pH со значениями от 3 до 12 в течение 1 ч. Влияние температуры и pH среды на стабильность фага

Ph_15 оценивали при помощи определения титра бактериофага стандартным двухслойным методом [19].

Оценка специфичности и спектра литической активности бактериофага

Для определения специфичности фага использовали патогены группы ESKAPE: *Klebsiella pneumoniae* ($n = 17$), *Enterococcus faecium* ($n = 3$), *Staphylococcus aureus* ($n = 3$), *Acinetobacter baumannii* ($n = 3$) и *Enterobacter species* ($n = 3$). Для оценки спектра литического действия использовали клинические штаммы *P. aeruginosa* ($n = 85$). Исследования проводили методом спот-тестирования (Spot-test) [19]. Бактериальные суспензии (10^8 – 10^9 КОЕ/мл) в объеме 0,3 мл смешивали с полужидким агаром (LB-бульон с добавлением 0,6% агарозы) и распределяли по поверхности основного слоя питательного агара. После застывания слоя с полужидким агаром на поверхность наносили по 10 мкл фаголизата с концентрацией фага не менее 10^8 БОЕ/мл и инкубировали при температуре 37°C в течение 18–24 ч. При визуальном осмотре на чашках с чувствительными штаммами *P. aeruginosa* в местах нанесения капли фаголизата наблюдали образование прозрачного пятна лизиса (отсутствие роста бактериальной культуры).

Определение эффективности применения бактериофагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок *P. aeruginosa*

Тест-поверхности с биопленкой обрабатывали суспензией бактериофага ($(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^9$ БОЕ/мл) в течение 30, 60, 120, 180, 360 мин и 24 ч. После обработки переносили в растворы дезинфицирующих веществ (бензалкония хлорид, N,N-бис(3-аминопропил)-додециламин, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, хлоргексидина биглюконат, перекись водорода, диоксид хлора, дихлоризоцианурат натрия, гипохлорит натрия, нейтральный анолит, глутаровый и ортофталевый альдегиды) на 15 мин. Далее тест-поверхности переносили в раствор нейтрализатора, после чего отмывали трехкратно в SM-буфере, переносили в пробирки с жидкой питательной средой и инкубировали при температуре 37° в течение 48 ч. Критерием эффективности разрушения биопленки считали 100%-ю инактивацию бактериальных клеток в ее составе, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде. В качестве контроля вместо дезинфицирующего вещества использовали стерильную воду.

Электронная микроскопия

Препарат бактериофага с титром (10^9 БОЕ/мл) наносили на медные подложки Formvar для электронно-микроскопических исследований. После высушивания образец окрашивали 0,3%-м водным раствором уранилацетата (pH 4,0). Исследования проводили на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Токио, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Для визуализации соотношения живых/мертвых бактериальных клеток в биопленке использовали метод двойного окрашивания на основе проникаемого для живых клеток SYTO-60 (красный флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот) и непроницаемого для мембран живых клеток TOTO-1 (зеленый флуоресцентный краситель, непроницае-

мый для мембран живых клеток, используется для визуализации мертвых клеток и внеклеточной ДНК). Для окрашивания матрикса тест-поверхности с биопленкой помещали в 8 луночный планшет, вносили краситель TOTO-1 (Invitrogen, T3600, США) и оставляли на 15 мин в темноте. Далее отбирали раствор первого красителя и добавляли краситель SYTO-60 (Invitrogen, S11342, США) для окрашивания живых клеток. Через 15 мин образцы отмывали и фиксировали 0,25%-м раствором глутарового альдегида [20]. Визуализацию образцов проводили с помощью конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (OLYMPUS, Токио, Япония) с масляной иммерсией при увеличении объектива $\times 60$ (объектив UPLXPO60XO 60.0X/1.518 Oil, N/A 1,42, U-DIC60). Для визуализации использовали диодные лазеры с длиной волны излучения 488 и 640 нм для окрашенных TOTO-1 и SYTO-60 образцов соответственно. Мощность лазеров составляла 10% от максимальной. Анализ образцов слепым методом и получение трехмерных изображений проводили с интервалом по оси Z 0,36 мкм. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения cellSens Dimension (Olympus Europa SE & Co. KG, Гамбург, Германия) с использованием плагинов Bio-formats и Comstat2 (Университет Копенгагена, Копенгаген, Дания).

Выделение ДНК бактериофага

Выделение ДНК бактериофага проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [21]. Для деградации нуклеиновых кислот штамма-хозяина фаголизаты предварительно обрабатывали растворами нуклеаз (RNase A, DNase and protease-free (10 mg/mL), Thermo Scientific™, США) с последующим добавлением 0,5 М NaCl и ПЭГ 8000 (конечная концентрация 10%). После центрифугирования осадок растворяли в 0,5 мл SM-буфера и инкубировали в присутствии 0,5% SDS, 0,5 М ЭДТА (pH = 8,0) и 50 мкг/мл протеиназы К при 37°C в течении 2 ч (для инактивации фермента образец прогревали 20 мин при 65°C). Далее раствор обрабатывали фенол-хлороформной смесью для разделения фаз. Для очистки нуклеиновых кислот использовали смесь хлороформа и изоамилового спирта с последующей обработкой образца 96%-м охлажденным этиловым спиртом. После центрифугирования и высушивания полученную ДНК растворяли в 50 мкл $\times 1$ TE-буфера и хранили при -20°C.

