

Совместное воздействие бактериофагов и антибиотика на биоплёнку *Pseudomonas aeruginosa*

*А. С. ГОРШКОВА¹, В. В. ДРЮККЕР¹, Н. Н. СЫКИЛИНДА²

¹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

² Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

The Combined Effect of Bacteriophages and Antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm

*A. S. GORSHKOVA¹, V. V. DRUCKER¹, N. N. SYKILINDA²

¹ Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow

В настоящее время по-прежнему остро стоит проблема нозокомиальных инфекций. Одним из ключевых возбудителей такого рода заболеваний является *Pseudomonas aeruginosa*. Перспективность использования бактериофагов в профилактике и борьбе с инфекционными заболеваниями сейчас активно изучается. Целью исследования было изучение воздействия новых бактериофагов на биоплёнку *Pseudomonas aeruginosa* при совместном использовании с антибиотиком гентамицином. Клетки лабораторного эталонного штамма *P.aeruginosa* PAO1 выращивали в 96-луночных планшетах в течение суток, образовавшиеся биоплёнки обрабатывали антибиотиком гентамицином в различных концентрациях, а также бактериофагами AN14 и AN1. Степень деградации биоплёнки оценивали с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. Используемые новые литические бактериофаги AN14 (семейство *Siphoviridae*), AN1 (семейство *Myoviridae*) продемонстрировали выраженную антибиоплёночную активность в первые сутки воздействия на биоплёнку *P.aeruginosa* ($p < 0,001$). Эффект разрушительного воздействия гентамицина на биоплёнку возрастал с ростом концентрации антибиотика в диапазоне 2–16 мкг/мл. Добавление литических бактериофагов AN14 и AN1 усиливало действие антибиотика ($p = 0,05$). Таким образом, совместное использование литических бактериофагов и антибиотиков приводило к более эффективной эрадикации биоплёнки, чем каждым антибактериальным агентом отдельно.

Ключевые слова: бактериофаги, *Pseudomonas aeruginosa*, антибиотики, биоплёнки.

Currently, the problem of nosocomial infections is of urgent concern. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the key causative agents of this type of disease. The prospect of using bacteriophages in the prevention and control of infectious diseases is now being actively studied. The aim of the work is to study the effect of new bacteriophages on *P.aeruginosa* biofilm when used together with the antibiotic gentamicin. Cells of the laboratory reference strain *P.aeruginosa* PAO1 were grown in 96-well plates for a day, the resulting biofilms were treated with gentamicin in various concentrations, as well as bacteriophages AN14 and AN1. The degree of biofilm degradation was evaluated by staining the cells with crystal violet dye. The new lytic bacteriophages AN14 (*Siphoviridae* family), AN1 (*Myoviridae* family) used in the study, showed pronounced antibiofilm activity on the first day of exposure to *P.aeruginosa* biofilm ($p < 0.001$). The destructive effect of gentamicin on biofilms increased when the concentration of the antibiotic was increased in the range of 2–16 mg/ml. Addition of lytic bacteriophages AN14 and AN1 enhanced the effect of the antibiotic ($p = 0.05$). Thus, the combined use of lytic bacteriophages and antibiotics led to a more effective eradication of biofilms than when used separately.

Keywords: bacteriophages, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotics, biofilms.

Введение

Широко известный факт, что бактерии *Pseudomonas aeruginosa* являются причиной оппортунистических инфекций и участвует в развитии инфекционных осложнений в отделениях реанимации и интенсивной терапии, доминируя в

этиологии нозокомиальной пневмонии, связанной, в основном, с искусственной вентиляцией лёгких и пневмонии при муковисцидозе [1].

