

Комплексное применение бактериофагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок *Pseudomonas aeruginosa*

Н.В.Колупаева, О.А.Щербакова, Л.В.Колупаева, Н.С.Грищенко, Т.И.Рудницкая, В.В.Кузин

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

Pseudomonas aeruginosa является возбудителем широкого спектра острых и хронических инфекций. Основная причина персистенции инфекций, вызванных данным патогеном, связана со способностью бактерии образовывать биопленки. Одной из ведущих терапевтических стратегий для лечения инфекций, связанных с антибиотикоустойчивыми штаммами *P. aeruginosa* и их биопленками, является фаготерапия. Бактериофаги обладают способностью разрушать экзополисахаридный матрикс, обеспечивая доступ биоцидов к бактериальным клеткам. В данном исследовании определен потенциал комплексного использования бактериофагов и дезинфицирующих веществ различных классов против ассоциированных с поверхностью биопленок *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, разрушение биопленок, бактериофаги, дезинфицирующие вещества, экзополисахаридный матрикс

Для цитирования: Колупаева Н.В., Щербакова О.А., Колупаева Л.В., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Кузин В.В. Комплексное применение бактериофагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биопленок *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2024; 9(4): 67–74. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-67-74

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

N.V.Kolupaeva, O.A.Shcherbakova, L.V.Kolupaeva, N.S.Grishchenko, T.I.Rudnitskaya, V.V.Kuzin

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

Pseudomonas aeruginosa is an important pathogen causing a wide range of acute and chronic infections. The main cause of persistence of infections caused by this pathogen is related to the ability of the bacterium to form biofilms. One of the leading therapeutic strategies for the treatment of infections associated with antibiotic-resistant strains of *P. aeruginosa* and their biofilms is phage therapy. Bacteriophages have the ability to degrade the exopolysaccharide matrix, allowing biocide access to bacterial cells. In this study, the potential for the integrated use of bacteriophages and disinfectants of different classes against surface-associated *P. aeruginosa* biofilms was determined.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm destruction, bacteriophages, disinfectants, exopolysaccharide matrix

For citation: Kolupaeva N.V., Shcherbakova O.A., Kolupaeva L.V., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Kuzin V.V. Study of phage and disinfectants combination combined for the destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Bacteriology. 2024; 9(4): 67–74. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-67-74

Pseudomonas aeruginosa включена Всемирной организацией здравоохранения в список приоритетных бактериальных патогенов, для лечения которых необходимы исследования и разработка новых антибактериальных препаратов. Серьезной угрозой для общественного здравоохранения является появление и распространение антибиотико-

устойчивых изолятов *P. aeruginosa*. Кроме того, наблюдается одновременное повышение устойчивости патогена к дезинфицирующим средствам [1].

Бактерия является возбудителем широкого спектра острых и хронических заболеваний, таких как пневмония, муковисцидоз, бактериемия у пациентов с ожогами, септи-

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 20.09.2024, принята к печати 25.12.2024

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 20.09.2024, accepted for publication 25.12.2024

ческие отравления и персистирующие инфекции легких и ран [2]. Хронические инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, могут быть связаны со способностью данного микроба образовывать биопленки. Биопленка характеризуется наличием внеклеточного вещества – матрикса, который обеспечивает прикрепление клеток к поверхности, их коммуникацию, а также защиту от внешних воздействий. Наличие биопленки обуславливает устойчивость данного микроорганизма к широкому спектру антибиотиков и дезинфицирующих средств, а также к компонентам иммунной системы макроорганизма [3, 4]. В связи с этим существует острая потребность в поиске веществ, эффективных для борьбы с биопленками.

Доступной альтернативной антибактериальным препаратам является применение бактериофагов. Вирулентные фаги способны инфицировать бактериальные клетки за относительно короткие промежутки времени. Они проявляют специфичность к узкому или широкому кругу штаммов-хозяев и часто используются в виде коктейлей для воздействия на несколько штаммов или видов бактерий [4]. Кроме того, бактериофаги способны продуцировать внеклеточные ферменты, такие как деполимеразы, разрушающие экзополисахаридный матрикс биопленки и способствующие проникновению антимикробных веществ внутрь биопленки [5].

Перспективным направлением для предотвращения образования и разрушения биологических пленок является комбинированное использование бактериофагов и противомикробных веществ. Наиболее распространенными химическими противомикробными средствами, используемыми для борьбы с патогенами на различных поверхностях, являются дезинфицирующие средства [6]. Молекулы химических дезинфицирующих веществ (ДВ) способны связываться с бактериальной клеткой с помощью механизма сшивания макромолекул, коагуляции и окисления, нарушая структуру и функции клетки, что приводит к элиминации патогена [7]. Однако при образовании биопленок эффективность применения дезинфицирующих веществ может быть снижена в связи с низкой проницаемостью внеклеточного матрикса. В свою очередь бактериофаги обладают способностью гидролизовать матрикс биопленки, расщепляя полимеры, капсульные полисахариды и внеклеточную ДНК, прикрепляться к бактериальным рецепторам и «внедрять» свои гены в протоплазму бактерий [8, 9]. Кроме того, специфичность бактериофагов ограничивает развитие резистентности к бактериальным мишеням внутри клеток [10]. В связи с этим комплексное применение бактериофагов и ДВ является перспективным методом борьбы с биопленками.

