

THE INFLUENCE OF DIFFERENT COMPONENTS OF NUTRIENT BACTERIOLOGICAL MEDIA ON PLAQUE FORMATION OF BACTERIOPHAGES

Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine)

v.poniatovskiy@gmail.com

Antimicrobial resistance has led to growing interest in bacteriophages as an adjunct to antibiotics therapy. The impact of cultivation conditions on phage reproduction remains insufficiently studied. This study evaluates the effect of glucose and calcium ions (Ca^{2+}) on the ability of bacteriophages to lyse bacterial cultures.

Bacteriophages used in the study were isolated from urban wastewater in Kyiv and belonged to the morphotypes Siphoviridae, Podoviridae, and Myoviridae. The effect of glucose (1%) and calcium ions (Ca^{2+} , 50 mM) on plaque formation was studied by incorporating these factors into nutrient agar for microbial cultivation. The results were assessed by comparing plaque numbers on media with and without the added factors.

The experiment demonstrated that glucose and Ca^{2+} ions had different effects on plaque formation in various bacteriophages. Glucose often inhibited phage activity, whereas Ca^{2+} ions generally enhanced plaque formation (either by increasing plaque number or size). In some cases, glucose also promoted phage reproduction.

The influence of different factors on phage reproduction should be considered when isolating and characterizing bacteriophages, as well as in the development of phage therapy preparations.

Key words: bacteriophages, plaque formation, glucose.

Connection of the publication with planned research works.

The presented work is a fragment of scientific research within the framework of the initiative research work "The use of bacteriophages to counteract antibiotic-resistant variants of *Klebsiella pneumoniae*", state registration number 0123U100951.

Introduction.

In modern medicine, the problem of antibiotic resistance is becoming increasingly critical. According to the World Health Organization (WHO), the rising resistance of pathogenic bacteria to antibiotics threatens to nullify decades of progress in the treatment of infectious diseases. In this context, bacteriophages – viruses capable of selectively infecting and lysing bacteria – emerge as a promising complement to traditional antimicrobial therapy.

Bacteriophages can effectively eliminate antibiotic-resistant bacterial strains, making them a valuable tool in combating infections caused by multidrug-resistant microorganisms [1, 2, 3]. The use of bacteriophages also opens up opportunities for combination therapy, where the simultaneous application of phages and antibiotics can help overcome bacterial resistance or enhance treatment efficacy [4, 5]. Interest in bacteriophages in medicine is also growing due to advances in biotechnology, which enable the development of personalized phage preparations for treating specific infections in particular patient groups. In some countries, commercially available phage preparations are already in use, and scientific research in this field is rapidly expanding [6].

Unfortunately, despite the development of commercial phage-based preparations, there is still an insufficient understanding of the mechanisms of bacteriophage interactions with bacterial cells, which poses certain limitations on their medical application.

When bacteriophages are introduced together with susceptible bacterial hosts into a semi-solid nutrient agar medium, they form lysis zones, or plaques, which vary in morphology, size, and appearance. It is gener-

ally believed that each plaque represents the replication zone of a single viral particle. The nature of phage plaques has been the subject of research by many scientists, who have developed numerous mathematical models based on their findings [7, 8]. The formation of bacteriophage plaques occurs in several phases: primary adsorption, when the phage attaches to the bacterial host cell wall; the initial cycles of viral replication; the plaque expansion phase, during which neighboring cells become infected; and the final phase, when phage replication ceases due to the bacterial lawn transitioning to the stationary phase.

Phage growth characteristics, including adsorption rate, latent period, burst size, initial lawn density, bacterial division rate, and the maturation of the lawn to the stationary phase, significantly influence plaque size. This is because the primary development of plaques occurs during the log phase of bacterial culture growth [8, 9]. The density of the nutrient medium also plays an important role in phage plaque formation. In liquid media, increased bacterial infection is observed due to the enhanced mobility of phages, which facilitates their interaction with bacteria. In semi-solid agar-based media, phage mobility is restricted after a certain period, ultimately halting the host lysis process [10].

However, in addition to phage characteristics and nutrient medium density, the size and morphology of phage plaques can also vary depending on the phage cultivation method, experimental conditions, as well as the composition and origin of the nutrient medium. The ideal medium is one that ensures maximum bacterial growth while maintaining optimal phage activity.

Some factors that promote bacterial growth may inhibit phage activity, while others that stimulate phage activity may limit the growth of bacterial hosts. However, a balance can be achieved where both activities are maintained at high levels [11].

Calcium and magnesium ions also play an important role in the infection process of bacteriophages. It has been experimentally confirmed that infection of *E. coli* with phages T4, P1, or λ caused a temporary reduc-

tion in intracellular levels of potassium, magnesium, and polyamines. During the reduction of intracellular magnesium concentration from 100 to 50 mM by adding the antibiotic polymyxin B to infected cells, T4 phage infection, unlike T3 or T7, was significantly affected [12]. Studies show that high concentrations of Ca^{2+} are required for the effective penetration of phage DNA into the host cell [13]. Calcium ions can also prevent phage inactivation under certain conditions. For example, in a study with the bacteriophage $\phi\mu$ -4, it was shown that the addition of Ca^{2+} reduces the inactivation of phage particles caused by chelating agents such as citrate [14]. Some phages require the presence of Ca^{2+} for successful replication and assembly of new virions. For example, calcium ions are absolutely essential for the replication of mycobacteriophage I3 in a synthetic medium [15].

The significance of carbohydrates in the nutrient medium for phage reproduction has also been noted. During a study of the lysis of sensitive strains of *E. coli* K 12 with the mutant [C 57] of bacteriophage λ , it was observed that cells grown in a synthetic medium containing 1% glucose as a carbon source did not undergo lysis. However, corresponding experiments using 1% glycerol as the carbon source showed the expected lysis [16]. Glucose can influence the structure of the bacterial cell wall, particularly the glycosylation of teichoic acids, which in turn determines the susceptibility of bacteria to phage infection [17].

The aim of the study.

To assess the impact of specific factors on bacteriophage replication by determining the size, morphology, and number of plaques of nine different phages active against nine clinically significant bacterial pathogens.

Object and research methods.

The study used 9 museum (reference) strains of microorganisms obtained from the collections of ATCC (American Type Culture Collection) and DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH): *Enterococcus faecalis* DSM 2570, *Escherichia coli* DSM 1103, *Proteus mirabilis* DSM 6674, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Staphylococcus aureus* DSM 346, *Enterobacter cloacae* DSM 6234, *Enterococcus faecium* DSM 2146, *Acinetobacter baumannii* DSM 30007, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Cultivation of bacterial pathogens and all phage-related experiments were performed using Nutrient agar (HiMedia; 5.0 g/L peptic digest of animal tissue, 1.5 g/L meat extract, 1.5 g/L yeast extract, 5.0 g/L sodium chloride, 15.0 g/L agar-agar). Separate batches of me-

dium were prepared by adding 1% glucose and 50 mM Ca^{2+} to investigate their effects on phage reproduction.

Nine different bacteriophages active against nine types of microorganisms were used in the study. Bacteriophages were isolated from wastewater in Kyiv through their accumulation. The wastewater samples were initially centrifuged to remove solid particles. To 100 mL of the prepared wastewater, 1 mL of the corresponding bacterial culture in the early log phase and 3 g of tryptic soy agar (Merck) were added to promote bacterial growth. The mixture was incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, the mixture was centrifuged at $4,000 \times g$ for 20 minutes at 4°C. The presence of bacteriophages in the supernatant was checked using the single-layer method. Isolated plaques were selected for a second round of amplification. The purification procedures were repeated at least three times to obtain pure phage lines. Phage suspensions were further purified and concentrated by polyethylene glycol precipitation [18]. Phage suspensions were stored at 4°C.

