

УДК 578.81+578.23

НОВЫЙ БАКТЕРИОФАГ *PSEUDOMONAS* PHAGE KA1 ИЗ ПРИТОКА ОЗЕРА БАЙКАЛ

© 2024 г. М. С. Федорова^{а, *}, А. Э. Гатина^а, В. Н. Ильина^а, Л. Л. Ядыкова^а,
В. В. Дрюккер^б, А. С. Горшкова^б, А. Р. Каюмов^а, Е. Ю. Тризна^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, Россия

^бЛимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, 664033, Иркутск, Россия

*e-mail: MaSFedorova97@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 02.11.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Из воды притока озера Байкал, в районе сброса очищенных сточных вод г. Слюдянка, выделен бактериофаг *Pseudomonas* phage Ka1. Геном бактериофага размером 46092 п.о. и 50% составом Г + Ц пар (AN OP455935.1) имеет идентичность в 91% с геномом *Pseudomonas* phage PSA37, относящимся к *Bruynoghevirus* из класса *Caudoviricetes*, что характеризует его как нового представителя Luz24-подобных фагов (*Bruynoghevirus*). Бактериофаг лизирует 62% клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* и способен повышать эффективность гентамицина, ципрофлоксацина, имипинема и меропенема в 4–8 раз в отношении этой бактерии. В геноме не идентифицировано интеграз, транспозаз и рекомбиназ, что делает *Pseudomonas* phage Ka1 возможным для использования в комплексной терапии инфекций, вызванных *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: бактериофаг, фаготерапия, антибиотикорезистентность, *Pseudomonas aeruginosa*

DOI: 10.31857/S0026365624040126

На сегодняшний день бактериальные инфекции являются одной из острых проблем в сфере здравоохранения (Mielko et al., 2019). Эволюционное давление, создаваемое активным использованием антибактериальных препаратов, приводит к кумулятивному приобретению устойчивости к антибиотикам у патогенов, способствуя появлению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). *Pseudomonas aeruginosa* вызывает тяжелые инфекции благодаря различным факторам вирулентности, а также способности формировать биопленки (Linlin et al., 2023). Перспективным решением данной проблемы является использование бактериофагов как отдельно, так и в сочетании с антимикробными препаратами, что позволит снизить общее количество используемых антибиотиков в клинической практике (Guo et al., 2020). Особенностью бактериофагов является их специфичность к бактериям-мишеням, что значительно снижает негативное влияние антимикробных препаратов на основе бактериофагов на нормальную микрофлору человека. Кроме того, бактериофаги показали многообещающие результаты при лечении устойчивых к антибиотикам инфекций *P. aeruginosa* (Rosa et al., 2021). Доказано,

что применение литических бактериофагов является эффективным подходом против антибиотикорезистентных бактерий, так как специфичность бактериофагов не зависит от устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам (Kortright et al., 2019). Помимо клинической практики, бактериофагов предложено использовать для устранения бактериальных загрязнений с поверхностей пищевых продуктов (Endersen et al., 2020).

В данной работе приводится характеристика нового бактериофага *Pseudomonas* phage Ka1, выделенного из воды притока озера Байкал, около места сброса очищенных сточных вод г. Слюдянка, а также повышение эффективности ципрофлоксацина, имипинема и меропенема при их совместном применении с бактериофагом в отношении *P. aeruginosa*.

Используемые штаммы. В работе использовали типовые штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PAO1 и *P. aeruginosa* 190158. Клинические изоляты *P. aeruginosa*, полученные от пациентов с низкой эффективностью противомикробной терапии, были предоставлены Казанским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии.

Бактериофаг *Pseudomonas* phage Ka1 был выделен в районе поступления очищенных сточных вод в приток озера Байкал.

Питательные среды и условия культивирования бактерий. Использовали питательную среду LB (Sambrook et al., 1989) (%): триптон — 1.0; дрожжевой экстракт — 0.5; NaCl — 1.5; pH 8.0 (агаризованная среда LB содержала дополнительно 1.5% агара) и полужидкую агаризованную среду (Ames, 1971) (г/л): агар — 6; NaCl — 6. Антимикробные препараты — гентамицин, амикацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, цефтриаксон, стрептомицин, эритромицин, азитромицин, ванкомицин, имипенем, меропенем и колистин — были приобретены в компании Sigma (США).