Цель исследования – оценка эффективности комплексного применения бактериофагов и дезинфицирующих веществ с целью разрушения биологических пленок *P. aeruginosa*.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов и условия культивирования

В работе использовали клинические штаммы *P. aeruginosa*, выделенные в 2017–2020 гг. от пациентов НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н.Бурденко ($n = 37$), а также патогены, входящие в группу ESKAPE: *Enterococcus faecium*

($n = 1$), *Staphylococcus aureus* ($n = 6$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 17$), *Acinetobacter baumannii* ($n = 12$), *P. aeruginosa* ($n = 48$) и *Enterobacter* sp. ($n = 1$), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk». В качестве референс-штамма использовали лабораторный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, рекомендованный для тестирования дезинфицирующих средств [11]. Бактериальные культуры выращивали на плотных питательных средах при температуре 37°C в течение 24 ч. В работе использовали питательные среды: «Питательная среда №1 ГРМ-агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия), Muller-Hinton broth (Himedia, Мумбаи, Индия), Luria Bertani broth (Difco, Детройт, США).

Бактериофаги

Бактериофаги выделяли из проб воды и почвы Московской, Воронежской и Рязанской областей методом обогащения. Наличие бактериофагов подтверждали двухслойным методом Грация [12]. Исследование специфичности выделенных фагов проводили на *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *Enterobacter* sp. Для оценки спектра литического действия использовали клинические штаммы *P. aeruginosa* ($n = 85$).

Определение чувствительности бактерий к бактериофагам проводили методом спот-тестирования (Spot-test). Бактериальные суспензии (10^9 КОЕ/мл) смешивали с полужидким агаром (0,5% агарозы) и распределяли по поверхности плотной питательной среды ГРМ-агар, вносили 10 мкл фильтрата фага и инкубировали посевы в течение 18–48 ч при температуре 37°C. Учет степени лизиса бактерий регистрировали по схеме «четыре креста». Штаммы, по отношению к которым активность бактериофагов оценивалась на «+++» и «++++», считались чувствительными.

Дезинфицирующие вещества

В работе использовали ДВ различных классов: алкилдиметилбензиламмония хлорид (АДБАХ), N,N-бис(3-аминопропил)-додециламин (третичный амин), полигексаметиленгуанидин (ПГМГ), перекись водорода, диоксид хлора, дихлоризоцианурат натрия (ДХЦ) по активному хлору (по АХ), гипохлорит натрия, хлоргексидина гидрохлорид, глутаровый и ортофталевый альдегиды.

Получение биологических пленок *P. aeruginosa*

Для получения биологических пленок *P. aeruginosa* использовали метод аппликаторов [13]. Клетки культивировали в жидкой питательной среде до стационарной фазы ($OD_{600} = 0,5–0,6$ опт. ед.) при температуре 37°C, что соответствует $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Аликвотны полученных суспензий (0,1 мл) вносили на поверхность плотной питательной среды и инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч. Затем на поверхность биопленки накладывали аппликатор (10 × 10 мм) на 2–3 мин. Аппликатор с отпечатком биопленки использовали для оценки комплексного воздействия фагов и ДВ.

Определение эффективности бактериофагов для разрушения биопленок *P. aeruginosa*

Аппликаторы с отпечатками биопленок штаммов *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19 и *P. aeruginosa* ATCC 27 853 обрабатывали