The size and morphology of the phages were examined using transmission electron microscopy (TEM). All work was carried out at the Electron Microscopy Laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology with Fundamentals of Immunology at the Bogomolets National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, as well as at the Collective Use Center of Electron Microscopes of the NAS of Ukraine. Phage suspensions were prepared in SM buffer with a phage concentration of at least 10^9 PFU/mL. Contrast staining was performed using a 2% solution of phosphotungstic acid (pH 6.8). The exposure time in the contrasting solution was 1-2 minutes.

Experiments were performed in triplicate, and statistical analysis was conducted using the mean value and standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the average number of plaques in the media and determine the effect of factors on phage reproduction. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Research results.

All the phages used in the study were isolated from urban wastewater samples from Kyiv. Their specific activity was confirmed through the Spot test and the single-layer method (modification of the Gracia method). Transmission electron microscopy (TEM) analysis showed that the isolated bacteriophages belong to different morphological groups (**fig. 1**).

Accordingly, the study used phages representing three main morphotypes: *Siphoviridae* (phages Enb2f,

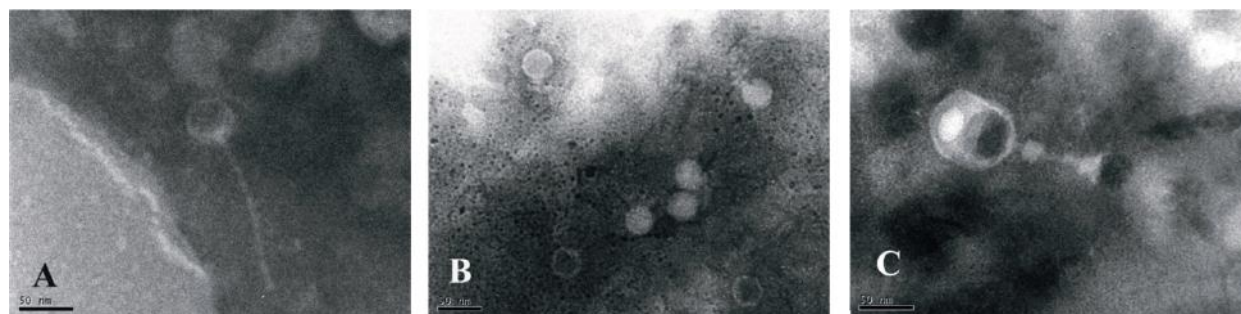


Figure 1 – Morphological characteristics of the bacteriophages used in the experiment: A – bacteriophage Enfs 14f active against *Enterococcus faecalis*; B – bacteriophage St 12f active against *Staphylococcus aureus*; C – bacteriophage E44f active against *Escherichia coli*.

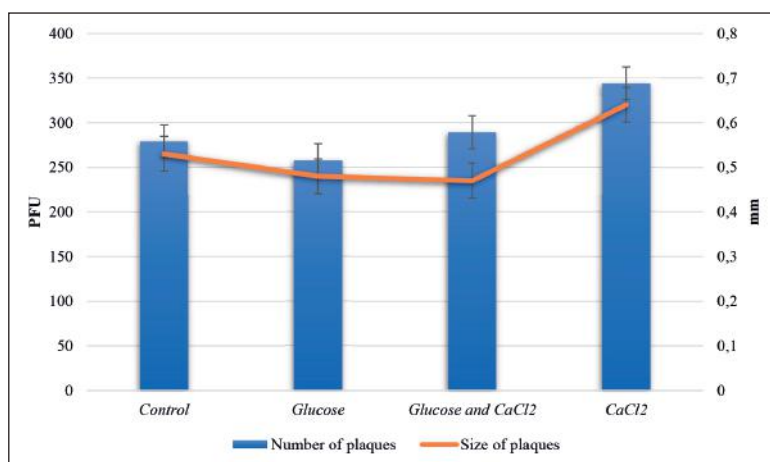


Figure 2 – The effect of different factors on the reproduction of bacteriophage Enfs 14f.

Enfs 14f, Enfm 1f, KI178f, Pr48f, P1Sf), *Podoviridae* (phages Ac28f, St12f), and *Myoviridae* (phage E44f).

To determine the impact of specific factors, particularly glucose and Ca²⁺ ions, nutrient agar from HiMedia was used for culturing microorganisms. At the preliminary stage of the study, this medium demonstrated the best results in supporting plaque formation for different types of bacteriophages.

It was experimentally confirmed that the addition of glucose (1%) and Ca²⁺ ions (50 mM) had different effects on plaque formation (size and number) in various phages. The addition of glucose and Ca²⁺ ions did not affect the number or size of plaques formed by the Ac28f bacteriophage, active against *Acinetobacter baumannii*. For the E44f phage, specific to *Escherichia coli*, the addition of glucose reduced the number of plaques from 250 to 0 (P-value<0.05), while Ca²⁺ ions increased the number by 115% (P-value<0.05), with no effect on the plaque size (control 0.4±0.05 and 0.44±0.05 in the experiment, P-value≥0.05). For the Enb2f phage, specific to *Enterobacter cloacae*, the addition of glucose caused a 164% increase in the number of plaques (P-value<0.05) with a slight increase in their diameter (control 2.27±0.66 and 2.67±0.39, P-value<0.05), while the addition of Ca²⁺ ions had no effect on the number, but slightly decreased their size (control 2.27±0.66 and 2.07±0.11, P-value≥0.05).

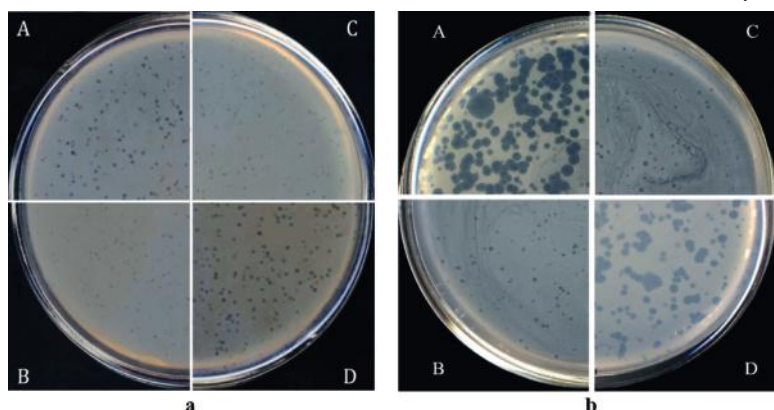


Figure 3 – Influence of different factors on bacteriophage growth: a – *Enterococcus faecalis* DSM 2570, b – *Proteus mirabilis* DSM 6674. Designations: A – Nutrient agar for microorganism cultivation (HiMedia), B – Nutrient agar for microorganism cultivation (HiMedia) with the addition of glucose (1%), C – Nutrient agar for microorganism cultivation (HiMedia) with the addition of glucose (1%) and CaCl₂ (50 mM), D – Nutrient agar for microorganism cultivation (HiMedia) with the addition of CaCl₂ (50 mM).

In bacteriophage Enfs 14f, specific to *Enterococcus faecalis*, Ca²⁺ ions increased the number of plaques by 120% (P-value≥0.05) and their diameter (control 0.53±0.09 and 0.64±0.11, P-value<0.05), while the addition of glucose reduced both their size (0.53±0.09 and 0.47±0.06, P-value<0.05) and the number by 10% (P-value≥0.05) (fig. 2 and fig. 3a).

In bacteriophage Pr48f, specific to *Proteus mirabilis*, the addition of glucose caused significant inhibition of plaque formation: the number of plaques decreased by 29% (P-value<0.05), and their size also significantly decreased (control 1.84±0.45 and 1.17±0.15 in the experiment, P-value<0.05). The addition of Ca²⁺ ions did not affect the size of the plaques but reduced their number by 16% (P-value≥0.05), accompanied by the appearance of turbidity (fig. 4 and fig. 3b).