Получение фаголизата. В стерильную пробирку из зоны лизиса собирали слой верхнего полужидкого агара и ресуспендировали в 15 мл раствора 0.9% NaCl. Полученный раствор центрифугировали при 10 тыс. об./мин и супернатант фильтровали через шприцевой мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Полученный фаголизат хранили при 4°C.

Подсчет БОЕ бактериофагов. Подсчет БОЕ бактериофага проводили по методу Грациа (Gratia, 1936) с модификациями (Mazzocco et al., 2009). Для этого в лунки стерильного 96-луночного планшета вносили по 90 мкл 0.9% NaCl. В первую лунку добавляли 10 мкл фаголизата и в последующих лунках готовили серийные 10-кратные разведения фаголизата в стерильном физиологическом растворе. После чего из каждой лунки по 15 мкл суспензии вносили к 1 мл полужидкого агара, содержащего *P. aeruginosa* (10^7 КОЕ/мл), и заливали на поверхность плотной питательной среды в 35-мм чашки Петри. БОЕ подсчитывали из чашек, содержащих минимум 5 блюшек, умножая на коэффициент разведения.

Оценка чувствительности бактерий к бактериофагу. Способность фага лизировать клинические изоляты тестировали с помощью спот-теста, как описано в работе (Fong et al., 2009), с объемом капли 5 мкл. Для этого на чашки с питательной средой LA наносили 3 мл полужидкого LA, содержащего 30 мкл ночной культуры *P. aeruginosa* (10^7 КОЕ/мл). После застывания среды наносили капли фагового лизата объемом 5 мкл с концентрацией 10^8 БОЕ/мл, просушивали 15 мин и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Затем проводили оценку чувствительности по шкале: полная активность (++) — полностью прозрачное (не мутное) пятно, внутри которого не наблюдается роста бактерий; частичная активность (+) — мутное пятно, которое легко видно невооруженным глазом, или прозрачное пятно, содержащее изолированные колонии бактерий; отсутствие активности (—) — отсутствие легко различимого пятна невооруженным глазом. Все анализы блюшек проводили в трех биологических повторах.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Определение чувствительности изолятов *P. aeruginosa* к антибиотикам проводили на среде Мюллер-Хинтон (“Sigma”, США), согласно рекомендациям EUCAST (Leclercq et al., 2013), методом микроразведений при сочетании препаратов с бактериофагом или диско-диффузионным методом с использованием стандартных дисков с антибактериальными препаратами (Научно-исследовательский центр фармакотерапии (НИЦФ), г. Санкт-Петербург) при оценке спектра чувствительности изолята к антибиотикам.

Секвенирование и анализ генома. Shortgun-секвенирование с двуконцевыми прочтениями проводили на платформе Illumina MySeq. Качество прочтений после секвенирования ДНК бактериофага оценивали с помощью программы FastQC (Andrews, 2010), кольцевой геном был собран с помощью SnapGen DNA. Геном был аннотирован с помощью сервера Prokka (Seemann, 2014), распределение генов по функциональным категориям было проведено с помощью сервера RAST (Aziz et al., 2008). Идентифицированные рамки считывания белков бактериофага были верифицированы вручную с использованием алгоритма BLAST, сравнивая с базой данных NCBI GenPept.

Характеристика бактериофага *Pseudomonas* phage Ka1. Из притока озера Байкал в зоне сброса сточных вод вблизи г. Слюдянка был выделен изолят Ka1, способный лизировать клетки *P. aeruginosa* ATCC 27853. ДНК изолята была выделена с помощью коммерческого набора Viral RNA/DNA Mini Kit (“Invitrogen”) и проведено shortgun-секвенирование с двуконцевыми прочтениями на платформе Illumina MySeq. После удаления прочтений, относящихся к геному *P. aeruginosa* ATCC 27853, выход секвенирования составил 14.952 Мб. На основе оставшихся прочтений был собран кольцевой геном размером 46092 п.о. с уровнем ошибки 0.0028 и покрытием $316\times$, с 50%-ым содержанием Г + Ц пар. Сравнение генома с помощью алгоритма BLAST с базой данных GenBank выявило максимальную идентичность в 95.14% при покрытии 79% с геномом *Pseudomonas* phage PSA37 (AN MZ089740.1) рода *Bruynoghevirus* из класса *Caudoviricetes*. Выравнивание геномов бактериофагов Ka1 и PSA37 алгоритмом ClustalO показало 91% идентичности геномов, что позволяет утверждать, что выделен новый представитель Luz24-подобных фагов (*Bruynoghevirus*).