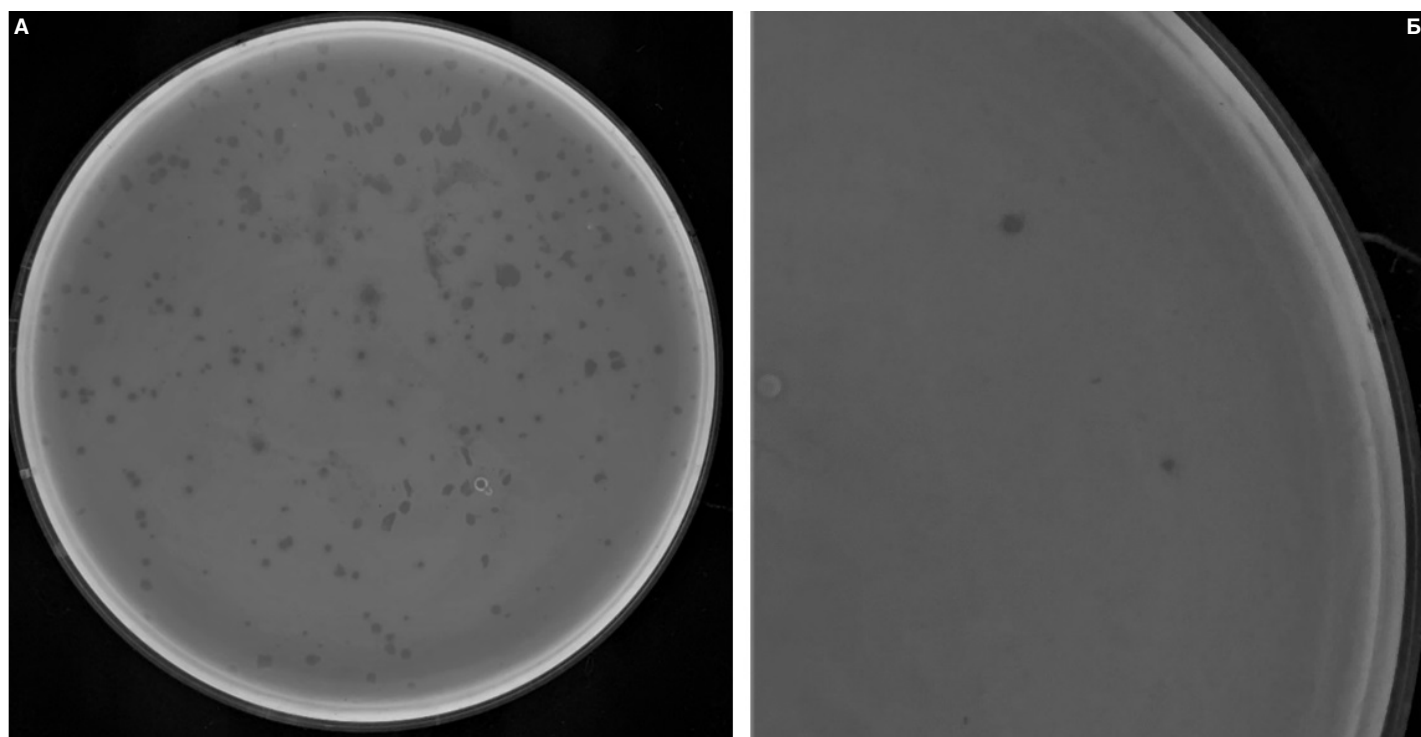


Рис 1. Негативные колонии бактериофагов, выделенные из проб воды и почвы (А); изолированные бляшки бактериофага Ph_2 (Б).
 Fig. 1. Negative colonies of bacteriophages isolated from water and soil samples (A); isolated plaques of bacteriophage Ph_2 (B).

бактериофагами в течение 30 и 60 мин. Затем аппликатор переносили в пробирки с жидкой питательной средой и инкубировали при температуре 37°C в течение 2–3 суток. Эффективность обработки оценивали по отсутствию роста в жидкой питательной среде.

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

Аппликаторы с отпечатками биопленок обрабатывали бактериофагами в течение 30 мин. После обработки аппликаторы погружали в растворы ДВ на 15 мин. Далее аппликатор переносили в пробирки с жидкой питательной средой и инкубировали при температуре 37°C в течение 2–3 суток. Эффективность обработки оценивали по отсутствию роста в жидкой питательной среде.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ)

Для окрашивания матрикса аппликаторы с отпечатком биопленки помещали в 8-луночный планшет, вносили краситель TOTO-1 (Thermo, США) и оставляли на 15 мин в темноте. Далее отбирали раствор первого красителя и добавляли краситель SYTO 60 red (Thermo, США) для окрашивания живых клеток. Через 15 мин образцы отмывали и фиксировали 0,25%-м раствором глutarового альдегида [14]. Визуализацию образцов проводили с помощью конфокального микроскопа OLYMPUS FV3000 (Япония) с масляной иммерсией при увеличении объектива 60x (объектив UPLXAP060XO 60.0X/1.518 Oil, N/A 1,42, U-DIC60). Для визуализации использовали диодные лазеры 488 и 561 нм для окрашенных SYTO 9 и SYTO 60 red 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 в программе LSM Image Browser (NIH, США) с использованием плагинов Bio-formats и Comstat2 (Университет Копенгагена, Дания).

Результаты исследования и их обсуждение

Выделение и характеристика бактериофагов, активных в отношении *P. aeruginosa*

Из проб воды и почвы Московской, Воронежской и Рязанской областей было выделено 20 бактериофагов. Все изолированные бактериофаги образовывали на бактериальных газонах мелкие бляшки с небольшими зонами ореола (рис. 1).

Результаты анализа специфичности и оценка спектра литической активности показали, что все выделенные фаги являются высокоспецифичными в отношении бактерий рода *P. aeruginosa* по сравнению с другими патогенами группы ESKAPE (табл. 1). Установлено, что наиболее выраженной литической активностью обладали бактериофаги Ph_2 (67,0%), Ph_4 (58,8%), Ph_6 (57,6%), Ph_10 (55,3%).

При культивировании бактериофаги Ph_2 и Ph_4 формировали на газоне референс-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 круглые негативные колонии диаметром 0,5 и 0,8 мм, фаги Ph_6 и Ph_10 образовывали прозрачные бляшки с ровным краем диаметром 0,8–2 мм и небольшим ореолом. Данные бактериофаги были выбраны для дальнейшего исследования специфической активности в отношении биопленок *P. aeruginosa*.

Воздействие бактериофагов на биопленки *P. aeruginosa*

Для моделирования биопленок использовали штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* F-19-4pa/19, кото-

Таблица 1. Стабильность и спектр литической активности выделенных бактериофагов в отношении ESKAPE-патогенов
Table 1. Stability and spectrum of lytic activity of isolated bacteriophages against ESKAPE pathogens

Вид бактерий / <i>Bacteria species</i>	Кол-во / Number	Количество штаммов, чувствительных к бактериофагам / Number of strains sensitive to bacteriophages									
Бактериофаг / <i>Bacteriophage</i>		Ph_1	Ph_2	Ph_3	Ph_4	Ph_5	Ph_6	Ph_7	Ph_8	Ph_9	Ph_10
<i>P. aeruginosa</i>	85	27	57	10	50	20	49	9	33	34	47
<i>E. faecium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Бактериофаг / <i>Bacteriophage</i>		Ph_11	Ph_12	Ph_13	Ph_14	Ph_15	Ph_16	Ph_17	Ph_18	Ph_19	Ph_20
<i>P. aeruginosa</i>	85	24	27	17	28	35	15	16	32	25	42
<i>E. faecium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

рые обладали самой высокой интенсивностью образования биопленки и были наиболее устойчивыми к большинству исследуемых ДВ, по данным ранее проведенных исследований [15].

Для изучения активности фагов в отношении биологических пленок использовали метод аппликаторов, позволяющий проводить прямую оценку выживаемости бактерий в составе биопленок. Аппликаторы с отпечатком биопленки обрабатывали бактериофагами в течение 30 и 60 мин и помещали в пробирки с жидкой средой. Эффективность применения бактериофагов оценивали по наличию или отсутствию роста в жидкой питательной среде. Воздействие бактериофага на структуру биопленку оценивали при помощи ЛСКМ.