In the case of bacteriophage Enfm 1f, specific to *Enterococcus faecium*, glucose caused a 56% decrease in the number of plaques (P-value<0.05) and their diameter (control 2.08±0.37 and 0.66±0.05 in the experiment, P-value<0.05). Addition of Ca²⁺ ions increased the number of plaques by 108% (P-value≥0.05), without affecting their size (control 2.08±0.37 and 2.095±0.37 in the experiment, P-value≥0.05). Bacteriophage KI178f, specific to *Klebsiella pneumoniae*, showed no effect of glucose on the number of plaques, with a slight increase in their size (control 1.91±0.2 and 2.11±0.07 in the experiment, P-value<0.05). The addition of Ca²⁺ ions led to a slight increase in the number of plaques (by 112%, P-value≥0.05), without affecting their diameter (control 1.91±0.2 and 1.96±0.05 in the experiment).

Bacteriophage P1Sf, specific to *Pseudomonas aeruginosa*, showed an increase in the number of plaques by 111% (P-value≥0.05) and their size (control 2.17±0.3 and 2.15±0.35 in the experiment, P-value<0.05) upon the addition of glucose, which was accompanied by intense blue-green pigment formation. Ca²⁺ ions had no effect on the number of plaques but slightly increased their size (control 2.17±0.3 and 2.39±0.45 in the experiment, P-value≥0.05).

Finally, in bacteriophage St12f, specific to *Staphylococcus aureus*, glucose caused a significant decrease in the number of plaques by 60% (P-value<0.05) and their size (control 1.27±0.06 and 0.88±0.07 in the experiment, P-value<0.05). Ca²⁺ ions contributed to a minimal increase in the number of plaques by 104% (P-value≥0.05) and their size (control 1.27±0.06 and 1.31±0.06 in the experiment, P-value≥0.05).

Discussion of research results.

The results obtained demonstrate the specific influence of glucose and Ca²⁺ ions on the plaque formation processes of different bacteriophages, depending on their morphotype and host bacteria. This confirms the importance of an individualized approach to optimizing the cultivation conditions of phages during their isolation and accumulation for fur-

ther use in both research and phage therapy of infectious diseases.

It was established that glucose has a significant inhibitory effect on plaque formation in phages E44f, Enfm 1f, Pr48f, and St12f, which are specific to *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis*, and *Staphylococcus aureus*, respectively. In particular, for phage E44f, the number of plaques decreased to zero (P-value<0.05), indicating a strong negative impact of glucose on the phage infection process. A similar trend was observed for phages Pr48f and St12f, where the reduction in the number of plaques was accompanied by a significant decrease in their size. This may be linked to changes in the metabolic activity of host bacteria and structural modifications in the bacterial cell wall under the influence of glucose, which reduces the efficiency of phage adsorption and replication [19, 20]. This pattern has been confirmed by experimental studies conducted by other researchers using the phage λ [C57] [16]. When culturing T4 phages in LB medium with glucose, a decrease in phage titers was also observed compared to LB without glucose [11]. Some studies, however, indicate that the addition of glucose to the growth medium supports phage replication. For instance, Jessica Silva et al. demonstrated that an effective method for culturing phage T7 was using a minimal medium containing glucose – M9/glucose [21].

It should be noted that Calcium ions (Ca^{2+}), predominantly promoted an increase in the number of plaques or their size in most of the phages studied. For example, for phage E44f, the number of plaques increased by 115% (P-value<0.05), indicating a stimulatory effect of Ca^{2+} ions on phage adsorption processes and their penetration into bacteria. Similar results were obtained for phages Enfs 14f and Enfm 1f, specific to *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, respectively. In these cases, the increase in the number or size of plaques suggests an improvement in the efficiency of the phage infection cycle due to enhanced stability of the capsid or better interaction between the phage and the bacterial cell surface. This pattern has been confirmed by a number of experimental studies. Research on the morphological changes of phage ϕX174 under the influence of Ca^{2+} ions showed changes in the epitopes of phages responsible for binding to lipopolysaccharides on the bacterial cell wall during the early stages of infection in *Escherichia coli* [22]. Experiments involving the infection of phages with radioactively labeled DNA showed that at high concentrations of Ca^{2+} , the label remained associated with the host cells until the onset of lysis. However, at low concentrations, dissociation between the phage DNA and the host was observed, although adsorption occurred at a normal rate. Therefore, a high concentration of Ca^{2+} is required for the penetration of phage DNA into certain bacterial hosts [13].

The results for the phage P1Sf, active against *Pseudomonas aeruginosa*, are particularly interesting. The addition of glucose slightly increased the number of plaques by 111% (P-value $\geq$ 0.05) and promoted the formation of a blue-green pigment. This may be a result

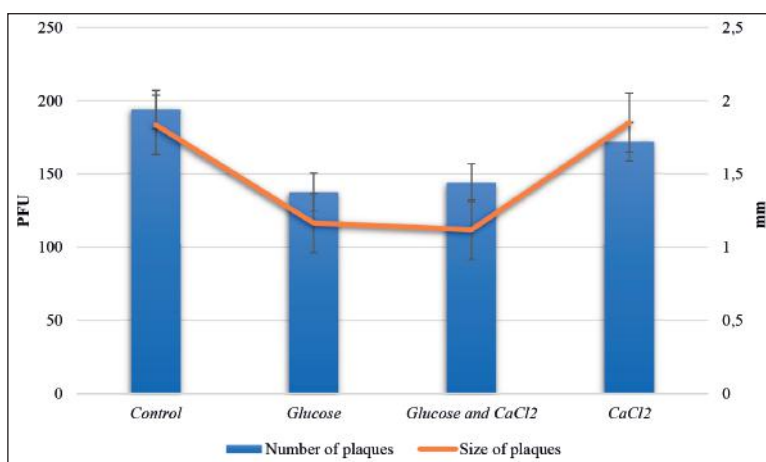


Figure 4 – The effect of different factors on the reproduction of bacteriophage Pr48f.

of the activation of metabolic pathways in *P. aeruginosa* that enhance phage replication. In this case, Ca^{2+} ions did not affect the number of plaques but slightly increased their size, indicating a specific influence of these factors.

Equally important are the data on the effect of glucose on the phage Enb2f, specific to *Enterobacter cloacae*. Here, the addition of glucose caused a 164% increase in the number of plaques (P-value<0.05) with a slight increase in their size. This may be related to the stimulation of the host bacterial replication, which in turn provides more substrate for phage replication.

The differences in the effects of glucose and Ca^{2+} ions on plaque formation may be explained by various mechanisms of interaction between phages and host bacteria. Glucose may alter the metabolic state of bacteria, affecting the synthesis of receptors for phage adsorption, while Ca^{2+} ions can stabilize phage structures and facilitate the penetration of phage DNA into the host cell. Moreover, certain differences between phage morphotypes (*Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Myoviridae*) may influence their sensitivity to these factors.

Conclusions.

Plaque formation is one of the key characteristics of bacteriophages that is actively studied within the scientific community. Understanding the mechanisms behind this process is crucial for improving phage therapy and optimizing the cultivation of bacteriophages in laboratory conditions. Our results demonstrate that phage infectivity depends on the presence of specific components in the growth medium, highlighting the importance of additional laboratory research before their practical application in medical practice.

Prospects for further research.

Studying the impact of other chemical components, including different classes of carbohydrates in the composition of growth media, may help identify additional factors influencing phage replication. Investigating the mechanisms through which glucose and Ca^{2+} ions affect the adsorption, penetration, and replication of bacteriophages in bacteria will provide a better understanding of the molecular basis of these processes.

ВПЛИВ РІЗНИХ КОМПОНЕНТІВ ПОЖИВНИХ БАКТЕРІОЛОГІЧНИХ СЕРЕДОВИЩ НА БЛЯШКОУТВОРЕННЯ БАКТЕРІОФАГІВ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м. Київ, Україна)

v.poniatovskyi@gmail.com

Антимікробна резистентність спричиняє зростаючий інтерес до бактеріофагів як допоміжного інструменту до антибіотиків. Вплив умов культивування на репродукцію фагів на сьогоднішній день залишається недостатньо вивченим. У цьому дослідженні оцінено вплив глюкози та іонів кальцію (Ca^{2+}) на здатність бактеріофагів лізувати бактеріальні культури.