Полный кольцевой геном размером 46092 п.о. депонирован в Генбанке, AN OP455935.1. В результате аннотации генома идентифицирована 71 кодирующая последовательность (табл. S1). Из них 34 кодируют гипотетические полипептиды с неизвестной функцией. Выявлено 6 генов метаболизма аминокислот, 4 гена кодируют белки с нуклеазной активностью, 11 генов участвуют

Таблица 1. Чувствительность к бактериофагу Ka1 и профиль устойчивости к антибиотикам у клинических изолятов *P. aeruginosa*. Данные приведены из трех биологических повторов

Штамм/изолят <i>P. aeruginosa</i>	Резистентность к антимикробным препаратам	Чувствительность к бактериофагу ("++" – выраженный лизис, "+" – слабый лизис, "–" лизис не наблюдается)
1475	Л-R, Ц-R, Цаз-R, Г-R	–
293	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	+
305	Аз-R, Азл-R, Л-R, Г-R, П-R, Т-R, Цаз-R	–
449	Азл-R, Аз-R, П-R, Цаз-R	++
458	Г-R, Азл-R, Аз-R, П-R, Цаз-, Т-R	+
278	Аз-R, Азл-R, Г-R, П-R, Цаз-R	+
288	Азл-R, Аз-R, П-R, Цаз-R, Г-R	–
410	Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	++
443	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R, Т-R	–
250	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	–
4086	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	+
4241	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	+
3101	Азл-R, Аз-R, Л-R, П-R, Цаз-R, Г-R	+

Условные обозначения: Азлоциллин – Азл, Азтреонам – Аз, Гентамицин – Г, Левофлоксацин – Л, Меропенем – М, Пиперацилин – П, Тобрамицин – Т, Цефтазидим – Цаз.

в обмене нуклеиновых кислот, 20 генов кодируют структурные белки капсида и хвоста, 3 гена отвечают за синтез тРНК. При этом в геноме отсутствуют гены интегразы, транспозазы и рекомбиназы – потенциальных белков, связанных с переходом к лизогенному жизненному циклу. Также не идентифицируются гены литических ферментов, возможно, они входят в состав 34 белков с неизвестной функцией (рис. S1, табл. S1).

Оценка штаммоспецифичности бактериофага *Pseudomonas* phage Ka1. Следующим этапом была проведена оценка чувствительности различных типовых штаммов и клинических изолятов *P. aeruginosa* к бактериофагу Ka1 с помощью спот-теста с объемом капли 5 мкл (табл. 1). Все типовые штаммы оказались чувствительными к бактериофагу, при этом среди клинических изолятов только 62% штаммов (8 из 13) поддавались лизису (полная или частичная активность). Это говорит об узкой специфичности бактериофага к штаммам синегнойной палочки. При этом штаммы с множественной устойчивостью (изоляты 1475, 305, 410, 443, 293, 4086, 4241, 3101) также подвергаются лизису, хоть и с частичной активностью (табл. 1).

Следующим этапом с помощью метода серийных разведений исследовали синергетический эффект бактериофага Ka1 с 13 антимикробными препаратами: гентамицин, амикацин, цiproфлоксацин, норфлоксацин, цефтриаксон, цефтазидим, стрептомицин, эритромицин, азитромицин, ванкомицин, имипенем, меропенем и колистин. При сочетании с бактериофагом МПК гентамицина, цiproфлоксацина, имипенема и меропенема

снижались в 4–8 раз по сравнению с МПК чистого антибиотика, что свидетельствует о синергизме бактериофага с данными противомикробными препаратами (табл. 2).