Под воздействием всех исследуемых бактериофагов наблюдали помутнение жидкой питательной среды в пробирках с аппликатором, что указывает на остаточное количество жизнеспособных клеток на аппликаторе. Несмотря на высокую литическую активность бактериофагов Ph_2, Ph_4, Ph_6, Ph_10 в отношении планктонных форм, обработка данными фагами не приводила к полному разрушению биопленок *P. aeruginosa*.

При анализе биопленки выявлена характерная трехмерная структура организации. Толщина сформированной биопленки колебалась в пределах 30–40 мкм (рис. 2). На изображениях поперечных оптических срезов была хорошо видна периферическая локализация бактериальных агрегатов, расположенных в хаотичном порядке. Схожие данные о формировании биологических пленок описаны в исследовании американских ученых, опубликованном в 2019 г. [16].

При воздействии бактериофага Ph_6 в течении 30 мин наблюдали разрушение экзополисахаридного матрикса и снижение толщины биопленок до 10 мкм. Однако действие фага не затрагивало бактериальные клетки, расположенные внутри биопленки. При увеличении времени воздействия до 60 мин отмечали частичный лизис бактериальных клеток, расположенных в верхних слоях биопленки. Поскольку бак-

териофаги разрушают экзополисахаридный матрикс биопленки с помощью ЭПС-деполимераз, согласно данным, опубликованным В.К.Chan et al. [17], можно предположить, что у всех исследуемых фагов присутствовали схожие ферменты.

Комплексное применение фагов и дезинфицирующих веществ для разрушения биологических пленок

Для оценки эффективности комплексного применения фагов и ДВ на тест-объекты со сформированной биопленкой наносили суспензию бактериофага и через 30 мин аппликаторы обрабатывали растворами ДВ. Эффективность комплексной обработки оценивали по наличию или отсутствию роста в жидкой питательной среде. Изменение структуры биопленки в процессе обработки оценивали при помощи ЛСКМ.

Предварительная обработка биопленок бактериофагами позволяет снизить значения показателей минимальных бактерицидных концентраций (МБК) ДВ, необходимых для разрушения биологических пленок *P. aeruginosa*, от 2 до 25 раз в зависимости от вида применяемого ДВ (табл. 2, 3).

Результаты исследований показали, что биопленка, сформированная клиническим штаммом *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19, была более устойчива к применяемой химической дезинфекции, чем сформированная референс-штаммом *P. aeruginosa* ATCC 27853. Наиболее эффективным бактериофагом оказался Ph_6. Его применение совместно с ДВ способствовало снижению МБК всех исследуемых соединений до минимальных значений. Аналогичные данные, описывающие эффективность комплексного использования фагов и химических дезинфицирующих средств для улучшения инактивации ассоциированных с поверхностью биопленок *P. aeruginosa*, были получены E.Stachler et al. [18].

Предварительная обработка биопленок бактериофагами снижала значение МБК АДБАХ в 3 раза (при использовании Ph_2 и Ph_4) и в 10 раз (при использовании Ph_6 и Ph_10) по сравнению со значением МБК данного биоцида без при-

Таблица 2. Комплексное применение бактериофагов и дезинфектантов для разрушения биопленки, сформированной *P. aeruginosa* ATCC 27853

Table 2. Integrated application of bacteriophages and disinfectants to disrupt biofilm formed by *P. aeruginosa* ATCC 27853

Действующее вещество / Active ingredient	Концентрация раствора по действующему веществу, % / Solution concentration of active substance, %					
	Планктонная культура / Planktonic culture	без обработки / without processing	Биопленка / Biofilm			
			обработка фагами / phage treatment			
			Ph_2	Ph_4	Ph_6	Ph_10
АДБАХ / ADBAC	0,05	1,0	0,3	0,3	0,1	0,1
ПГМГ / PHMG	0,03	0,8	0,2	0,2	0,1	0,1
Третичный амин / Tertiary amine	0,01	0,5	0,03	0,05	0,02	0,02
Перекись водорода / Hydrogen peroxide	2,0	5,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Диоксид хлора / Chlorine dioxide	0,02	0,1	0,02	0,05	0,02	0,02
Хлоргексидин / Chlorhexidine	0,05	1,0	0,1	0,05	0,05	0,1
Гипохлорит натрия / Sodium hypochlorite	0,075	0,2	0,075	0,1	0,075	0,075
ДХЦ (по АХ) / DCC (by AC)	0,0075	0,03	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075
Глутаровый альдегид / Glutaraldehyde	0,25	2,5	0,25	0,5	0,25	0,5
Ортофталевый альдегид / Orthophthalic aldehyde	0,1	0,6	0,1	0,2	0,1	0,2

АДБАХ – алкилдиметилбензиламмония хлорид; ПГМГ – полигексаметиленгуанидин; ДХЦ (по АХ) – дихлороизоциануровая кислота (по активному хлору).
ADBAC – alkyl dimethylbenzyl ammonium; PHMG – polyhexamethylene guanidine; DCC (by AC) – dichloroisocyanuric acid (by active chlorine).