Для дослідження використано бактеріофаги, виділені з міських стічних вод м. Києва, що належать до морфотипів *Siphoviridae*, *Podoviridae* та *Myoviridae*. Дослідження впливу глюкози (1%) та іонів Ca^{2+} (50 mM) на бляшкоутворення фагів проводили шляхом додавання їх до складу поживного агару для культивування мікроорганізмів. Оцінку результатів проводили шляхом порівняння кількості бляшок на середовищах з додаванням різних факторів і без них.

Експериментально встановлено, що глюкоза та іони Ca^{2+} по-різному впливають на формування бляшок у різних бактеріофагів. Глюкоза частіше пригнічувала фагову активність, тоді як іони Ca^{2+} у більшості випадків сприяли посиленню бляшкоутворенню (зміна кількості чи розміру бляшок). В окремих випадках спостерігалось посилення репродукції бактеріофагів під дією глюкози.

Вплив різних факторів на фагову репродукцію слід враховувати при виділенні та характеристиці фагів а також при розробці фаготерапевтичних препаратів.

Ключові слова: бактеріофаги, бляшкоутворення, глюкоза.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Представлена робота є фрагментом наукового дослідження в рамках ініціативної науково-дослідної роботи «Використання бактеріофагів для боротьби з антибіотикорезистентними варіантами *Klebsiella pneumoniae*», номер державної реєстрації 0123U100951.

Вступ.

У сучасній медицині проблема антибіотикорезистентності стає все більш критичною. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), зростання рівня резистентності патогенних бактерій до антибіотиків загрожує зведенням нанівець багаторічних досягнень у лікуванні інфекційних захворювань. У цій ситуації бактеріофаги – віруси, здатні вибірково інфікувати та лізувати бактерії – постають як перспективне доповнення до традиційної антимікробної терапії.

Бактеріофаги здатні ефективно знищувати антибіотикорезистентні штами бактерій, що робить їх важливим інструментом у боротьбі з інфекціями, що спричинені мікроорганізмами з множинною лікарською стійкістю [1, 2, 3]. Використання бактеріофагів також відкриває можливості для комбінованої терапії, коли одночасне застосування фагів і антибіотиків дозволяє подолати бактеріальну резистентність або підвищити ефективність лікування [4, 5]. Інтерес до бактеріофагів у медицині зростає і через розвиток біотехнологій, які дозволяють створювати персоналізовані фагові препарати для лікування конкретних інфекцій у певній категорії пацієнтів. У деяких країнах вже застосовуються комерційно доступні фагові препарати, а наукові дослідження у цій галузі стрімко розвиваються [6].

На жаль, навіть із розвитком комерційних препаратів на основі фагів, все ще бракує достатнього розуміння механізмів взаємодії бактеріофагів із бакте-

ріальною клітиною, що створює певні обмеження у використанні фагів у медицині.

Бактеріофаги, при спільному внесенні їх з чутливими бактеріями-господарями у напівтверде поживне агарове середовище, утворюють зони лізису, або бляшки, різної морфології, розміру та вигляду. Вважається, що кожна бляшка зазвичай представляє зону репродукції однієї вірусної частки. Природа фагових бляшок була предметом дослідження багатьох науковців, які на основі отриманих результатів розробили численні математичні моделі [7, 8]. Формування бактеріофагових бляшок відбувається у декілька фаз: первинна адсорбція, коли фаг приєднується до клітинної стінки бактерії-хазяїна; перші кілька циклів вірусного розмноження; фаза збільшення бляшки за рахунок інфікування сусідніх клітин; та заключна фаза, під час якої розмноження фагів припиняється через перехід бактеріального газону до стаціонарної фази.

Характеристики росту фагів, зокрема швидкість адсорбції, латентний період, розмір вибуху, початкова щільність газону, швидкість поділу бактерій та дозрівання газону до стаціонарної фази, значно впливають на розмір бляшки, оскільки основний розвиток бляшок відбувається під час log фази росту бактеріальної культури [8, 9]. Додаткову роль при утворенні фагових бляшок відіграє щільність поживного середовища. У рідкому середовищі спостерігається збільшене інфікування бактерій завдяки підвищеній мобільності фагів, що сприяє їх взаємодії з бактеріями. У ніпівщільних агаризованих середовищах рухливість фагів обмежується через певний інтервал часу, що зупиняє процес лізису господаря [10].

Однак, окрім характеристик фага та щільності поживного середовища, розмір і морфологія фагових бляшок можуть також змінюватися залежно від методу культивування бактеріофагів, умов експерименту, а також складу і походження поживного середовища.

Ідеальним середовищем є те, яке забезпечує максимальний ріст бактерій і оптимальну активність фагів.

Деякі фактори, що сприяють росту бактерій, можуть пригнічувати активність фагів, тоді як інші фактори, що стимулюють активність фагів, можуть обмежувати ріст бактерій-господарів. Проте можливий компроміс, за якого обидві активності підтримуються на високому рівні [11].

Важливу роль в інфекційному процесі бактеріофагів відграють також іони кальцію та магнію. Експериментально було підтверджено, що інфікування *E. coli* фагами T4, P1 або λ спричиняло тимчасове зниження внутрішньоклітинних рівнів калію, магнію та поліамінів. Під час зниження внутрішньоклітинної концентрації магнію зі 100 до 50 мМ шляхом додавання антибіотику поліміксину В до інфікованих клітин, інфекція фагом T4, на відміну від T3 чи T7, зазнала значного впливу [12]. Дослідження показують, що високі концентрації Ca^{2+} необхідні для ефективного проникнення фагової ДНК у клітину-господаря [13]. Також іони кальцію можуть запобігати інактивації фагів у певних умовах. Наприклад, у дослідженні з бактеріофагом фм-4 було показано, що додавання Ca^{2+} зменшує інактивацію фагових часток, спричинену хелатуючими агентами, такими як цитрат [14]. Деякі фаги потребують присутності Ca^{2+} для успішної реплікації та збирання нових віріонів. Наприклад, для мікобактеріофага I3 іони кальцію є абсолютно необхідними для його розмноження в синтетичному середовищі [15].

Також було відзначено значення вуглеводів у складі поживного середовища для репродукції фагів. Під час дослідження лізису чутливих штамів *E. coli* K 12 з мутантом [C 57] бактеріофага λ було помічено, що клітини, вирощені в синтетичному середовищі, що містить 1% глюкози як джерело вуглецю, не лізуються, хоча відповідні експерименти з використанням 1% гліцерину як джерела вуглецю показали очікуваний лізис [16]. Глюкоза може впливати на структуру клітинної стінки бактерій, зокрема на глікозилювання тейхоєвих кислот, що, у свою чергу, визначає сприйнятливість бактерій до фагової інфекції [17].

Мета дослідження.

Оцінити вплив окремих факторів на репродукцію бактеріофагів шляхом визначення розміру, морфології та кількості бляшок дев'яти різних фагів, активних проти дев'яти видів бактеріальних патогенів із найбільшим клінічним значенням.

Об'єкт і методи дослідження.

У дослідженнях використано 9 музейних (еталонних) штамів мікроорганізмів, отриманих із колекцій ATCC (American Type Culture Collection) та DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH): *Enterococcus faecalis* DSM 2570, *Escherichia coli* DSM 1103, *Proteus mirabilis* DSM 6674, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Staphylococcus aureus* DSM 346, *Enterobacter cloacae* DSM 6234, *Enterococcus faecium* DSM 2146, *Acinetobacter baumannii* DSM 30007, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Культивування бактеріальних патогенів та всі дослідження з бактеріофагами проводилися з використанням поживного середовища Nutrient agar (HiMedia; пептичний перевар тваринної тканини 5,0 г/л; м'ясний екстракт 1,5 г/л; дріжджовий екстракт

1,5 г/л; натрію хлорид 5,0 г/л; агар-агар 15,0 г/л). Окремі серії середовищ готували з додаванням 1% глюкози та 50 мМ Ca^{2+} з метою дослідження їх впливу на репродукцію фагів.