В последнее время возрастает интерес к вирусам бактерий — бактериофагам, и проведён широкий ряд независимых исследований в различных лабораториях мира, посвящённых взаимодействию бактериофагов и бактерий. Полученные наблюдения дают основания полагать, что фаги представляют определённый интерес для терапии инфекционных заболеваний [2–4]. Кроме того,

© Коллектив авторов, 2020

*Адрес для корреспонденции: e-mail: kovadlo@yandex.ru

клинические испытания на людях демонстрируют превосходные результаты: пациент 15 лет с муковисцидозом с инфекцией *Mycobacterium abscessus* лечился трёхфазным коктейлем фагов после двусторонней трансплантации лёгких. Производные литического фага, которые эффективно убивали инфекционный штамм *M.abscessus*, были разработаны с помощью геной инженерии. Внутривенное лечение фагом хорошо переносилось и ассоциировалось с объективным клиническим улучшением, включая закрытие стерильной раны, улучшение функции печени и значительное устранение инфицированных узлов кожи. Авторы не исключали вероятность того, что успешное лечение пациента произошло бы и без лечения фагом. Тем не менее, в работе отмечалось, что пациенты с подобными клиническими состояниями обычно имеют высокую смертность, и что улучшение не было связано с прекращением или началом приёма других лекарств. Кроме того в поддержку доказательств роли бактериофагов в выздоровлении больного является доказательство репликации фага *in vivo* [5].

Ранее мы обнаружили, что бактериофаги помогают значительно снизить минимальную ингибирующую и бактерицидную концентрации антибиотиков (гентамицина и ципрофлоксацина) у *P.aeruginosa* [6]. Эти наблюдения были проведены на планктонных клетках, поэтому необходимо было определить, какое воздействие оказывают бактериофаги совместно с антибиотиками на клетки, существующие в виде биоплёнки.

Цель работы — изучение влияния фагов в комбинации с антибиотиком на биоплёнку *P.aeruginosa*.

Материал и методы

Для всех экспериментов использовались эталонные штаммы *P.aeruginosa* PAO1 (из коллекции проф. В. Н. Крылова, НИИВС им. И. И. Мечникова, Москва и коллекции лаборатории генов технологий Католического университета, г. Лёвен, Бельгия).

Штамм AN1 (семейство *Myoviridae*) был выделен из очистных сооружений г. Иркутска, AN14 (семейство *Siphoviridae*) — из реки Селенги. Оба штамма имели прозрачные зоны лизиса (рис. 1), что указывает на литический тип жизненного цикла используемых штаммов и зону ореола вокруг зоны лизиса, что предположительно говорит о наличии активности, деполимеризующей внеклеточные полимерные вещества *P.aeruginosa*.

Был использован антибиотик гентамицин (производство «Белмедпрепараты»).

Эксперимент по воздействию фагов на биоплёнки был проведён согласно общепринятой методике с использованием микротитровальных планшетов [7]. Биоплёнки выращивали в течение 24 ч в 96-луночных планшетах при 37°C. В качестве питательной среды использовали LB: триптон — 1%, дрожжевой экстракт — 0,5%, NaCl — 1%. После культивирования питательную среду отбирали и лунки промывали физиологическим раствором для удаления неприкреплённых клеток. Затем к биоплёнкам добавляли различные варианты: гентамицин в различных концентрациях (2, 4, 8, 16 мкг/мл), бактериофаги AN1, AN14 в количестве 10⁷ БОЕ на 1 лунку (бляшко-образу-

ющие единицы). Перед экспериментом бактериальная культура тестировалась на чувствительность к бактериофагам методом двухслойного агар, а фаговая суспензия проверялась на бактериальную стерильность посевом на среду LB. Эксперименты были проведены в 3–5-кратных повторностях. В качестве положительного контроля выступали клетки *P.aeruginosa* в среде LB, в качестве отрицательного контроля — среда LB без клеток.