Таблица 3. Комплексное применение бактериофагов и дезинфектантов для разрушения биопленки, сформированной *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19

Table 3. Complex use of bacteriophages and disinfectants to destroy biofilm formed by *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19

Действующее вещество / Active ingredient	Концентрация раствора по действующему веществу, % / Solution concentration of active substance, %					
	Планктонная культура / Planktonic culture	без обработки / without processing	Биопленка / Biofilm			
			обработка фагами / phage treatment			
			Ph_2	Ph_4	Ph_6	Ph_10
АДБАХ / ADBAC	0,05	1,0	0,3	0,3	0,1	0,1
ПГМГ / PHMG	0,03	0,8	0,2	0,2	0,1	0,1
Третичный амин / Tertiary amine	0,01	0,5	0,03	0,05	0,02	0,03
Перекись водорода / Hydrogen peroxide	2,0	5,0	2,0	3,0	2,0	3,0
Диоксид хлора / Chlorine dioxide	0,02	0,1	0,02	0,05	0,02	0,02
Хлоргексидин / Chlorhexidine	0,05	1,0	0,05	0,05	0,05	0,1
Гипохлорит натрия / Sodium hypochlorite	0,075	0,2	0,1	0,1	0,075	0,075
ДХЦ (по АХ) / DCC (by AC)	0,0075	0,03	0,0015	0,0075	0,0075	0,0075
Глутаровый альдегид / Glutaraldehyde	0,25	2,5	0,25	0,5	0,25	0,5
Ортофталевый альдегид / Orthophthalic aldehyde	0,1	0,6	0,1	0,2	0,1	0,2

Сокращения те же, что в табл. 2. / The abbreviations are the same as in Table 2.

менения фага. Схожие результаты были получены B.Roy et al. при исследовании влияния комплексного действия четвертичных аммониевых соединений и бактериофагов на биопленки *Listeria monocytogenes* [19]. ПГМГ обладал большей эффективностью при совместном применении с фагами Ph_6 и Ph_10. Для третичного амина установлено самое значительное снижение показателя МБК при фаговой обработке по сравнению со всеми исследуемыми ДВ – до 25 раз.

Применение бактериофагов Ph_4 и Ph_6 позволяло снизить МБК хлоргексидина в отношении биопленки до значений МБК планктонной культуры. В исследовании D.Lee et al. показано, что комбинированная обработка фагом HEf13 и

хлоргексидином приводила к ингибированию образования и разрушению биопленки, сформированной *Enterococcus faecalis* [20].

Применение фагов Ph_2 и Ph_6 совместно с кислородоктивными соединениями (перекись водорода и диоксид хлора) позволило снизить значения МБК данных биоцидов в отношении биопленок до значений МБК планктонной культуры. При этом предварительная обработка биопленок бактериофагом Ph_2 была менее эффективна при совместном применении с хлорактивными соединениями (ДХЦ и гипохлорит натрия). Схожие данные приведены в работе Y.Zhang et al., где показано, что комбинированная обработка био-