У дослідженні було використано дев'ять різних бактеріофагів, активних проти дев'яти видів мікроорганізмів. Бактеріофаги виділяли зі стічних вод міста Києва шляхом їх накопичення. Зразки стічної води попередньо центрифугували для видалення твердих часток. До 100 мл підготовленої стічної води додавали 1 мл відповідної бактеріальної культури на ранній log-фазі та 3 г триптонно-соевого агару (Merck), щоб забезпечити ріст бактерій. Суміш інкубували при 37°C протягом 24 годин. Після інкубації суміш центрифугували при 4 000 x g протягом 20 хвилин за температури 4°C. Наявність бактеріофагів у супернатанті перевіряли одношаровим методом. Окремі ізовані бляшки відбирали для другого раунду ампліфікації. Процедури очищення повторювали щонайменше тричі для отримання чистих ліній фагів. Фагові суспензії додатково очищували та концентрували за допомогою преципітації поліетиленгліколем [18]. Отримані суспензії фагів зберігали при температурі 4°C.

Розмір і морфологію фагів було досліджено за допомогою просвічувальної (трансмисійної) електронної мікроскопії. Уся робота виконана в лабораторії електронної мікроскопії кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України, а також на базі Центру колективного користування електронними мікроскопами НАН України (ЦККЕМ). Фагову суспензію готували в буфері SM з концентрацією фагів не менше ніж 10^9 БУО/мл. Контрастування виконували з використанням 2% розчину фосфорно-вольфрамової кислоти (рН 6,8). Час експозиції у контрастувальному розчині становив 1-2 хвилини.

Експерименти виконували у трьох повторях, а статистичний аналіз здійснювали з використанням середнього значення та стандартного відхилення (SD). Для порівняння середніх значень кількості бляшок на середовищах і визначення впливу факторів на репродукцію бактеріофагів застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). Значення p менше 0,05 вважалося статистично значущим.

Результати дослідження.

Усі фаги, використані в дослідженнях, були виділені з проб міських стічних вод м. Києва. Їх специфічну активність підтверджено за допомогою Spot-тесту та одношарового методу (модифікація методу Грація). Аналіз із використанням трансмісійної електронної мікроскопії (TEM) показав, що ізовані бактеріофаги належать до різних морфологічних груп (рис. 1).

Відповідно, у дослідженні були використані бактеріофаги, представлені трьома основними морфотипами: *Siphoviridae* (фаги *Enb2f*, *Enfs 14f*, *Enfm 1f*, *Kl178f*, *Pr48f*, *P15f*), *Podoviridae* (фаги *Ac28f*, *St12f*) та *Myoviridae* (фаг *E44f*).

Для визначення впливу окремих факторів, зокрема глюкози та іонів Ca^{2+} , використовували поживний агар для культивування мікроорганізмів виробництва HiMedia. На попередньому етапі дослідження це поживне середовище продемонструвало найкращі результати щодо підтримки бляшкоутворення у різних типів бактеріофагів.

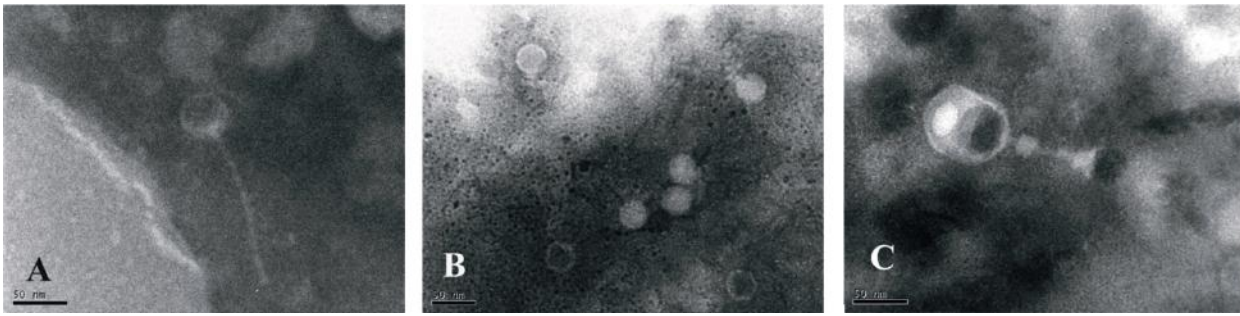


Рисунок 1 – Морфологічні особливості бактеріофагів, що використанні в досліді: А – бактеріофаг *Enfs 14f* активний у відношенні *Enterococcus faecalis*; В – бактеріофаг *St-12f* активний у відношенні *Staphylococcus aureus*; С – бактеріофаг *E44f* активний у відношенні *Escherichia coli*.

Експериментально підтверджено, що додавання глюкози (1%) та іонів Ca^{2+} (50 mM) по-різному впливає на феномен бляшкоутворення (розмір і кількість) у різних бактеріофагів. Додавання глюкози та іонів Ca^{2+} не впливало на кількість утворених бляшок та їх розмір у бактеріофага *Ac28f*, активного щодо *Acinetobacter baumannii*. У випадку бактеріофага *E44f*, специфічного до *Escherichia coli*, додавання глюкози призводило до зменшення кількості бляшок від 250 до 0 ($P\text{-value} < 0.05$), тоді як іони Ca^{2+} збільшували їх кількість на 115% ($P\text{-value} < 0.05$), не впливаючи на розмір бляшок (контроль $0,4 \pm 0,05$ та $0,44 \pm 0,05$ в досліді, $P\text{-value} \geq 0.05$). У бактеріофага *Enb2f*, специфічного до *Enterobacter cloacae*, додавання глюкози спричиняло збільшення кількості бляшок на 164% ($P\text{-value} < 0.05$) із незначним збільшенням їх діаметра (контроль $2,27 \pm 0,66$ та $2,67 \pm 0,39$, $P\text{-value} < 0.05$), тоді як додавання іонів Ca^{2+} не впливало на кількість, але дещо зменшувало їх розмір (контроль $2,27 \pm 0,66$ та $2,07 \pm 0,11$, $P\text{-value} \geq 0.05$).

У бактеріофага *Enfs 14f*, специфічного до *Enterococcus faecalis*, іони Ca^{2+} сприяли збільшенню кількості бляшок на 120% ($P\text{-value} \geq 0.05$) та їх діаметра (контроль $0,53 \pm 0,09$ та $0,64 \pm 0,11$, $P\text{-value} < 0.05$), тоді як додавання глюкози зменшувало як їх розмір ($0,53 \pm 0,09$ та $0,47 \pm 0,06$, $P\text{-value} < 0.05$), так і кількість на 10% ($P\text{-value} \geq 0.05$) (рис. 2 та рис. 3а).

У бактеріофага *Pr48f*, специфічного до *Proteus mirabilis*, додавання глюкози спричиняло значне інгібування бляшкоутворення: кількість бляшок зменшувалася на 29% ($P\text{-value} < 0.05$), а їх розмір також суттєво зменшувався (контроль $1,84 \pm 0,45$ та $1,17 \pm 0,15$ в досліді, $P\text{-value} < 0.05$). Додавання іонів Ca^{2+} не впливало на розмір бляшок, проте зменшувало їх кіль-

кість на 16% ($P\text{-value} \geq 0.05$), супроводжуючись появою мутності (рис. 4 та рис. 3б).