Секвенирование и аннотация генома фага Ph_15

Для секвенирования генома использовали платформу GenoLab M (GeneMind Biosciences, Гуандун, Китай) с использованием набора Sequencing Reagent V1.0. Для сборки и редактирования полного генома фага использовали программы Newbler 2.9. и SeqMan NGen. Аннотирование геномной последовательности осуществляли с помощью программ GeneMark [22] (<https://exon.gatech.edu/>), RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) [23] и NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [24].

Построение филогенетических деревьев проводили с использованием PhyML+SMS/OneClick-алгоритма (параметры по умолчанию) web-сервиса NGPhylogeny.fr [25]. Для исследования были взяты аминокислотные последовательности ДНК-полимеразы (GeneBank:XXK85028.1) и основного головного белка капсида (GeneBank: XXK85012.1) бактерио-

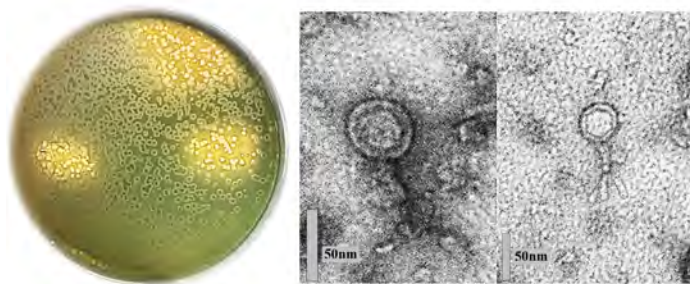


Рис. 1. Негативные колонии бактериофага Ph_15 на газоне штамма-хозяина *P. aeruginosa* ATCC 27853 (слева). Электронная микрофотография фаговых частиц (справа).
 Fig. 1. Negative colonies of bacteriophage Ph_15 on a lawn of the host strain *P. aeruginosa* ATCC 27853 (left). Electron micrograph of phage particles (right).

фага Ph_15. Реконструкцию и редактирование филогенетических деревьев осуществляли с использованием сервиса iTOL [26].

Результаты исследования и их обсуждение

Микробиологическая характеристика бактериофага Ph_15

Бактериофаг Ph_15 был выделен из проб воды Московской области методом обогащения [19]. На бактериальном газоне штамма-хозяина *P. aeruginosa* ATCC 27853 фаг образовывал прозрачные негативные колонии диаметром $5,0 \pm 1,0$ мм с наличием зон неполного лизиса (рис. 1).

По данным электронной микроскопии фаговых частиц выявлено, что бактериофаг Ph_15 имеет головку икосаэдрической формы (40 нм) и хвостовой отросток такой же величины (рис. 1).

Результаты анализа специфичности показали, что бактериофаг Ph_15 является высокоспецифичным в отношении бактерий рода *P. aeruginosa* в отличие от других исследуемых патогенов группы ESKAPE. При этом спектр литической активности штамма бактериофага Ph_15 составил 67,2% и определяется как широкий.

Адсорбция и одиночный цикл развития фага

Для бактериофага Ph_15 были изучены количественные параметры роста посредством оценки скорости адсорбции и определения одиночного цикла развития. Бактериофаг Ph_15 обладал средней скоростью адсорбции. Показано, что >90% частиц фага адсорбировалось на клетках штамма-хозяина в течение 20 мин (рис. 2), при этом константа адсорбции составила $2,2 \cdot 10^9$ мл/мин.

При исследовании одиночного цикла развития было выявлено, что длительность латентного периода (L) бактериофага составляет 30 мин, а выход бактериофага (BS) – $64,4 \pm 2,8$ частицы на зараженную клетку (рис. 3).

Устойчивость фага Ph_15 к температуре и pH среды

К наиболее важным параметрам, влияющим на литическую активность и стабильность бактериофагов при хранении, относятся значение pH среды и устойчивость к температурному воздействию.

Экспериментально показано, что титр бактериофага Ph_15 не менялся в течение 24 ч в случае инкубирования

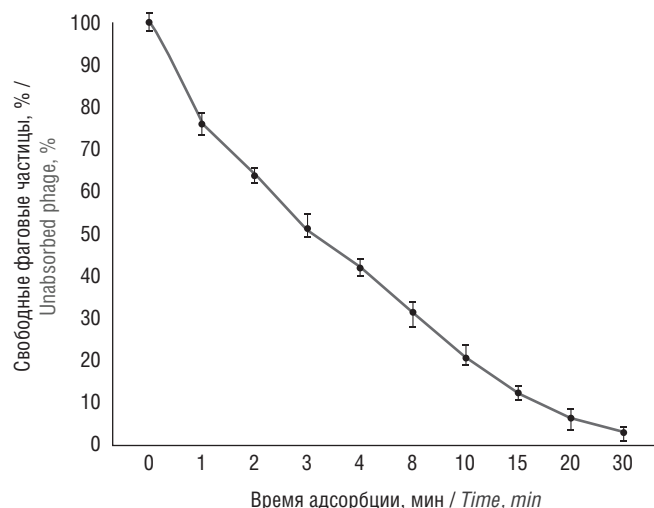


Рис. 2. Динамика адсорбции бактериофага Ph_15.
 Fig. 2. Dynamics of adsorption of bacteriophage Ph_15.