Культивирование биоплёнок с фагами, гентамицином и их комбинацией проводили в термостате при 37°C в течение 20–24 ч. Затем питательную среду и планктонные клетки отбирали и лунки промывали физиологическим раствором, сушили и окрашивали 0,4% водным раствором кристаллического фиолетового. После 15-минутного окрашивания планшеты промывали так, что в лунках с отрицательным контролем не оставалось неспецифически связавшегося красителя. После просушивания в каждую лунку добавляли 96% этанол и оставляли экстрагироваться в течение 20 мин. После оптическую плотность раствора измеряли на фотоэлектроколориметре при длине волны 590 нм.

Минимальную ингибирующую и минимальную бактерицидную концентрации определяли согласно Методическим указаниям 4.2.1890-04.

Статистическую значимость различий между данными оптической плотности кристаллического фиолетового контрольных биоплёнок и обработанных фагами оценивали *t*-критерием Стьюдента. Непараметрический критерий Манна–Уитни применяли для оценки различий между биоплёнками с антибиотиками различных концентраций и ими же с добавлением бактериофагов.

Результаты исследования

Бактериофаг AN14 определён как представитель рода *Yuavirus*, семейство *Siphoviridae*, порядок *Caudovirales* (рис. 2, а). Его геном (№ KX198613.1 в GenBank), также как и геномы других представителей этого рода, содержит ген интегразы. Однако для этих фагов не удалось получить лизогенные штаммы [8], и их геном не обнаруживается в составе бактериального генома *P.aeruginosa* в качестве профага. Поэтому фаги этого рода относят к литическим. Бактериофаг AN1 относится к гигантским фагам *P.aeruginosa* — роду *φKZ* (рис. 2, б).

Перед проведением эксперимента по воздействию фагов и антибиотиков на биоплёнку мы убедились, что используемый штамм обра-



Рис. 1. Зоны лизиса фагов AN14, AN1 через 5 сут роста. Отдельные бляшки могут достигать 6 мм за счёт зоны ореола.

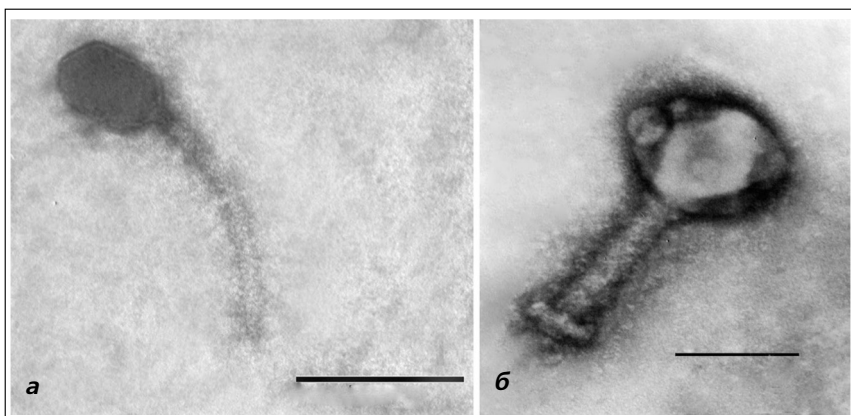


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия (шкала 100 нм). а — штамм AN14; б — штамм AN1.

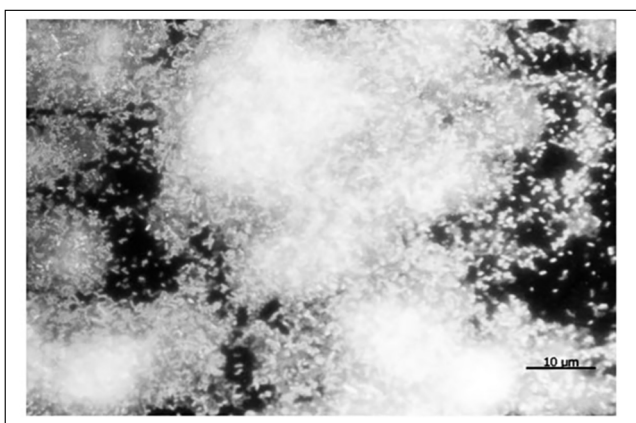


Рис. 3. Эпифлуоресцентная микроскопия биоплёнки *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 на покровных микроскопических стеклах, окраска ДАФИ.