У випадку бактеріофага *Enfm 1f*, специфічного до *Enterococcus faecium*, глюкоза спричиняла зменшення кількості бляшок на 56% ($P\text{-value} < 0.05$) та їх діаметра (контроль $2,08 \pm 0,37$ та $0,66 \pm 0,05$ в досліді, $P\text{-value} < 0.05$). Додавання іонів Ca^{2+} збільшувало кількість бляшок на 108% ($P\text{-value} \geq 0.05$), не впливаючи на їх розмір (контроль $2,08 \pm 0,37$ та $2,095 \pm 0,37$ в досліді, $P\text{-value} \geq 0.05$). Бактеріофаг *Kl178f*, специфічний до *Klebsiella pneumoniae*, демонстрував відсутність впливу глюкози на кількість бляшок із незначним збільшенням їх розміру (контроль $1,91 \pm 0,2$ та $2,11 \pm 0,07$ в досліді, $P\text{-value} < 0.05$). Додавання іонів Ca^{2+} призводило до незначного збільшення кількості бляшок (на 112%, $P\text{-value} \geq 0.05$), не впливаючи на їх діаметр (контроль $1,91 \pm 0,2$ та $1,96 \pm 0,05$ в досліді).

Бактеріофаг *P15f*, специфічний до *Pseudomonas aeruginosa*, демонстрував збільшення кількості бляшок на 111% ($P\text{-value} \geq 0.05$) та їх розміру (контроль $2,17 \pm 0,3$ та $2,15 \pm 0,35$ в досліді, $P\text{-value} < 0.05$) при додаванні глюкози, що супроводжувалося інтенсивним пігментоутворенням синьо-зеленого кольору. Іони Ca^{2+} не впливали на кількість бляшок, але незначно збільшували їх розмір (контроль $2,17 \pm 0,3$ та $2,39 \pm 0,45$ в досліді, $P\text{-value} \geq 0.05$).

Нарешті, у бактеріофага *St12f*, специфічного до *Staphylococcus aureus*, глюкоза викликала значне зменшення кількості бляшок на 60% ($P\text{-value} < 0.05$) та їх розміру (контроль $1,27 \pm 0,06$ та $0,88 \pm 0,07$ в досліді, $P\text{-value} < 0.05$). Іони Ca^{2+} сприяли мінімальному збільшенню кількості бляшок на 104% ($P\text{-value} \geq 0.05$) та їх розміру (контроль $1,27 \pm 0,06$ та $1,31 \pm 0,06$ в досліді, $P\text{-value} \geq 0.05$).

Обговорення результатів дослідження.

Отримані результати демонструють специфічний вплив глюкози та іонів Ca^{2+} на процеси бляшкоутворення різних бактеріофагів залежно від їх морфотипу та бактерії-хазяїна. Це підтверджує важливість індивідуального підходу до оптимізації умов культивування фагів при їх виділенні та накопиченні з метою їх подальшого використання як у дослідженнях так і при фаготерапії інфекційних захворювань.

Встановлено, що глюкоза має суттєвий інгібуючий вплив на бляшкоутворення у фагів *E44f*, *Enfm 1f*, *Pr48f*, *St12f*, які є специфічними до *Escherichia coli*,

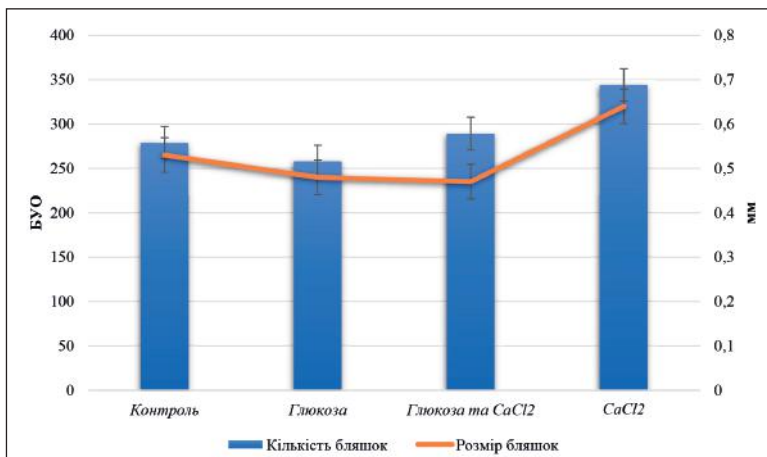


Рисунок 2 – Вплив різних факторів на репродукцію бактеріофагів *Enfs 14f*.

Enterococcus faecium, *Proteus mirabilis* та *Staphylococcus aureus* відповідно. Зокрема, для фага E44f кількість бляшок зменшилася до нуля (P -value<0.05), що свідчить про сильний негативний вплив глюкози на процес фагового інфікування. Подібна тенденція спостерігається у фагів Pr48f та St12f, де зниження кількості бляшок супроводжується значним зменшенням їх розміру. Це може бути пов'язано зі змінами у метаболічній активності бактерій-хазяїв та зміни структури клітинної стінки під впливом глюкози, що знижує ефективність адсорбції та репродукції бактеріофагів [19, 20]. Дана закономірність була підтверджена експериментальними дослідженнями іншими дослідниками з використанням фагу λ [C57] [16]. При культивуванні фагів T4 у середовищі LB із глюкозою також спостерігалось зменшення титрів фагів у порівнянні із LB без глюкози [11]. Окремі дослідження натомість вказують на підтримку репродукції бактеріофагів при додаванні до поживного середовища глюкози. Так, *Jessica Silva et al.* було показано, що ефективним способом культивування фагу T7 при використанні мінімального середовища, що містило глюкозу – M9/глюкоза [21].

Іони Ca^{2+} , навпаки, здебільшого сприяли збільшенню кількості бляшок або їх розміру у більшості досліджуваних фагів. Наприклад, для фага E44f кількість бляшок зросла на 115% (P -value<0.05), що свідчить про стимулювальний вплив іонів Ca^{2+} на процеси адсорбції фагів та їх проникнення у бактерії. Подібні результати отримані для фагів Enf5 14f та Enf5 1f, специфічних до *Enterococcus faecalis* та *Enterococcus faecium* відповідно. У цих випадках збільшення кількості або розміру бляшок свідчить про покращення ефективності інфекційного циклу фагів за рахунок підвищеної стабільності капсиду або покращення взаємодії фагів із клітинною поверхнею бактерій. Дана закономірність була підтверджена рядом експериментальних робіт. Дослідження зміни морфології фагу ϕX174 під дією іонів Ca^{2+} показало зміну епітопів бактеріофагів, що відповідають за прикріплення вірусу до ліпополісахаридів клітинної стінки на початкових стадіях інфікування *Escherichia coli* [22]. Експерименти з інфікування фагами, ДНК яких була радіоактивно помічена, показали, що при високих концентраціях Ca^{2+} мітка залишалася пов'язаною з клітинами-хазяїнами до початку лізису. Однак при низьких концентраціях була виявлена дисоціація між ДНК фага та хазяїном, хоча адсорбція відбувалася з нормальною швидкістю. Таким чином, для проникнення фагової ДНК окремим бактеріофагам потрібна висока концентрація Ca^{2+} [13].

Цікавими є результати для фага P1Sf, активного щодо *Pseudomonas aeruginosa*. Додавання глюкози незначно збільшувало кількість бляшок на 111% (P -value ≥ 0.05) та сприяло пігментоутворенню синьо-зеленого кольору. Це може бути наслідком ак-

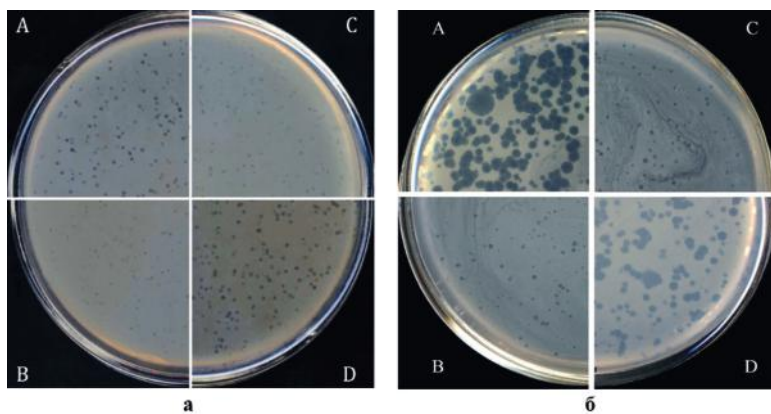


Рисунок 3 – Вплив різних факторів на ріст бактеріофагів: а – *Enterococcus faecalis* DSM 2570, б – *Proteus mirabilis* DSM 6674. Позначення: А – поживний агар для культивування мікроорганізмів (HiMedia), В – поживний агар для культивування мікроорганізмів (HiMedia) з додаванням глюкози (1%), С – поживний агар для культивування мікроорганізмів (HiMedia) з додаванням глюкози (1%) та CaCl_2 (50 mM), D – поживний агар для культивування мікроорганізмів (HiMedia) з додаванням CaCl_2 (50 mM).