В совокупности эти данные позволяют предположить, что бактериофаг Ka1 может быть

Таблица 2. Изменение минимальной подавляющей концентрации антибактериальных препаратов при сочетанном действии с бактериофагом Ka1. Приведены медианные значения из трех биологических повторов

Антибиотик	МПК, мкг/мл		
	– Ka1	+ Ka1	Уменьшение МПК
Гентамицин	2	0.5	4
Амикацин	2	1	2
Цiproфлоксацин	32	4	8
Норфлоксацин	>64	32	2
Цефтриаксон	>64	64	1
Цефтазидим	1	0.5	2
Азитромицин	>64	>64	1
Стрептомицин	>64	>64	1
Эритромицин	>64	>64	1
Ванкомицин	>64	>64	1
Имипенем	>64	16	4
Меропенем	>64	8	8
Колистин	8	4	2

предложен в качестве инструмента для повышения противомикробной активности имеющихся антибиотиков против *P. aeruginosa*, обладающих различным паттерном резистентности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения задания в сфере научной деятельности, Проект № FZSM2022-0017 (Е.Ю. Тризна), и госбюджетного проекта № 0279-2021-0015 (В.В. Дрюккер).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ф.М.С., Г.А.Э., И.В.Н., Я.Л.Л. — экспериментальные процедуры, К.А.Р., Т.Е.Ю., Д.В.В., Г.А.С. — руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ames B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria // Chemical mutagens: principles and methods for their detection. V. 1. Boston, MA: Springer US, 1971. P. 267–282.
- Andrews S., Krueger F., Segonds-Pichon A., Biggins L., Krueger C., Wingett S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.
- Aziz R., Bartels D., Best A., DeJongh M., Disz T., Edwards R., Formsma K., Gerdes S., Glass E., Kubal M., Meyer F., Olsen G., Olson R., Osterman A., Overbeek R., McNeil L., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch I G., Reich C., Stevens R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology // BMC Genomics. 2008. V. 9. Art. 75. P. 1–15.
- Endersen L., Coffey A. The use of bacteriophages for food safety // Curr. Opin. Food Sci. 2020. V. 36. P. 1–8.
- Ferry T., Kolenda C., Laurent F., Leboucher G., Merabishvili M., Djebara S., Gustave C.-A., Perpoint T., Barrey C., Pirnay J.-P., Resch G. Personalized bacteriophage therapy to treat pandrug-resistant spinal *Pseudomonas aeruginosa* infection // Nature Commun. 2022. V. 13. Art. 4239.
- Fister S., Mester P., Witte A.K., Sommer J., Schoder D., Rossmanith P. Part of the problem or the solution? Indiscriminate use of bacteriophages in the food industry can reduce their potential and impair growth-based detection methods // Trends Food Sci. Technol. 2019. V. 90. P. 170–174.
- Fong P., Boss D., Yap T., Tutt A., Wu P., Mergui-Roelvink M., Mortimer P., Swaisland H., Lau A., O'Connor M., Ashworth A., Carmichael J., Kaye S., Schellens J., de Bono J. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers // New England J. Med. 2009. V. 361. P. 123–134.
- Gratia A. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bactériophages // Annales de l'Institut Pasteur. Masson Publishing, France, 1936. T. 57.
- Guo Z., Lin H., Ji X., Yan G., Lei L., Han W., Gu J., Huang J. Therapeutic applications of lytic phages in human medicine // Microb. Pathogen. 2020. V. 142. Art. 104048.
- Kayumov A., Khakimullina E., Sharafutdinov I., Trizna E., Latypova L., Lien H., Margulis A., Bogachev M., Kurbangalieva A. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones // J. Antibiot. 2015. V. 68. P. 297–301.
- Kortright K., Chan B., Koff J., Turner P. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria // Cell Host & Microbe. 2019. V. 25. P. 219–232.
- Leclercq R., Canton R., Brown D., Giske C., Heisig P., MacGowan A., Mouton R., Nordmann P., Rodloff A., Rossolini G., Soussy C.-J., Steinbakk M., Winstanley T., Kahlmeter G. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing // Clin. Microbiol. Infect. 2013. V. 19. P. 141–160.
- Li L., Zhong Q., Zhao Y., Bao J., Liu B., Zhong Z., Wang J., Yang L., Zhang T., Cheng M., Wu N., Zhu T., Le S. First-in-human application of double-stranded RNA bacteriophage in the treatment of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection // Microb. Biotechnol. 2023. V. 16. P. 862–867.
- Mazzocco A., Waddell T., Lingohr E., Johnson R. Enumeration of bacteriophages using the small drop plaque assay system // Bacteriophages: methods and protocols. V. 1: Isolation, characterization, and interactions. 2009. P. 81–85.
- Mielko K., Jabłoński S., Milczewska J., Sands D., Łukasiewicz M., Młynarz P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35. P. 1–11.
- La Rosa R., Rossi E., Feist A., Johansen H., Molin S. Compensatory evolution of *Pseudomonas aeruginosa*'s slow growth phenotype suggests mechanisms of adaptation in cystic fibrosis // Nature Commun. 2021. V. 12. Art. 3186.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 2nd edn.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2068–2069.