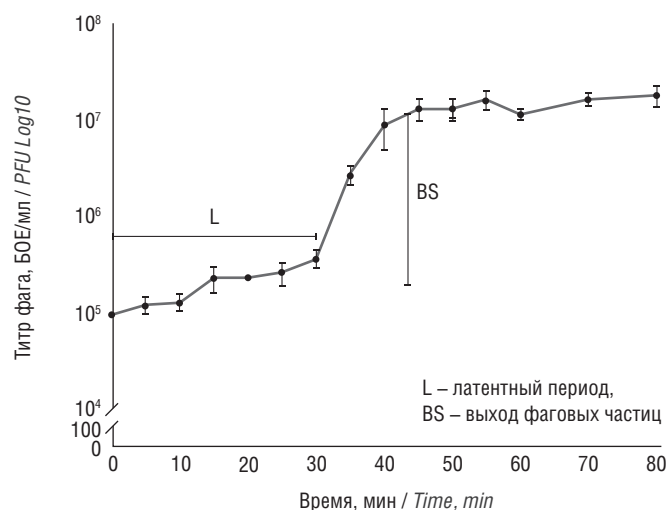


Рис. 3. Кривая одиночного цикла развития бактериофага Ph_15.
 Fig. 3. One-step growth curves of phage Ph_15.

при значениях pH от 4 до 9. В то же время экстремальные значения pH 3 и 12 существенно влияли на стабильность фага и способность инфицировать бактериальные клетки (рис. 4).

При изучении устойчивости фага Ph_15 к воздействию температур установлено, что фаг остается стабильным в диапазоне от +8° до +70°. При этом повышение температуры до +92° вызывает полную инактивацию фага (рис. 5).

Воздействие бактериофага Ph_15 на биопленки *P. aeruginosa*

Несмотря на то, что разрушение биопленок бактериофагами описано во многих работах [15, 27, 28], механизмы данного процесса до конца не изучены. Ранее описано, что разрушение биопленки связано с воздействием экзополисахарид-деградирующих ферментов в составе бактериофагов на полимерную структуру капсулы [28]. Воздействие бактериофага Ph_15 на культуру *P. aeruginosa* предполагает наличие аналогичных ферментов, что подтверждается образованием ореолов вокруг негативных колоний бактериофага.

В экспериментах по оценке активности изучаемого фага в отношении биопленок для их моделирования использова-

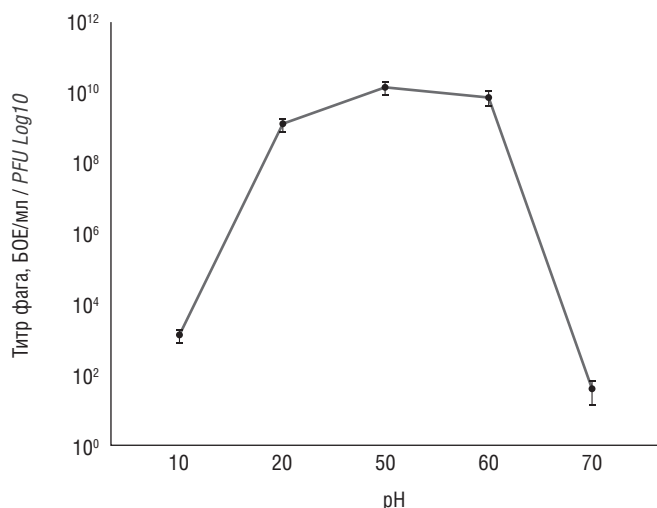


Рис. 4. Влияние pH среды на фаг Ph_15.
 Fig. 4. Effect of pH environment on Ph_15 phage.

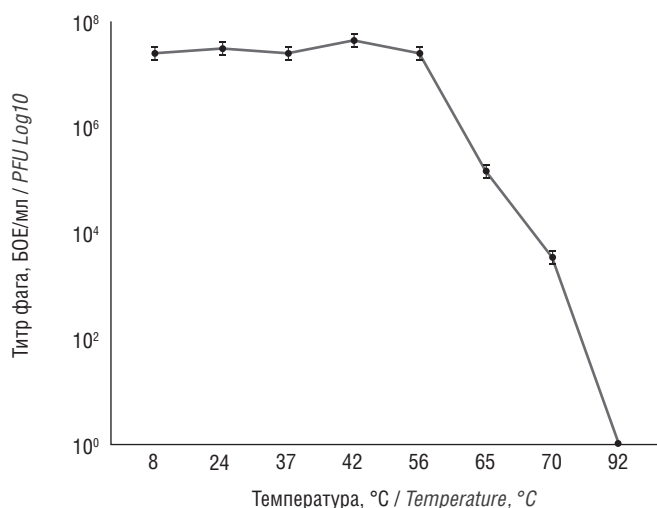


Рис. 5. Влияние температуры на активность фага Ph_15.
 Fig. 5. Effect of temperature on phage Ph_15 activity.

ли штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* F-19-4pa/19, обладающие самой высокой интенсивностью биопленкообразования и наиболее устойчивые к большинству дезинфицирующих веществ.

Покровные стекла со сформированной биопленкой (48 ч) погружали в суспензию бактериофага на 30, 60, 120, 180, 360 мин и 24 ч, трехкратно отмывали SM-буфером, помещали в пробирки с жидкой питательной средой ГРМ-бульон и инкубировали в термостате при 37°C в течение 48 ч. Критерием эффективности разрушения биопленки считали 100%-ю инактивацию бактериальных клеток в ее составе, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде. Воздействие бактериофага на структуру биопленки оценивали визуально при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛКСМ).

При ЛКСМ-анализе биопленки выявлена характерная трехмерная структура их организации. Толщина сформированной биопленки колебалась в пределах 30–40 мкм. На изображениях поперечных оптических срезов была хорошо видна периферическая локализация бактериальных агрегатов, расположенных в хаотичном порядке (рис. 6, А, верхний ряд). Схожие данные о формировании биологических пленок описаны в исследовании американских ученых, опубликованном в 2019 г. [29].