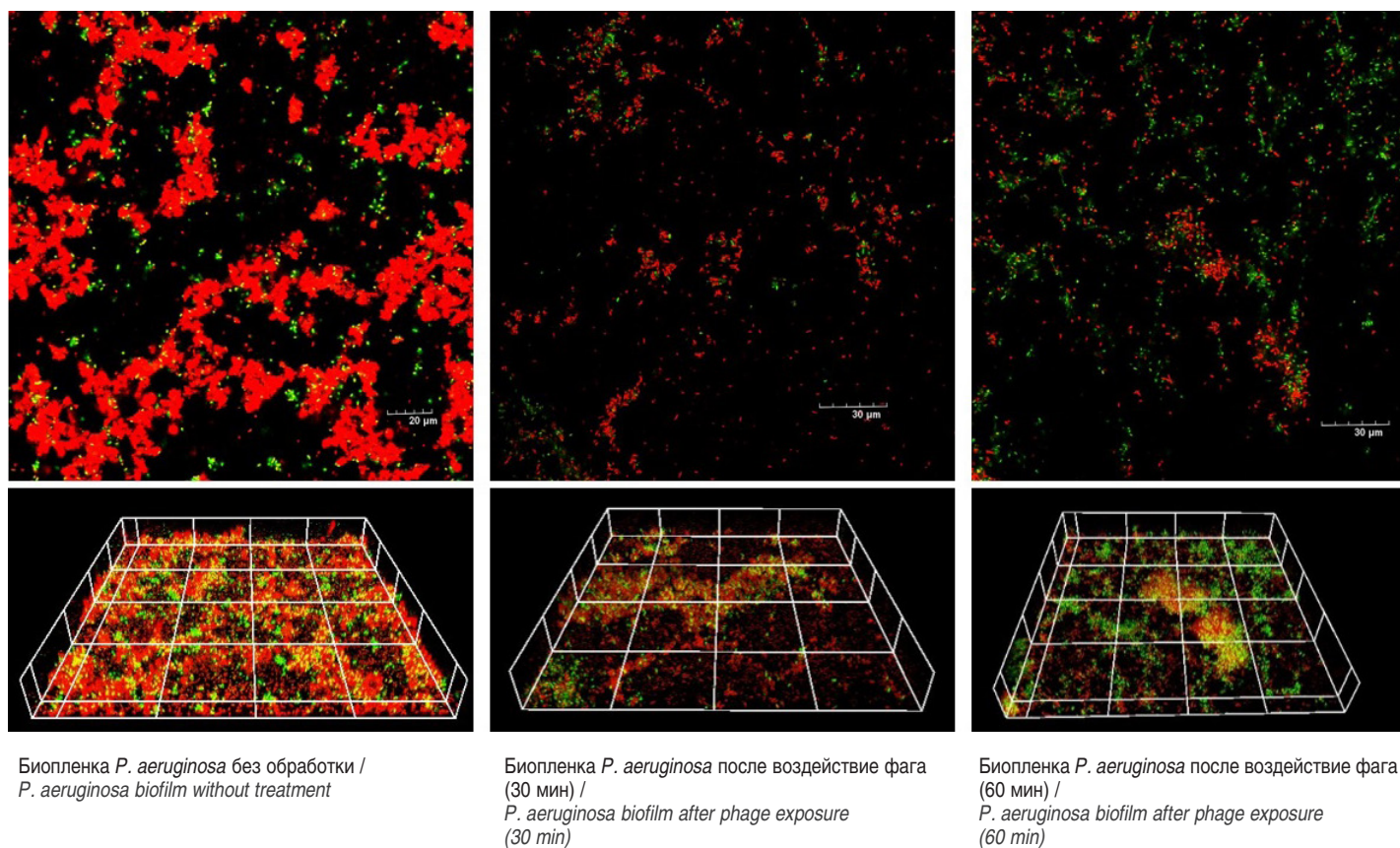


Рис. 2. Эффективность разрушения биопленок с помощью фагов.
 Fig. 2. Efficiency of biofilm destruction using phages.

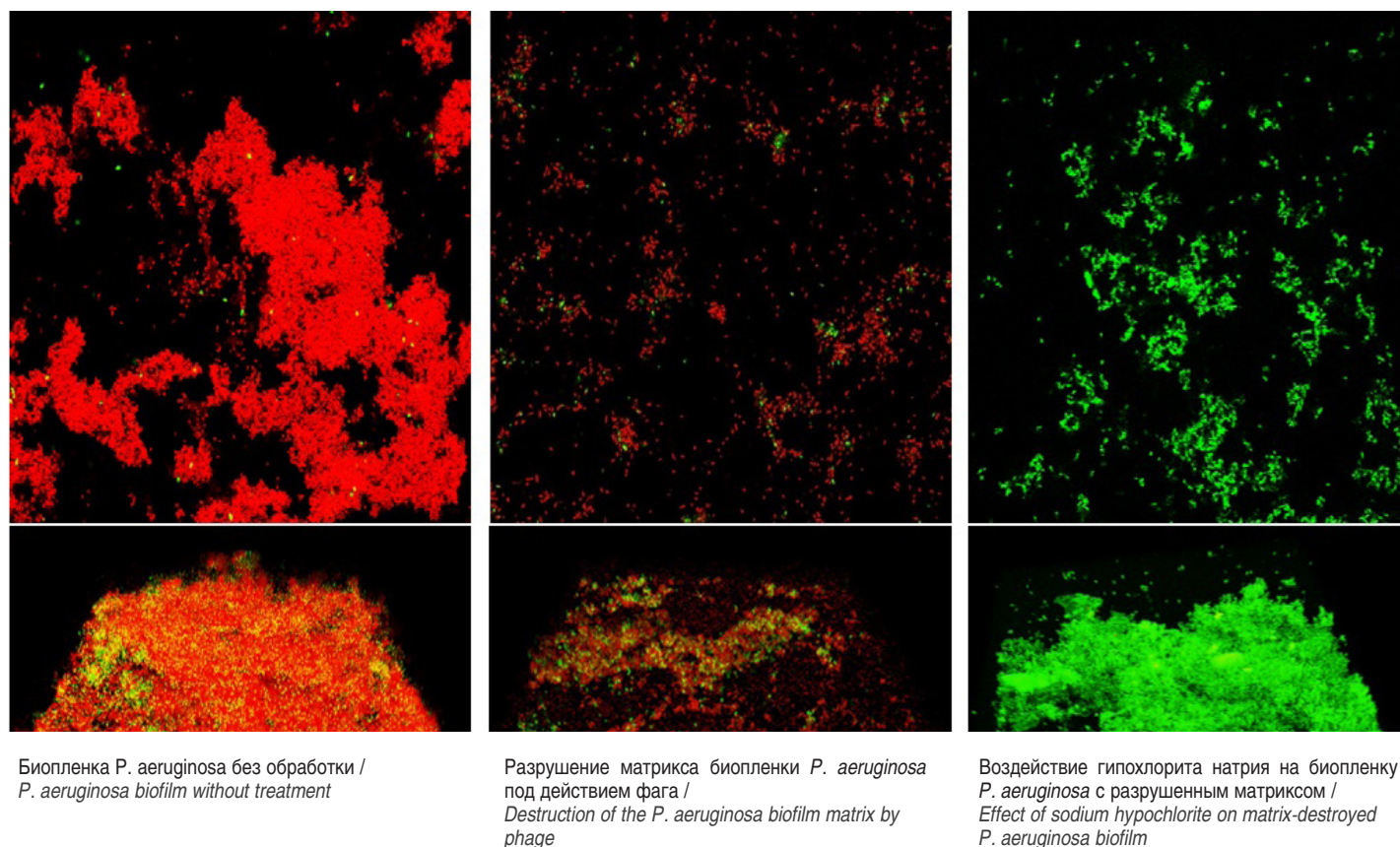


Рис. 3. Этапы деградации биологической пленки *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19 под воздействием фага Ph_6 и 0,075%-го раствора гипохлорита натрия.
 Fig. 3. Stages of degradation of the biological film *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19 under the influence of the phage Ph_6 and 0.075% sodium hypochlorite solution.

пленок бактериофагами и гипохлоритом натрия приводит к удалению $96 \pm 1\%$ биопленок *P. aeruginosa* с поверхностей [21]. Также в исследовании M.Chandra et al. было выявлено, что одновременная обработка фагом и гипохлоритом натрия приводит к полному разрушению биопленки *Salmonella enterica* серовара *Typhimurium*, в то время как их применение по отдельности не позволяет полностью удалить биопленки [22].