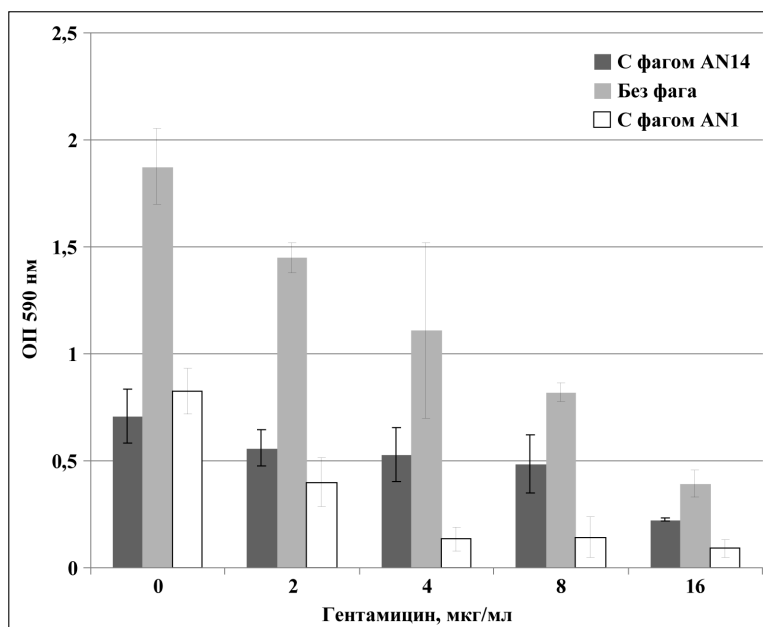


Рис. 4. Влияние различных концентраций гентамицина в комбинации с бактериофагами AN1 и AN14 на биоплёнку *P. aeruginosa* PAO1.

Столбики отражают средние результаты и стандартное отклонение измерений количества красителя, специфически связанного с биопленкой *P. aeruginosa* в различных вариациях эксперимента.

зует биоплёнки в течение 24 ч. На рис. 3 показана культура *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 на стекле после культивирования в течение 24 ч при 37°C в жидкой среде LB. Видны типичные для биоплёнок *P. aeruginosa* микроколонии. Такая суточная биоплёнка была обработана различными концентрациями гентамицина в сочетании с бактериофагами. На рис. 4 представлены средние показатели и стандартное отклонение трёх независимых экспериментов 2 штаммов *P. aeruginosa* PAO1.

Из рис. 4 видно, что за сутки инкубации бактериофаги AN14 и AN1 значительно сократили биоплёнку — в среднем на 60% ($p < 0,001$). Этот показатель сопоставим с данными по антибиоплёночной активности коктейля из фагов семейств *Myoviridae* и *Podoviridae*, полученных на нескольких десятках штаммов, выделенных у больных риносинуситом [9].

Также в результате работы стало ясно, что бактериофаги AN1, AN14 и гентамицин деградируют биоплёнку *P. aeruginosa* эффективнее при совместном использовании ($p = 0,05$). Интересно, что в аналогичном исследовании с использованием *P. aeruginosa* PA14 и Pb-подобного и SN-подобного бактериофагов не было получено положительного совместного эффекта с гентамицином при выращивании биоплёнок в пластиковых

планшетах, но был положительный результат на эпителиальных клетках [10]. Возможно, это связано с тем, что взаимодействие различных штаммов фагов и бактерий в значительной степени специфично [11].