При воздействии бактериофага Ph_15 на биопленки в течение 30 мин – 24 ч наблюдали помутнение жидкой питательной среды в пробирках. При воздействии бактериофага Ph_15 в течении 30 мин наблюдали разрушение экзополисахаридного матрикса и снижение толщины биопленок до 10 мкм (рис. 6, Б, нижний ряд). При этом действие фага практически не затрагивало бактериальные клетки, расположенные внутри биопленки. При увеличении времени воздействия до 60 мин отмечали частичный лизис бактериальных клеток, расположенных в верхних слоях биопленки (рис. 6, В, нижний ряд). Дальнейшее увеличение времени воздействия до 24 ч не приводило к полному разрушению биологических пленок, что указывает на остаточное количество жизнеспособных клеток. Несмотря на высокую литическую активность исследуемого фага в отношении планктонных форм *P. aeruginosa*, обработка биопленок фагом не приводила к их разрушению и полному лизису бактериальных клеток.

Согласно данным, опубликованным Chan et al. [30], бактериофаги разрушают экзополисахаридный матрикс биопленки с помощью литических ферментов. На основании этого можно предположить, что способность бактериофага Ph_15 разрушать матрикс биопленки обусловлена наличием подобных ферментов.

Для оценки эффективности комплексного применения фагов и дезинфицирующих веществ покровные стекла с биопленкой погружали в суспензию бактериофага на 30 мин и далее переносили в растворы исследуемых дезинфицирующих веществ на 15 мин. Критерием эффективности комплексной обработки считали 100%-ю инактивацию бактериальных клеток в составе биопленки, о чем судили по отсутствию роста в жидкой питательной среде.

Было показано, что предварительная обработка биопленки бактериофагом Ph_15 позволяет снизить значения показателей минимальных бактерицидных концентраций дезинфицирующих веществ, необходимых для разрушения биологических пленок *P. aeruginosa*, от 2 до 25 раз в зависимости от применяемого вещества. Аналогичные данные, описывающие эффективность комплексного использования фагов и дезинфицирующих средств для улучшения инактивации ассоциированных с поверхностью биопленок *P. aeruginosa*, были получены Stachler et al. [31].

На основании полученных результатов была подтверждена возможность использования бактериофага Ph_15 для разрушения экзополисахаридного матрикса биологических пленок *P. aeruginosa*.

Геномная характеристика фага Ph_15

Согласно результатам секвенирования и сборки, геном бактериофага Ph_15 представлен линейной двухцепочечной ДНК размером 43 260 пар нуклеотидов и GC-составом 45,37%. С помощью биоинформатических программ BLAST и RAST в геноме бактериофага Ph_15 было выявлено 52 открытых рамки считывания (ОРС), кодирующих предполагаемые пептиды от 48 до 1849 азотистых оснований (а.о.), из которых 18 ОРС располагаются на прямой, 34 ОРС – на обратной цепях ДНК. Для 36,5% кодируемых белков опреде-