Комплексное применение фагов Ph_2, Ph_6 и альдегидов позволило снизить значения МБК данных биоцидов в отношении биопленок до значений МБК планктонной культуры. Полученные данные согласуются с результатами исследования Z.H.Liu et al., в котором описана эффективность комплексного использования фага и глутарового альдегида с целью предотвращения образования биопленки [23].

Изменение структуры биопленки при комплексной обработке оценивали с помощью ЛСКМ. На рис. 3 показано, что при воздействии бактериофага Ph_6 на биопленку, сформированную *P. aeruginosa* F-19-4Pa/19, наблюдалось характерное снижение толщины биопленки, вызванное разрушением экзополисахаридного матрикса. Последующая обработка 0,075%-м раствором гипохлоритом натрия (МБК в отношении планктонной культуры) приводила к потере жизнеспособности всех бактериальных клеток, локализованных в биопленке.

Полученные результаты согласуются с данными, приведенными в работе Yin et al. В исследовании показано, что фаги могут диспергировать внеклеточный матрикс и увеличивать его проницаемость благодаря ферментам, разрушающим экзополисахариды, что позволяет биоцидам достигать внутреннего слоя биопленки [24]. Это обуславливает возможность использования выделенных бактериофагов для разрушения биологических пленок *P. aeruginosa*.

Заключение

В результате работы были выделены высокоспецифичные бактериофаги Ph_2, Ph_4, Ph_6 и Ph_10, обладающие выраженной литической активностью в отношении *P. aeruginosa*. Воздействие данных фагов на биопленки *P. aeruginosa* приводило к разрушению экзополисахаридного матрикса, что, предположительно, обусловлено наличием ферментов ЭПС-деполимераз у выделенных бактериофагов. Установлено, что предварительная обработка биологических пленок бактериофагами обеспечивает проникновение ДВ во внутренние слои биопленки, позволяя снизить значения МБК используемых биоцидов в отношении биопленок до показателей МБК планктонной культуры. Таким образом, комплексное применение бактериофагов и ДВ с целью разрушения биологических пленок может являться эффективной стратегией в борьбе с биоопленкообразующими патогенами в лечебных учреждениях.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Rakshit P, Singh A, Singh R, Banerjee T. An in-depth study on survival mechanism of bacterial isolates in disinfectants within the hospital environment. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Aug 15;14:1442914. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1442914
2. Vohra M, Kour A, Kalia NP, Kumar M, Sharma S, Jaglan S, et al. A comprehensive review of genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomic insights into the differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from the planktonic to biofilm state: A multi-omics approach. *Int J Biol Macromol*. 2024 Feb;257(Pt1):128563. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128563
3. da Cruz Nizer WS, Allison KN, Adams ME, Vargas MA, Ahmed D, Beaulieu C, et al. The role of exopolysaccharides Psl and Pel in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to the oxidative stressors sodium hypochlorite and hydrogen peroxide. *Microbiol Spectr*. 2024 Oct 3;12(10):e0092224. DOI: 10.1128/spectrum.00922-24
4. Santiago AJ, Donlan RM. Bacteriophage Infections of Biofilms of Health Care-Associated Pathogens: *Klebsiella pneumoniae*. *EcoSal Plus*. 2020 Oct;9(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0029-2019. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0029-2019
5. Santiago AJ, Burgos-Garay ML, Kartforosh L, Mazher M, Donlan RM. Bacteriophage treatment of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a multispecies biofilm: a potential biocontrol strategy for healthcare facilities. *AIMS Microbiol*. 2020 Feb 26;6(1):43-63. DOI: 10.3934/microbiol.2020003
6. Byun KH, Han SH, Choi MW, Kim BH, Ha SD. Efficacy of disinfectant and bacteriophage mixture against planktonic and biofilm state of *Listeria monocytogenes* to control in the food industry. *Int J Food Microbiol*. 2024 Mar 2;413:110587. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110587
7. Donaghy JA, Jagadeesan B, Goodburn K, Grunwald L, Jensen ON, Jespers AD, et al. Relationship of Sanitizers, Disinfectants, and Cleaning Agents with Antimicrobial Resistance. *J Food Prot*. 2019 May;82(5):889-902. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-18-373
8. Talapko J, Škrlec I. The Principles, Mechanisms, and Benefits of Unconventional Agents in the Treatment of Biofilm Infection. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Oct 10;13(10):299. DOI: 10.3390/ph13100299
9. Talapko J, Škrlec I, Alebić T, Bekić S. From Bacteriophage to Antibiotics and Back. *Coll. Antropol*. 2018;42:131-138.
10. Ferriol-González C, Domingo-Calap P. Phages for Biofilm Removal. *Antibiotics (Basel)*. 2020 May 21;9(5):268. DOI: 10.3390/antibiotics9050268
11. Руководство Р 4.2.3676-20. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. М., 2021. / Rukovodstvo R 4.2.3676-20. Metody laboratornykh issledovaniy i ispytaniy dezinfektsionnykh sredstv dlya otsenki ikh effektivnosti i bezopasnosti. М., 2021. (In Russian).
12. Adams MH. Bacteriophages; Interscience Publishers: New York, NY, USA, 1959.
13. Детушева ЕВ, Ершова ОН, Фурсова НК. Чувствительность планктонных культур и биопленок грамотрицательных бактерий к коммерческим препаратам дезинфектантов и антисептиков. Клиническая лабораторная диагностика. 2021;66(7):438-447. / Detusheva EV, Ershova ON, Fursova NK. The sensitivity of planktonic cultures and biofilms of gram-negative bacteria to commercial disinfectant and antiseptic preparations. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2021;66(7):438-447. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-7-438-447 (In Russian).
14. Diuvenji EV, Nevolina ED, Mart'yanov SV, Zhurina MA, Kalmantaeva OV, Makarova MA, et al. Binary Biofilms of *Staphylococcus aureus* 209P and *Kytococcus schroeteri* H01: Dualistic Role of Kytococci and Cell Adhesion Alterations in the Presence of the A-Type Natriuretic Peptide. *Microbiology*. 2022;91(5):563-576. DOI: 10.1134/S002626172260118X