SHORT COMMUNICATIONS

New Bacteriophage *Pseudomonas* Phage Ka1 from a Trivia of Lake Baikal

**M. S. Fedorova^{1, *}, A. E. Gatina¹, V. N. Ilyina¹, L. L. Yadykova¹,
V. V. Dryukker², A. S. Gorshkova², A. R. Kayumov¹, and E. Yu. Trizna¹**

¹Kazan (Volga Region) Federal University, 420008, Kazan, Russia

²Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 664033, Irkutsk, Russia

*e-mail: MaSFedorova97@mail.ru

Received October 14, 2023; revised November 02, 2023; accepted December 12, 2023

Abstract—The bacteriophage *Pseudomonas* phage Ka1 was isolated from the water of a tributary of Lake Baikal, in the area of discharge of treated wastewater in the city of Slyudyanka. The bacteriophage genome is 46,092 bp in size. and 50% composition of G + C pairs (AN OP455935.1) has 91% identity with the genome of *Pseudomonas* phage PSA37, belonging to the *Bruynoghevirus* from the class *Caudoviricetes*, which characterizes it as a new representative of Luz24-like phages (*Bruynoghevirus*). The bacteriophage lyses 62% of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and is able to increase the effectiveness of gentamicin, ciprofloxacin, imipinem and meropenem by 4–8 times against this bacterium. Integrases, transposases and recombinases are not identified in the genome, which makes *Pseudomonas* phage Ka1 possible for use in complex therapy of infections caused by *P. aeruginosa*.

Keywords: bacteriophage, phage therapy, antibiotic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*

*e-mail: MaSFedorova97@mail.ru

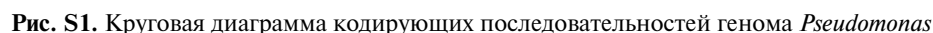


Таблица S1. Распределение генов бактериофага по функциональным категориям с помощью сервера RAST

Количество генов	Описание
2	Терминальный повтор
34	Гипотетический белок с неизвестной функцией
1	Аминокислотная лигаза
1	Гамма-глутамилциклотрансфераза
1	Гамма-глутамилциклотрансфераза
1	Амидолигаза
1	Нуклеофил-аминогидролаза
1	COOH-NH ₂ лигаза
1	Хеликаза/ДНК праймаза
2	ДНК-полимераза 1
1	N-H-N эндонуклеаза Cas9-подобный белок
6	Гипотетический мембранный белок
1	H-N-H эндонуклеаза самонаведения
1	Холин
1	Белок, связывающий одноцепочечную ДНК
1	Лоскутная (flap) эндонуклеаза
1	Нуклеотидилтрансфераза трнк/полиадениловая полимераз
1	Эндодезоксирибонуклеаза I
1	Металлофосфоэстераза
2	Rho-независимый терминатор
1	Фосфоацетатгидролаза
1	Двусторонний Rho-независимый терминатор
20	Структурные белки капсида и хвоста
2	N-ацетилтрансфераза
1	Крупная субъединица терминазы
1	Малая субъединица терминазы
1	Пролин-тРНК,
1	Тирозин-тРНК
1	Аспартат-тРНК