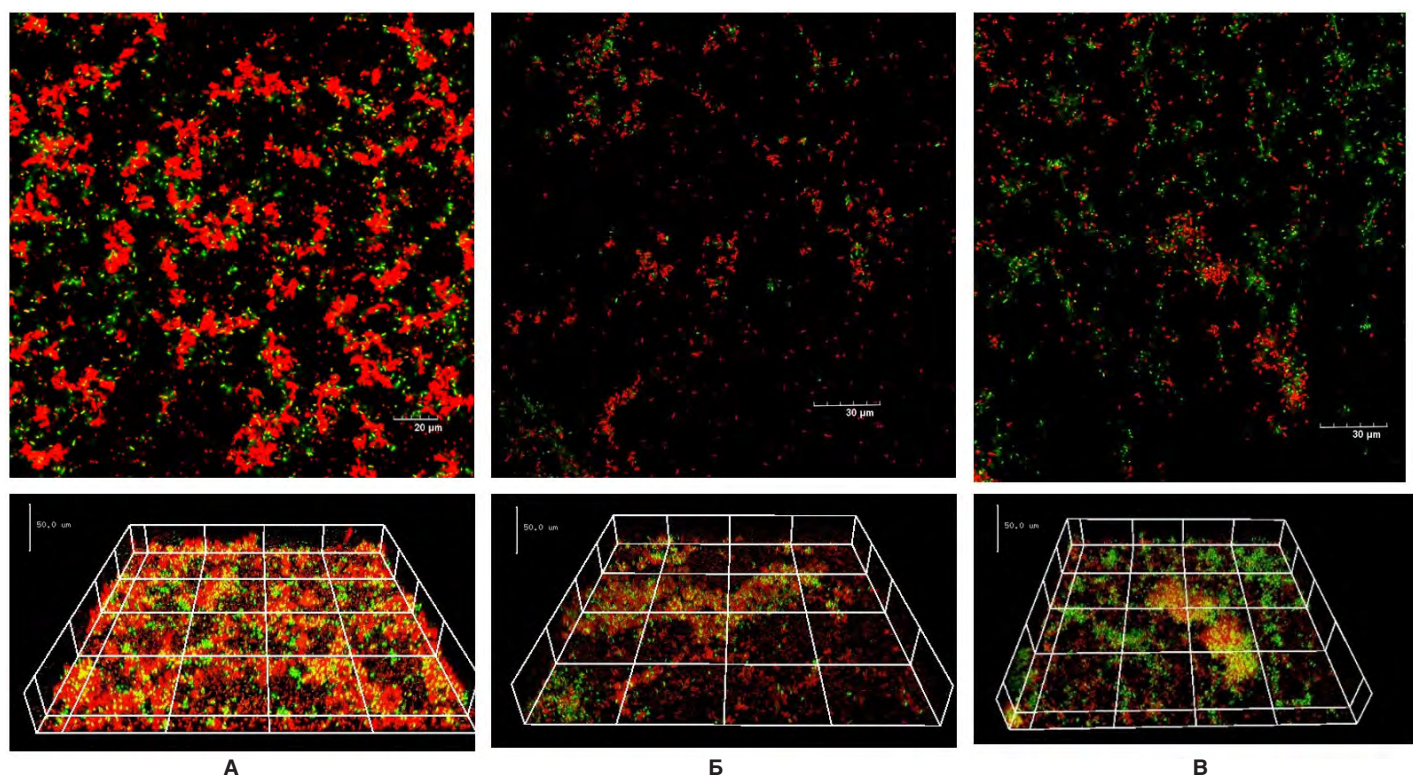


Рис. 6. Воздействие бактериофага Ph_15 на биопленку *P. aeruginosa* F-19-4PA/19: А – сформированная биопленка *P. aeruginosa*; Б – биопленка *P. aeruginosa* после воздействия фага (30 мин); В – биопленка *P. aeruginosa* после воздействия фага (60 мин); верхний ряд – поперечные оптические срезы БП; нижний ряд – 3D-визуализация БП; красным – живые клетки; зеленым – мертвые клетки.

Fig. 6. Effect of bacteriophage Ph_15 on *P. aeruginosa* biofilm F-19-4PA/19: A – formed *P. aeruginosa* biofilm; B – *P. aeruginosa* biofilm after exposure to phage (30 min); C – *P. aeruginosa* biofilm after exposure to phage (60 min); top row – transverse optical sections of biofilm; bottom row – 3D visualization of biofilm; red – living cells; green – dead cells.

лены предполагаемые функции. Оставшуюся часть генома (33 ОРС) составляют гипотетические полипептиды с неизвестной функцией. В число идентифицированных белок-кодирующих последовательностей входят восемь белков, участвующих в структуре и упаковке фага, восемь для репликации ДНК и метаболизма, три для лизиса и один

вспомогательный метаболический ген. Аннотированы геномные последовательности белка, участвующего в упаковке ДНК (большая субъединица терминазы), структурные белки фага (основной белок капсида, внутренние белки вириона и порталных белков). Выявлены гены, кодирующие белки лизиса бактериальных клеток (спанин, трансгликозилаза) и

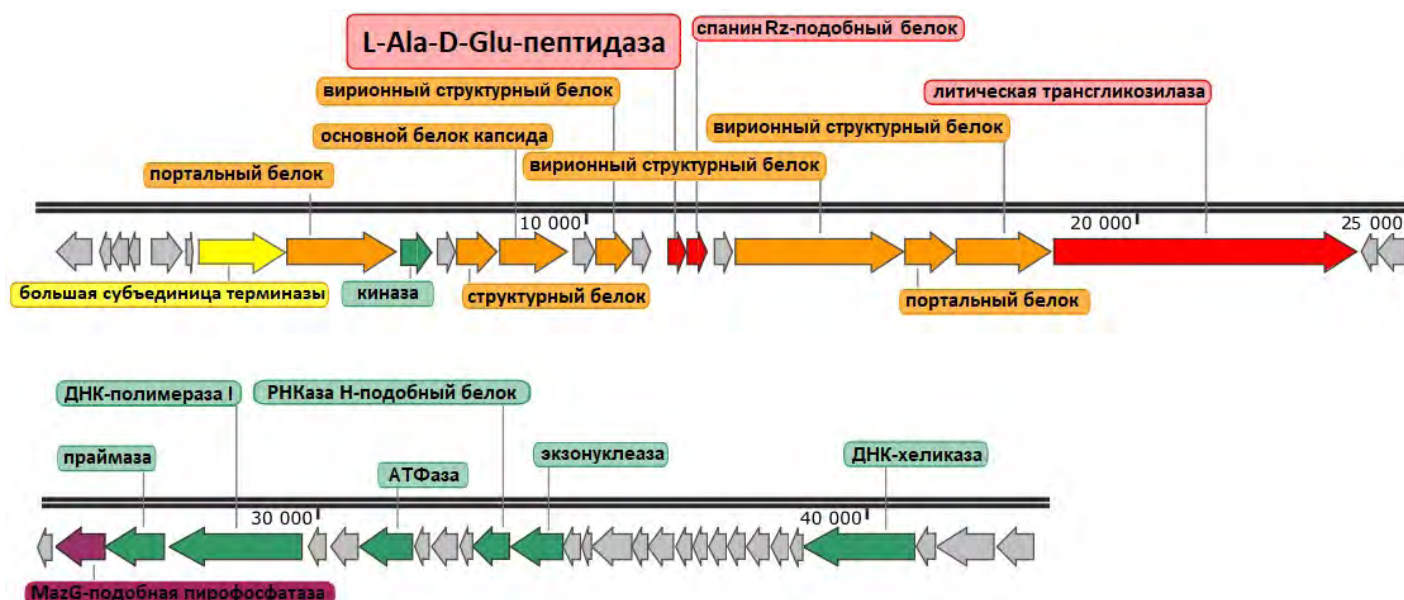


Рис. 7. Генетическая карта бактериофага Ph_15.

Fig. 7. Genetic map of bacteriophage Ph_15.

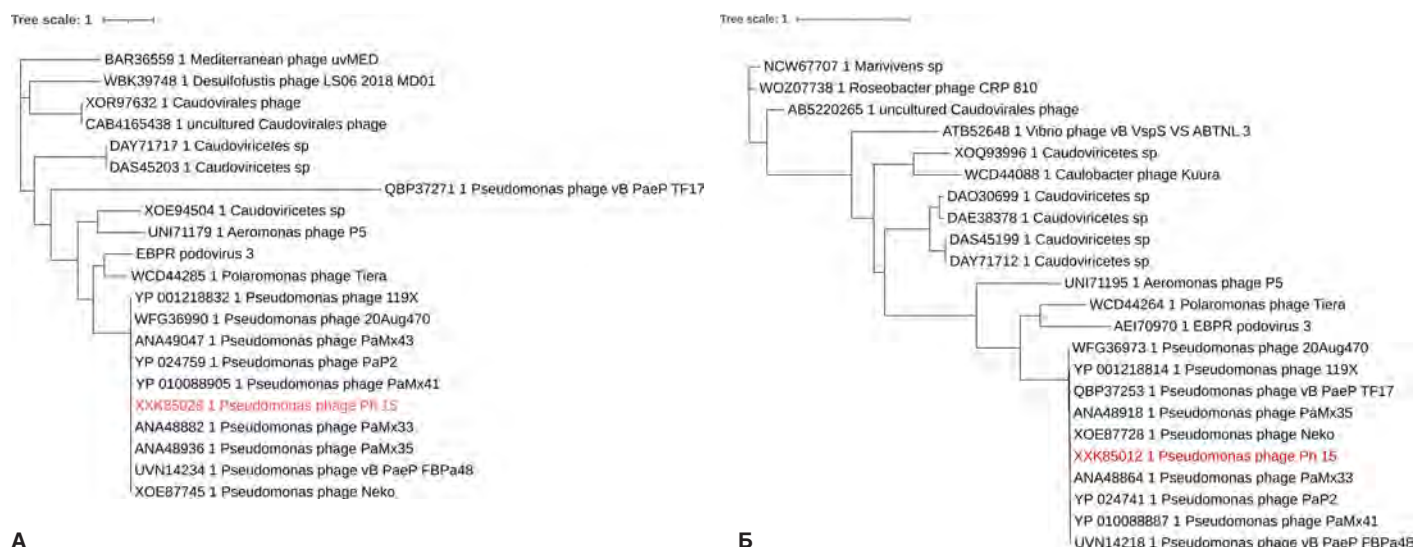


Рис. 8. Филогенетические деревья, построенные на основе выравнивания аминокислотных последовательностей ДНК-полимеразы (А) и основного головного белка капсида (Б).

Fig. 8. Phylogenetic trees constructed based on the alignment of amino acid sequences of DNA polymerase (A) and major head protein (B).

пептидогликанразрушающий фермент (L-Ala-D-Glu-пептидаза). При этом наличие последнего фермента определяет активность фага в отношении экзополисахаридного матрикса биологических пленок *P. aeruginosa*. Установлено, что механизм воздействия бактериофага Ph₁₅ на структуру экзополисахаридного матрикса биологических пленок *P. aeruginosa* основан на взаимодействии L-Ala-D-Glu-пептидазы с полимерной структурой капсулы, что способствует диспергированию полисахаридного матрикса до мономерных структур и разрушению биопленки.

В геноме фага не было обнаружено тРНК, а также генов, ответственных за лизогенный путь развития бактериофага и ассоциированных с устойчивостью к антибактериальным препаратам (рис. 7).

Согласно классификации, принятой Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses/ICTV), фаг Ph₁₅ принадлежит к отряду хвостатых фагов *Caudoviricetes*. На основании гомологии нуклеотидных последовательностей бактериофаг отнесен к семейству *Fredfastierviridae* (род *Jamesmcgillvirus*). На уровне генома фаг Ph₁₅ продемонстрировал высокую степень сходства с несколькими фагами группы подовирусов. Сравнительный геномный анализ выявил высокую гомологию между ДНК фага Ph₁₅ и литических бактериофагов, выделенных из окружающей среды в Мексике в 2016 и 2023 гг. (GenBank: KU884564.1; KU884565.1; KU884561.1; NC_055711.1) [32], ДНК фага 20Aug470, выделенного в 2023 г. в Израиле (GenBank: OQ319931.1), а также фага PaP2 (GenBank: NC_005884.1), выделенного в 2004 г. в Китае [33]. Идентичность сходства этих фагов составляет 97–98% при величине покрытия 100%. Все перечисленные фаги относятся к семейству *Fredfastierviridae* рода *Jamesmcgillvirus*.

Филогенетический анализ генома бактериофага Ph₁₅

Таксономическая связь Ph₁₅ с фагами рода *Jamesmcgillvirus* подтверждена филогенетическим анализом, основанным на множественных выравниваниях аминокислотных последовательностей ДНК-полимеразы и основного

головного белка капсида представителей разных родов семейства *Fredfastierviridae* (рис. 8).

Гомология последовательностей указывает на возможное наличие общего предка с 119X-подобными фагами и в целом предоставляет информацию о разнообразии подофагов *P. aeruginosa*.