Результаты эксперимента показали, что используемые бактериофаги и антибиотик способны значительно сократить биоплёнку *P. aeruginosa* — в среднем на 90% при концентрации гентамицина 16 мкг/мл. Важно отметить, что через 24–48 ч экспозиции с антибиотиком и вирусами в культуре появляются устойчивые клетки, которые восстанавливают численность бактерий до контрольного уровня. В планктонной культуре также как и на биоплёнках по отдельности фаги и антибиотики при определённой концентрации снижали численность бактериальной популяции. Совместное воздействие бактериофагов и антибиотиков при той же концентрации антибиотика приводило к полному

Определение минимальной бактерицидной концентрации гентамицина в отношении планктонных клеток *P.aeruginosa* PAO1

Штаммы	Сутки	Гентамицин, мкг/мл							
		0	2	4	8	16	32	64	128
PAO1	1-е	+	—	—	—	—	—	—	—
	2-е	+	+	+	+	—	—	—	—
	5-е	+	+	+	+	+	—	—	—
PAO1 + бактериофаг AN1	1-е	—	—	—	—	—	—	—	—
	2-е	+	+	—	—	—	—	—	—
	5-е	+	+	+	—	—	—	—	—

Примечание. «+» — визуально определяемый рост по помутнению среды; «—» — отсутствие роста, жидкая питательная среда прозрачная.

уничтожению бактериальных клеток за промежуток времени, за который не успевали появляться фагоустойчивые и антибиотикоустойчивые клетки (таблица). Метод, используемый для оценки деградации биоплёнок, не позволяет оценить количество оставшихся жизнеспособных клеток, поэтому остаётся не ясным при какой концентрации антибиотика происходит эрадикация биоплёнки и происходит ли вообще.

Также было обнаружено, что с ростом концентрации антибиотика уменьшался суммарный эффект с фагом. Подобное наблюдалось и в других работах: восьмикратная и однократная концентрация антибиотика тобрамицина с фагами не отличались по эффекту, что авторы объяснили тем, что при более высокой концентрации антибиотика становится затруднительным размножение фага [10].

Механизм синергетического эффекта антибиотиков и фагов пока до конца не понятен. Однако существуют предположения, что в результате выработки фагоустойчивости у клеток одновременно с этим ослабляется устойчивость к антибиотикам [12]. Нами было проведено определение МИК фагоустойчивой культуры *P.aeruginosa*, выделенной после культивирования с бактериофагом. Оказалось, что минимальная ингибирующая концентрация антибиотика была идентичной у чувствительного и нечувствительного к фагу варианта.

Единой характеристикой для большинства фагов является свойство появления фагоустойчивых вариантов, что приводит к восстановлению бактериальной популяции. Решением этой проблемы специалисты в фаговой терапии пред-

лагают использование смеси из бактериофагов, использующих различные рецепторы на поверхности клеточной стенки. Этот подход позволяет увеличить время появления фагоустойчивых вариантов. Более того, предлагается использовать последовательно несколько коктейлей фагов, что даёт ещё больше времени для контроля над фаговой популяцией для выработки иммунного ответа организма [13].

Заключение

Основным результатом нашего исследования является доказательство способности новых бактериофагов *P.aeruginosa* AN1 и AN14 разрушать сформировавшуюся биоплёнку, а также их положительного взаимодействия с антибиотиком гентамицином в разрушении биоплёнки. Это говорит о том, что применение более низких концентраций антибиотика совместно с фагом может иметь тот же антибактериальный эффект, что и высокие дозы антибактериального препарата, имеющего тяжёлые побочные эффекты.

Проведённые нами исследования вносят вклад в совместные усилия по изучению влияния бактериофагов на биоплёнку бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Полученные данные с использованием новых бактериофагов расширяют и углубляют понимание данного вопроса.

Источник финансирования. Работа выполнена по госбюджетному проекту АААА-А16-116122110061-6.