15. Кузин ВВ, Колупаева НВ, ЩербакOVA ОА, Колупаева ЛВ, Грищенко НС, Рудницкая ТИ, и др. Воздействие дезинфицирующих веществ на биопленки *Pseudomonas aeruginosa*: чувствительность и адаптация. Бактериология. 2023;8(4):28-35. / Kuzin VV, Kolupaeva NV, Shcherbakova OA, Kolupaeva LV, Grishchenko NS, Rudnitskaya TI, et al. Effects of disinfectants on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: sensitivity and adaptation. Bacteriology. 2023;8(4):28-35. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-28-35 (In Russian).
16. Reichhardt C, Parsek MR. Confocal Laser Scanning Microscopy for Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Architecture and Matrix Localization. Front Microbiol. 2019 Apr 2;10:677. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00677
17. Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. Curr Pharm Des. 2015;21(1):85-99. DOI: 10.2174/1381612820666140905112311
18. Stachler E, Kull A, Julian TR. Bacteriophage Treatment before Chemical Disinfection Can Enhance Removal of Plastic-Surface-Associated *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol. 2021 Sep 28;87(20):e0098021. DOI: 10.1128/AEM.00980-21
19. Roy B, Ackermann HW, Pandian S, Picard G, Goulet J. Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeriophages and a quaternary ammonium compound. Appl Environ Microbiol. 1993 Sep;59(9):2914-7. DOI: 10.1128/aem.59.9.2914-2917.1993
20. Lee D, Im J, Kim AR, Jun W, Yun CH, Han SH. Enterococcus Phage vB_EfaS_HEf13 as an Anti-Biofilm Agent Against *Enterococcus faecalis*. J Microbiol. 2024 Aug;62(8):683-693. DOI: 10.1007/s12275-024-00150-z
21. Zhang Y, Hu Z. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. Biotechnol Bioeng. 2013 Jan;110(1):286-95. DOI: 10.1002/bit.24630
22. Chandra M, Thakur S, Chougule SS, et al. Combined effect of disinfectant and phage on the survivability of *S. Typhimurium* and its biofilm phenotype. Internet J Food Saf. 2015;17:25-31.
23. Liu ZH, Chiang MT, Lin HY. Lytic Bacteriophage as a Biomaterial to Prevent Biofilm Formation and Promote Neural Growth. Tissue Eng Regen Med. 2022 Oct;19(5):987-1000. DOI: 10.1007/s13770-022-00462-4
24. Yin R, Cheng J, Wang J, Li P, Lin J. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies. Front Microbiol. 2022 Aug 26;13:955286. DOI: 10.3389/fmicb.2022.955286

Информация о соавторах:

ЩербакOVA 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

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

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

Information about co-authors:

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

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

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

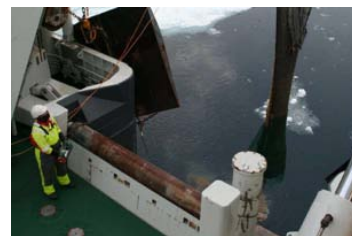
Tatyana I. Rudnitskaya, Researcher of Department for training and improvement of specialists, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзора

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

НОВОСТИ НАУКИ

Перспективные кандидаты на антибиотики обнаружены в микробах, обитающих в глубинах Северного Ледовитого океана

Значительное количество антибактериальных агентов получают из бактериальных метаболитов. Аналогичным образом, многочисленные известные соединения, которые препятствуют бактериальной вирулентности, происходят из бактериальных метаболитов. Энтеропатогенная *Escherichia coli* (EPEC) является значимым патогеном человека, вызывающим кишечные инфекции, особенно влияющим на детскую смертность в развивающихся регионах. Эти инфекции характеризуются стиранием микроворсинок и поражением кишечного эпителия, связанными с aberrантной полимеризацией актина. Целью данного исследования было выявление потенциальных противобактериальных соединений для инфекций EPEC среди бактериальных метаболитов, собранных из морских актинобактерий (*Kocuria* sp. и *Rhodococcus* spp.) из Арктического моря, путем применения скрининговых анализов на основе вирулентности. Более того, продемонстрирована пригодность этих противобактериальных анализов для скрининга фракций экстракта актинобактерий для идентификации метаболитов с помощью биопроб. Обнаружено соединение в пятой фракции штамма *Kocuria*, которое препятствует полимеризации актина, вызванной EPEC, не влияя на рост. Кроме того, в пятой фракции штамма *Rhodococcus* было идентифицировано ингибирующее рост соединение. Эти результаты включают идентификацию, управляемую биоанализом, дерепликацию на основе ВЭЖХ-МС и выделение большого фосфолипида и вероятного антимикробного пептида, демонстрируя полезность этого подхода в скрининге соединений, способных ингибировать вирулентность EPEC.



Pylkkö T, Schneider YK, Rämä T, Andersen JH, Tammela P.
Bioprospecting of inhibitors of EPEC virulence from metabolites of marine actinobacteria from the Arctic Sea.
Front Microbiol. 2024 Aug 30;15:1432475. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1432475