Таким образом, была определена полная нуклеотидная последовательность ДНК бактериофага семейства *Fredfastierviridae* рода *Jamesmcgillvirus*, лизирующего бактерии *P. aeruginosa*. Аннотированная последовательность генома фага Ph₁₅ депонирована в GenBank под номером PV845595.1.

Заключение

В ходе проделанной работы описан новый бактериофаг Ph₁₅, обладающий выраженной литической активностью (67,2%) в отношении *P. aeruginosa*, относящийся к отряду *Caudoviricetes* семейства *Fredfastierviridae* рода *Jamesmcgillvirus*.

Выявлено, что воздействие бактериофага Ph₁₅ на биопленку *P. aeruginosa* приводит к разрушению экзополисахаридного матрикса, что обусловлено наличием у него литических ферментов.

Показано, что геном бактериофага Ph₁₅ представлен линейной двухцепочечной ДНК размером 43 260 пар нуклеотидов. В число идентифицированных белок-кодирующих последовательностей входят восемь белков, участвующих в структуре и упаковке фага, восемь для репликации ДНК и метаболизма, три для лизиса и один вспомогательный метаболический ген. Идентифицированы гены, кодирующие белки лизиса бактериальных клеток (спанин, трансгликозилаза) и пептидогликанразрушающий фермент (L-Ala-D-Glu-пептидаза). Установлено, что механизм воздействия бактериофага Ph₁₅ на структуру экзополисахаридного матрикса биологических пленок *P. aeruginosa* основан на взаимодействии L-Ala-D-Glu-пептидазы с полимерной структурой кап-

сулы, что способствует диспергированию полисахаридного матрикса до мономерных структур и разрушению биопленки. Аннотированная последовательность генома фага Ph_15 депонирована в GenBank под номером PV845595.1.

В данном исследовании показана важная роль фагов в разрушении и инактивации биопленок *P. aeruginosa*. Полученные данные представляют интерес для клинической микробиологии и эпидемиологии, поскольку должны учитываться при оценке эпидемической ситуации, прогнозе ее развития и выборе оптимальных стратегий санитарной обработки.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Salleh MZ, Nik Zuraina NMN, Deris ZZ, Mohamed Z. Current trends in the epidemiology of multidrug-resistant and beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Asia and Africa: a systematic review and meta-analysis. *Peer J*. 2025 Feb 24;13:e18986. DOI: 10.7717/peerj.18986
2. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2020 May 13;33(3):e00181-19. DOI: 10.1128/CMR.00181-19
3. World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2024. Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789240093461>
4. Rawat N, Sheoran S, Khan J, Khan R, Alzobaidi N, Alhalmi A. Different aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: an in-depth analysis from formation to detection. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2025 Aug;398(8):9529-9549. DOI: 10.1007/s00210-025-03971-w
5. Tuon FF, Dantas LR, Suss PH, Tasca Ribeiro VS. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*. 2022 Feb 27;11(3):300. DOI: 10.3390/pathogens11030300
6. Ito CAS, Bail L, Arend LNVS, Nogueira KDS, Tuon FF. The activity of ceftazidime/avibactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Dis (Lond)*. 2021 May;53(5):386-389. DOI: 10.1080/23744235.2020.1867763
7. Bail L, Ito CAS, Arend LNVS, Nogueira KDS, Tuon FF. Activity of imipenem-relebactam and ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and KPC-producing *Enterobacterales*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2022 Jan;102(1):115568. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115568
8. Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górka S, Gamian A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* – the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017 Feb 14;71(0):78-91. DOI: 10.5604/01.3001.0010.3792
9. Vasina DV, Antonova NP, Grigoriev IV, Yakimakha VS, Lendel AM, Nikiforova MA, et al. Discovering the potentials of four phage endolysins to combat gram-negative infections. *Front Microbiol*. 2021;12:748718. DOI: 10.3389/fmicb.2021.748718
10. Shokri D, Soleimani-Delfan A & Fatemi SM. Assessment of phage cocktails with extended host range activity against antibiotic resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Comp Clin Pathol*. 2017;26:417-422. DOI: 10.1007/s00580-016-2394-y
11. Duplessis C, Biswas B, Hanisch B, Perkins M, Henry M, Quinones J, et al. Refractory *Pseudomonas* bacteremia in a 2-year-old sterilized by bacteriophage therapy. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2018 Aug 17;7(3):253-256. DOI: 10.1093/jpids/pix056
12. Chan BK, Turner PE, Kim S, Mojibian HR, Elefteriades JA, Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol Med Public Health*. 2018 Mar 8;2018(1):60-66. DOI: 10.1093/emph/eoy005
13. Yuan Y, Qu K, Tan D, Li X, Wang L, Cong C, et al. Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb Pathog*. 2019 Mar;128:329-336. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.01.032
14. Doub JB, Ng VY, Johnson AJ, Slomka M, Fackler J, Horne B, et al. Salvage Bacteriophage therapy for a chronic MRSA prosthetic joint infection. *Antibiotics (Basel)*. 2020 May 9;9(5):241. DOI: 10.3390/antibiotics9050241
15. Namonyo S, Weynberg K, Guo J, Carvalho G. The effectiveness and role of phages in the disruption and inactivation of clinical *P. aeruginosa* biofilms. *Environmental Research*. 2023;234:116586. DOI: 10.1016/j.envres.2023.116586
16. Adnan M, Ali Shah MR, Jamal M, Jalil F, Andleeb S, Nawaz MA, et al. Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. *Biologicals*. 2020 Jan;63:89-96. DOI: 10.1016/j.biologicals.2019.10.003
17. Alqahtani A. Bacteriophage treatment as an alternative therapy for multidrug-resistant bacteria. *Saudi Med J*. 2023 Dec;44(12):1222-1231. DOI: 10.15537/smj.2023.44.12.20230366
18. Колупаева НВ, Щербакова ОА, Колупаева ЛВ, Грищенко НС, Рудницкая ТИ, Кузин ВВ. Комплексное применение бактериофагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок *Pseudomonas aeruginosa*. *Бактериология*. 2024;9(4):67-74. / Kolupaeva NV, Shcherbakova OA, Kolupaeva LV, Grishchenko NS, Rudnitskaya TI, Kuzin VV. Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Bacteriology*. 2024;9(4):67-74. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-67-74 (In Russian).
19. Adams MH. Bacteriophages; Interscience Publishers: New York, NY, USA, 1959.
20. Diuvenji EV, Nevolina ED, Solovyev ID, Sukhacheva MV, Mart'yanov SV, Novikova AS, et al. A-Type Natriuretic Peptide Alters the Impact of Azithromycin on Planktonic Culture and on (Monospecies and Binary) Biofilms of Skin Bacteria *Kytococcus schroeteri* and *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*. 2023 Dec 12;11(12):2965. DOI: 10.3390/microorganisms11122965
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989.
22. Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jun 15;29(12):2607-18. DOI: 10.1093/nar/29.12.2607
23. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008 Feb 8;9:75. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75
24. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
25. Lemoine F, Correia D, Lefort V, Doppelt-Azeroual O, Mareuil F, Cohen-Boulakia S, et al. NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W260-W265. DOI: 10.1093/nar/gkz303
26. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res*. 2024 Jul 5;52(W1):W78-W82. DOI: 10.1093/nar/gkae268
27. Попова АВ, Мякинина ВП, Платонов МЕ, Воложанцев НВ. Молекулярно-генетическая характеристика антибиотикостойчивых штаммов *Acinetobacter baumannii* и оценка их чувствительности к бактериофагу ар22. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012;4:18-22. / Popova AV, Myakiniina VP, Platonov ME, Volozhantsev NV. Molecular genetic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains and assessment of their

- sensitivity to phage ap22. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2012;4:18-22. (In Russian).
28. Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters*. 2004;232:1-6. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00041-2
29. Reichhardt C, Parsek MR. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Front Microbiol*. 2019;10:677. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00677
30. Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Curr Pharm Des*. 2015;21(1):85-99. DOI: 10.2174/138161282066140905112311
31. Stachler E, Kull A, Julian TR. Bacteriophage treatment before chemical disinfection can enhance removal of plastic-surface-associated *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2021 Aug 4;87(20):e0098021. DOI: 10.1128/AEM.00980-21
32. Cruz-Plancarte I, Cazares A, Guarneros G. Genomic and transcriptional mapping of PaMx41, archetype of a new lineage of bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Oct 27;82(22):6541-6547. DOI: 10.1128/AEM.01415-16
33. Kwan T, Liu J, Dubow M, Gros P, Pelletier J. Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *J Bacteriol*. 2006 Feb;188(3):1184-7. DOI: 10.1128/JB.188.3.1184-1187.2006

Информация о соавторах:

Кузин Виктор Владимирович, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Щербак Ольга Анатольевна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Колупаева Любовь Вячеславовна, младший научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Калмантаева Ольга Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Сухаричева Наталья Алексеевна, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Грищенко Наталья Семёновна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Рудницкая Татьяна Ивановна, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кузина Екатерина Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела подготовки и усовершенствования специалистов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Viktor V. Kuzin, Researcher of the Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga A. Shcherbakova, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Lyubov V. Kolupaeva, Junior Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga V. Kalmantaeva, PhD in Biological Sciences, Researcher of Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalia A. Sukharicheva, Junior Researcher of Culture Collection Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Natalya S. Grishchenko, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Tatyana I. Rudnitskaya, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Ekaterina S. Kuzina, PhD in Biological Sciences, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Бактерии биопленки могут способствовать возникновению сердечных приступов

Спустя почти четыре десятилетия авторы сообщили, что затвердевшие холестериновые бляшки в артериях могут содержать бактерии полости рта, заключенные в биопленку, что делает их невосприимчивыми к антибиотикам и иммунной системе организма. Не сами бактерии, а реакция организма хозяина начинает разрушать структуры, приводящие к инфаркту миокарда. Эти результаты открывают возможности для разработки новых методов диагностики и предотвращения инфарктов, ориентированных на биопленку. Это еще одно доказательство, которое говорит о потенциальной инфекционной причине риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Чтобы глубже понять влияние бактерий на атеромы изучили артериальные бляшки, полученные от 121 жертвы внезапной смерти и 96 хирургических пациентов.

Количественные эксперименты ПЦР показали, что 65 процентов образцов бляшек внезапной смерти и 58 процентов хирургических бляшек имели ДНК оральных зеленящих стрептококков, в основном *Streptococcus mitis*. Чтобы определить присутствие реальных бактерий, а не только их ДНК, исследователи окрасили образцы антителами против трех наиболее распространенных зеленящих стрептококков и заметили, что более половины образцов внезапной смерти и хирургических операций показали присутствие бактерий в ядре бляшек. Когда они совместно окрасили бляшки биомаркером макрофагов, они заметили, что иммунные клетки не обнаружили бактериальные скопления внутри атером, что указывает на то, что бактерии были заключены в биопленку.