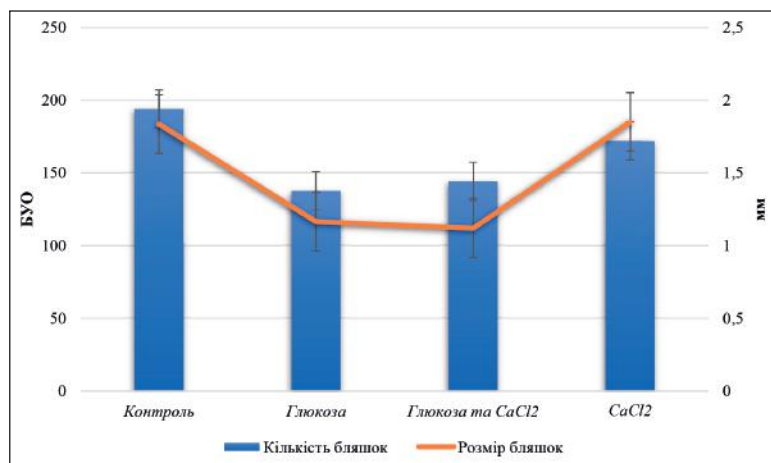


Рисунок 4 – Вплив різних факторів на репродукцію бактеріофагів Pr48f.

тивації метаболічних шляхів *P. aeruginosa*, які сприяють покращенню реплікації фага. Іони Ca^{2+} в цьому випадку не впливали на кількість бляшок, але дещо збільшували їх розмір, що свідчить про специфічний характер впливу цих факторів.

Не менш важливими є дані про вплив глюкози на фаг Enb2f, специфічний до *Enterobacter cloacae*. У цьому випадку додавання глюкози спричиняло збільшення кількості бляшок на 164% (P -value < 0.05) із незначним збільшенням їх розміру. Це може бути пов'язано із стимуляцією реплікації бактерій-хазяїв, що, у свою чергу, забезпечує більше субстрату для реплікації фагів.

Відмінності у впливі глюкози та іонів Ca^{2+} на бляшкоутворення можуть пояснюватися різними механізмами взаємодії бактеріофагів із бактеріями-хазяями. Глюкоза може змінювати метаболічний стан бактерій, впливаючи на синтез рецепторів для адсорбції фагів, тоді як іони Ca^{2+} здатні стабілізувати структуру бактеріофагів та полегшувати проникнення ДНК у клітину. Крім того, певні відмінності між морфотипами фагів (Siphoviridae, Podoviridae, Myoviridae) можуть впливати на їх чутливість до зазначених факторів.

Висновки.

Формування бляшок є однією із ключових характеристик бактеріофагів, що активно досліджується в

науковій спільноті. Розуміння механізмів цього процесу має важливе значення для вдосконалення фагової терапії та оптимізації культивування бактеріофагів у лабораторних умовах. Наші результати демонструють, що інфекційність фагів залежить від наявності конкретних компонентів у поживному середовищі, що підкреслює важливість додаткових лабораторних досліджень перед їх практичним застосуванням у медичній практиці.

Перспективи подальших досліджень.

Вивчення впливу інших хімічних компонентів, зокрема різних класів вуглеводів у складі поживних середовищ, може допомогти виявити додаткові фактори, що впливають на реплікацію фагів. Дослідження механізмів, за допомогою яких глюкоза та іони Ca^{2+} впливають на адсорбцію, проникнення та реплікацію бактеріофагів у бактерій, дозволить краще зрозуміти молекулярні основи цих процесів.

References / Література

1. Hahn A, Sami I, Chaney H, Koumbourlis AC, Del Valle Mojica C, Cochrane C, et al. Bacteriophage therapy for pan-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in two persons with Cystic Fibrosis. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*. 2023;11:23247096231188243. DOI: [10.1177/23247096231188243](https://doi.org/10.1177/23247096231188243).
2. Chung KM, Nang SC, Tang SS. The safety of bacteriophages in treatment of diseases caused by multidrug-resistant bacteria. *Pharmaceuticals*. 2023;16(10):1347. DOI: [10.3390/ph16101347](https://doi.org/10.3390/ph16101347).
3. Huang Y, Wang W, Zhang Z, Gu Y, Huang A, Wang J, et al. Phage products for fighting antimicrobial resistance. *Microorganisms*. 2022;10(7):1324. DOI: [10.3390/microorganisms10071324](https://doi.org/10.3390/microorganisms10071324).
4. Manohar P, Loh B, Nachimuthu R, Leptihn S. Phage-antibiotic combinations to control *Pseudomonas aeruginosa*–*Candida* two-species biofilms. *Scientific Reports*. 2024;14(1):9354. DOI: [10.1038/s41598-024-59444-2](https://doi.org/10.1038/s41598-024-59444-2).
5. De Soir S, Parée H, Kamarudin NH, Wagemans J, Lavigne R, Braem A, et al. Exploiting phage-antibiotic synergies to disrupt *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms in the context of orthopedic infections. *Microbiology Spectrum*. 2024;12(1):e0321923. DOI: [10.1128/spectrum.03219-23](https://doi.org/10.1128/spectrum.03219-23).
6. Aminov R, Caplin J, Chanishvili N, Coffey A, Cooper I, De Vos D, et al. Application of bacteriophages. *Microbiology Australia*. 2017;38(2):63. DOI: [10.1071/ma17029](https://doi.org/10.1071/ma17029).
7. Clokier MR, Kropinski AM, editors. *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology™*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. Chapter, Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis; p. 161-74. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_17.
8. Perlemoine P, Marcoux PR, Picard E, Hadji E, Zelsmann M, Mugnier G, et al. Phage susceptibility testing and infectious titer determination through wide-field lensless monitoring of phage plaque growth. *PLOS ONE*. 2021;16(3):e0248917. DOI: [10.1371/journal.pone.0248917](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248917).
9. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(23):8227-33. DOI: [10.1128/aem.02371-12](https://doi.org/10.1128/aem.02371-12).
10. Abedon ST, Culler RR. Optimizing bacteriophage plaque fecundity. *Journal of Theoretical Biology*. 2007;249(3):582-92. DOI: [10.1016/j.jtbi.2007.08.006](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.08.006).
11. Taj MK, Yunlin W, Taj I, Hassani TM, Samreen Z, Ling JX, et al. Various culture media effect on T4 phage lysis and production. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 2013;4(3):543-546.
12. Kuhn A, Kellenberger E. Productive phage infection in *Escherichia coli* with reduced internal levels of the major cations. *Journal of Bacteriology*. 1985;163(3):906-12. DOI: [10.1128/jb.163.3.906-912.1985](https://doi.org/10.1128/jb.163.3.906-912.1985).
13. Steensma HY, Blok J. Effect of calcium ions on the infection of *Bacillus subtilis* by bacteriophage ϕ 6. *Journal of General Virology*. 1979;42(2):305-14. DOI: [10.1099/0022-1317-42-2-305](https://doi.org/10.1099/0022-1317-42-2-305).
14. Shafia F, Thompson TL. Calcium ion requirement for proliferation of bacteriophage ϕ 4. *Journal of Bacteriology*. 1964;88(2):293-6. DOI: [10.1128/jb.88.2.293-296.1964](https://doi.org/10.1128/jb.88.2.293-296.1964).
15. Nagaraja V, Gopinathan KP. Requirement for calcium ions in Mycobacteriophage ϕ 3 DNA injection and propagation. *Archives of Microbiology*. 1980;124(2-3):249-54. DOI: [10.1007/bf00427734](https://doi.org/10.1007/bf00427734).
16. Weissbach A, Jacob F. Effect of glucose on the formation of bacteriophage λ . *Nature*. 1962;193(4811):197-8. DOI: [10.1038/193197a0](https://doi.org/10.1038/193197a0).
17. Sumrall ET, Schneider SR, Boulos S, Loessner MJ, Shen Y. Glucose decoration on wall teichoic acid is required for phage adsorption and inib-mediated virulence in *Listeria ivanovii*. *Journal of Bacteriology*. 2021;203(16):e0013621. DOI: [10.1128/jb.00136-21](https://doi.org/10.1128/jb.00136-21).
18. Kunisch F, Wagemans J, Moreno MG. Bacteriophage precipitation with polyethylene glycol (PEG). *Research Square*. 2023. DOI: [10.21203/rs.3.pex-1956/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1956/v1).
19. Luo Z, Yue S, Chen T, She P, Wu Y, Wu Y. Reduced growth of *Staphylococcus aureus* under high glucose conditions is associated with decreased pentaglycine expression. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:537290. DOI: [10.3389/fmicb.2020.537290](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.537290).
20. Beck C, Krusche J, Notaro A, Walter A, Kränkel L, Vollert A, et al. Wall teichoic acid substitution with glucose governs phage susceptibility of *Staphylococcus epidermidis*. *mBio*. 2024;15(4):e0199023. DOI: [10.1128/mbio.01990-23](https://doi.org/10.1128/mbio.01990-23).
21. Silva J, Dias R, Junior JI, Marcelino M, Silva M, Carmo A, et al. A rapid method for performing a multivariate optimization of phage production using the RCCD approach. *Pathogens*. 2021;10(9):1100. DOI: [10.3390/pathogens10091100](https://doi.org/10.3390/pathogens10091100).
22. Ilag LL, McKenna R, Yadav MP, BeMiller JN, Incardona NL, Rossmann MG. Calcium ion-induced structural changes in bacteriophage ϕ X174. *Journal of Molecular Biology*. 1994;244(3):291-300. DOI: [10.1006/jmbi.1994.1730](https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1730).

ВПЛИВ РІЗНИХ КОМПОНЕНТІВ ПОЖИВНИХ БАКТЕРІОЛОГІЧНИХ СЕРЕДОВИЩ НА БЛЯШКОУТВОРЕННЯ БАКТЕРІОФАГІВ

Понятовський В. А., Широбоков В. П., Бобир В. В.

Резюме. Бактеріофаги відіграють важливу роль у регуляції мікробних спільнот, беруть участь у горизонтальному перенесенні генетичного матеріалу та широко застосовуються в біотехнології та медицині. Зокрема, фаготерапія розглядається як перспективне доповнення до антибіотикотерапії у боротьбі з патогенними бактеріями, особливо в умовах зростаючої антибіотикорезистентності.

Процес репродукції бактеріофагів тісно пов'язаний з параметрами середовища, в якому відбувається фагова інфекція. Поживне середовище, яке забезпечує умови для росту бактерій-господарів, також може і визначати ефективність фагової репродукції.

У дослідженні вивчено вплив глюкози та іонів Ca^{2+} на репродукцію бактеріофагів, активних проти дев'яти видів бактерій, що мають найбільше клінічне значення (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*). Для ізоляції фагів використовували проби міських стічних вод Києва, а морфологію вірусних частинок аналізували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії. Дослідження показало, що всі бактеріофаги належать до морфотипів *Siphoviridae*, *Podoviridae* та *Myoviridae*. Вплив досліджуваних факторів оцінювали шляхом аналізу кількості, розміру та морфології бляшок.

Додавання 1% глюкози мало значний інгібуючий ефект на репродукцію фагів, специфічних до *Escherichia coli* (фаг E44f), *Enterococcus faecium* (фаг Enfм 1f), *Proteus mirabilis* (фаг Pr48f) та *Staphylococcus aureus* (фаг St12f). У випадку E44f кількість бляшок зменшилася до нуля ($P < 0,05$). Для Pr48f та St12f зменшення кількості супроводжувалося зменшенням розміру бляшок, що може свідчити про порушення процесу адсорбції або зміну клітинної стінки бактерій чи метаболітичних процесів бактеріальних клітин.

Іони Ca^{2+} здебільшого мали стимулювальний вплив на бляшкоутворення.

Отримані результати демонструють значну варіабельність впливу факторів залежно від типу бактеріофага та його мішені, що є важливим для розробки методів фаготерапії та оптимізації умов культивування бактеріофагів.

Ключові слова: бактеріофаги, бляшкоутворення, глюкоза.

THE INFLUENCE OF DIFFERENT COMPONENTS OF NUTRIENT BACTERIOLOGICAL MEDIA ON PLAQUE FORMATION OF BACTERIOPHAGES

Poniatovskiy V. A., Shyrobokov V. P., Bobyr V. V.

Abstract. Bacteriophages play a crucial role in regulating microbial communities, participating in horizontal gene transfer, and are widely used in biotechnology and medicine. In particular, phage therapy is considered a promising complement to antibiotic therapy in combating pathogenic bacteria, especially in the context of increasing antibiotic resistance.

The process of bacteriophage reproduction is closely linked to the environmental parameters in which phage infection occurs. The nutrient medium that supports the growth of bacterial hosts can also determine the efficiency of phage reproduction.

This study investigated the effect of glucose and Ca^{2+} ions on the reproduction of bacteriophages active against nine clinically significant bacterial species (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*). Bacteriophages were isolated from municipal wastewater samples in Kyiv, and the morphology of viral particles was analyzed using transmission electron microscopy. The study revealed that all bacteriophages belonged to the *Siphoviridae*, *Podoviridae*, and *Myoviridae* morphotypes. The effect of the studied factors was assessed by analyzing the number, size, and morphology of plaques.

The addition of 1% glucose had a significant inhibitory effect on the reproduction of phages specific to *Escherichia coli* (phage E44f), *Enterococcus faecium* (phage Enfм 1f), *Proteus mirabilis* (phage Pr48f), and *Staphylococcus aureus* (phage St12f). In the case of E44f, the number of plaques decreased to zero ($P < 0.05$). For Pr48f and St12f, the reduction in plaque number was accompanied by a decrease in plaque size, which may indicate disruptions in the adsorption process or alterations in bacterial cell wall structure or metabolic processes.

Ca^{2+} ions predominantly had a stimulating effect on plaque formation.

The obtained results demonstrate significant variability in the impact of environmental factors depending on the type of bacteriophage and its bacterial target. These findings are important for developing phage therapy approaches and optimizing bacteriophage cultivation conditions.

Key words: bacteriophages, plaque formation, glucose.

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Poniatovskiy V. A.: <https://orcid.org/0000-0002-1503-3935>^{BDE}

Shyrobokov V. P.: <https://orcid.org/0000-0003-0882-148X>^{AF}

Bobyr V. V.: <https://orcid.org/0000-0002-8310-8011>^{CDE}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Poniatovskiy Vadym Anatoliiovych / Понятовський Вадим Анатолійович

Bogomolets National Medical University / Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Ukraine, 03057, Kyiv, 34 Veresteyskyi Ave. / Адреса: Україна, 03057, м. Київ, пр. Берестейський 34

Tel.: +380664239055 / Тел.: +380664239055

E-mail: v.poniatovskiy@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 13.10.2024 / Стаття надійшла 13.10.2024 року

Accepted 04.03.2025 / Стаття прийнята до друку 04.03.2025 року