Благодарности. Выражаем благодарность ЦКП «Ультрамикроанализ» ЛИН СО РАН за предоставление трансмиссионного электронного микроскопа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2015. — Т. 17. — № 3. — С. 170—186. / Lazareva A.V., Chebotar' I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar' V.I., Mayanskij N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: patogennost', patogenez i patologiya. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya 2015; 17 (3): 170—186. [in Russian]
2. Waters E.M., Neill D.R., Kaman B., Sahota J.S., Clokie M.R.J., Winstanley C. et al. Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with *Pseudomonas aeruginosa*. Thorax 2017; 72 (7): 666—667.
3. Danis-Wlodarczyk K., Vandenheuvel D., Jang H. B., Briers Y., Olszak T., Arabski M. et al. A proposed integrated approach for the preclinical eval-

uation of phage therapy in *Pseudomonas* infections. Scientific reports 2016; 28115 (6). doi.org/10.1038/srep28115

4. Alves D.R., Perez-Esteban P., Kot W., Bean J. E., Arnot T., Hansen L. H. et al. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. Microb Biotechnol 2015; 9 (1): 61—74.
5. Dedrick R. M., Guerrero-Bustamante C.A., Garlena R.A., Russell D.A., Ford K., Harris K., Gilmour K.C., Soothill J., Jacobs-Sera D., Schooley R.T., Hatfull G.F., Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. Nature Medicine 2019; 25: 730—733.
6. Горшкова А.С., Сыкилинда Н.Н., Дрюккер В.В. Эффект бактериофагов на повышение чувствительности клеток *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам. Сборник тезисов VI Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых-биологов 'Симбиоз-

- Россия 2013', Иркутск. Издательство 'Аспринт', 2013. — С. 68–69. / Gorshkova A.S., Sykilinda N.N., Drjyukker V.V. Effekt bakteriofagov na povyschenie chuvstvitel'nosti kletok *Pseudomonas aeruginosa* k antibiotikam. Sbornik tezisov VI Vserossiyskogo s mezhdunarodnym uchastiem Kongressa molodykh uchenykh-biologov 'Simbioz-Rossiya 2013', Irkutsk. Izdatel'stvo 'Asprint', 2013; 68–69.
7. Knezevic P., Petrovic O. A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. J Microbiol Methods 2008; 74 (2–3), 114–118.
 8. Ceysens P.J., Mesyanzhinov V., Sykilinda N., Briers Y., Roucourt B., Lavigne R., Robben J., Domashin A., Miroshnikov K., Volckaert G., Hertveldt K. The genome and structural proteome of YuA, a new *Pseudomonas aeruginosa* phage resembling M6. J Bacteriol 2008; 190 (4): 1429–1435.
 9. Fong S.A., Drilling A., Morales S., Cornet M.E., Woodworth B.A., Fokkens W. J. Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients. Front Cell Infect Microbiol 2017; 7 (418). doi:10.3389/fcimb.2017.00418
 10. Chaudhry W.N., Concepcion 'n-Acevedo J., Park T., Andleeb S., Bull J.J., Levin B.R. Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. PLoS ONE 2017; 12 (1): e0168615. doi:10.1371/journal.pone.0168615
 11. Latz S., Krüttgen A., Häfner H., Buhl E. M., Ritter K., Horz H.P. Differential Effect of Newly Isolated Phages Belonging to PB1-Like, phiKZ-Like and LUZ24-Like Viruses against Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* under Varying Growth Conditions Viruses 2017; 9 (315). doi:10.3390/v9110315
 12. Chan B. K., Turner P. E., Kim S., Mojibian H. R., Eleftheriades J. A., Narayan D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Evolution, Medicine, and Public Health 2018; 1 (2018): 60–66. doi:10.1039/emph/eoy005
 13. Schmidt C. Phage therapy's latest makeover. Nature Biotechnology 2019; <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0133-z>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Горшкова Анна Сергеевна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН, Иркутск
 Дрюккер Валентин Валерьянович — д. б. н., главный научный сотрудник лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН, Иркутск

Сыкилинда Нина Николаевна — к. б. н., научный сотрудник лаборатории генной инженерии Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва