

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
химической биологии и фундаментальной медицины

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет»

На правах рукописи

Ждид Гадир

**Изучение новых бактериофагов
условно-патогенных бактерий и факторов,
влияющих на их взаимодействие с бактериями**

1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
д.б.н., доцент, Тикунова Н.В.
к.б.н. Морозова В.В.

Новосибирск, 2026

Оглавление

Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Бактериофаги: геномика и образ жизни.....	11
1.2. Рост устойчивости к антибиотикам и перспективы фаготерапии 18	
1.3. Факторы, влияющие на коэволюцию фагов и бактерий	24
1.3.1. Скорость накопления мутаций в фаговых геномах и мутационная нагрузка.....	24
1.3.2. Механизмы коэволюции фагов и бактерий.....	25
1.3.3. Возникновение фагорезистентности после инфекции бактериофагами.....	28
1.3.4. Коэволюционная динамика.....	30
1.3.5. Факторы, влияющие на результаты экспериментов по коэволюции	34
1.3.6. Ограничения проведённых исследований по коэволюции фагов и бактерий	47
1.3.7. Роль коэволюции фагов и бактерий для фаготерапии.....	49
1.4. Виды бактерий, включенные в исследование.....	53
1.4.1. <i>Enterobacter cloacae</i>	53
1.4.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	54
1.4.3. <i>Aeromonas popoffii</i>	55
Глава 2. Экспериментальная часть	57
2.1. Реактивы, буферы, среды и наборы	57
2.2. Оборудование.....	57
2.3. Олигонуклеотиды.....	58
2.4. Бактериальные штаммы и бактериофаги	58
2.5. Исследование бактерий.....	59

2.5.1. Определение чувствительности бактериальных штаммов <i>S. maltophilia</i> к антибиотикам, селекция изолятов <i>S. maltophilia</i> с устойчивостью к фагу StM171 и повторное тестирование их резистентности к антибиотикам	59
2.5.2. Исследование образования и ингибирования биопленки <i>S. maltophilia</i>	61
2.5.3. Индукция профагов.....	62
2.5.4. Выделение, очистка и секвенирование геномной ДНК штаммов <i>S. maltophilia</i>	62
2.5.5. Анализ бактериальных геномов <i>in silico</i>	63
2.5.6. Генотипирование устойчивости к антибиотикам <i>in silico</i>	63
2.5.7. Анализ бактериального пангенома <i>in silico</i>	63
2.5.8. Анализ систем противофаговой защиты	64
2.5.9. Определение островков противофаговой защиты	65
2.6. Исследование фагов	66
2.6.1. Нарботка и очистка фаговых препаратов	66
2.6.2. Анализ биологических свойств фагов.....	66
2.6.3. Выделение и очистка фаговой ДНК	68
2.6.4. Секвенирование и сборка геномов фагов.....	68
2.6.5. Анализ фагового генома <i>in silico</i>	69
2.6.6. Филогенетический анализ фагов	69
2.6.7. Оптимизация метода количественного ПЦР для характеристики эффективности фаговой инфекции	71
2.6.8. Эксперимент по коэволюции EC151, EC152, StM171 и StenM174 с их бактериальными хозяевами	73
2.6.9. Оценка инфекционной эффективности пассированных фагов	

2.7. Статистика.....	76
Глава 3. Результаты и обсуждение	78
3.1. Характеристика бактериофагов.....	78
3.1.1. Характеристика фага <i>E. cloacae</i> EC151.....	78
3.1.2. Характеристика фага <i>E. cloacae</i> EC152.....	86
3.1.3. Характеристика фага <i>A. popoffii</i> AerP_220.....	89
3.1.4. Характеристика фага <i>S. maltophilia</i> StM171.....	99
3.2. Влияние слаболитического StM171 на действие антибиотиков против разных штаммов <i>S. maltophilia</i>	108
3.2.1. Изучение совместного действия антибиотиков и фага <i>S. maltophilia</i> StM171 на бактериальные клетки.....	108
3.2.2. Изменения чувствительности к антибиотикам у клонов <i>S. maltophilia</i> , развивших резистентность к StM171	111
3.3. Коэволюция фагов с их хозяевами.....	115
3.3.1. Результаты оптимизации подготовки образцов с фаговой ДНК в качестве матрицы для qPCR	115
3.3.2. Результаты адаптации фагов EC151 и EC152 к <i>E. cloacae</i> КЭМТК 2064116	
3.3.3. Результаты адаптации фагов StM171 и StenM174 к <i>S. maltophilia</i> КЭМТК 2355.....	118
3.4. Анализ генов устойчивости к антибиотикам и систем защиты от фагов у <i>S. maltophilia</i>	122
3.4.1. Общая характеристика геномов чувствительных к фагу штаммов <i>S. maltophilia</i> , найденных в Новосибирске	122
3.4.2. Гены устойчивости к антибиотикам у <i>S. maltophilia</i> КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670, и гены, отвечающие за способность формировать биопленки	123
3.4.3. Оценка гетерогенности геномов <i>S. maltophilia</i>	125

3.4.4. Системы защиты от фагов у <i>S. maltophilia</i>	127
3.4.5. Островки антифаговой защиты в геномах <i>S. maltophilia</i>	130
3.4.6. Изменчивость защитных систем у <i>S. maltophilia</i>	134
3.4.7. Схема оккупации островков защиты.....	135
Заключение	141
Выводы.....	144
Список сокращений	146
Список литературы.....	147

Введение

Актуальность исследования

С ростом антибиотикорезистентности бактериофаги (фаги) вновь приобретают популярность как перспективная и эффективная терапевтическая альтернатива. Эти вирусы бактерий всё чаще используются для лечения пациентов, а правила их применения активно обсуждаются и внедряются по всему миру [1–3]. Это сопровождается многочисленными исследованиями оптимальных способов применения фагов в терапии. Известно, что фаги обладают рядом преимуществ перед антибиотиками; в отличие от антибиотиков, они широко доступны в природе, они способны адаптироваться к своим бактериальным хозяевам и обладают высокой специфичностью, что позволяет им не повреждать здоровую микрофлору.

Эта высокая специфичность, характерная для большинства фагов, представляет потенциальный недостаток. Высокая специфичность означает, что подходящие фаги могут отсутствовать для конкретного патогенного бактериального штамма пациента. Для решения этой проблемы новый фаг может быть изолирован из природы с использованием патогенного штамма. В этом случае характеристики фага должны быть тщательно изучены для подтверждения его пригодности к терапии. Не все фаги можно использовать в терапии, например, лизогенные фаги, даже если они специфичны к патогенному штамму, непригодны, поскольку они могут усиливать негативные свойства целевой бактерии и даже защищать ее от других литических фагов. Слаболитические фаги также не являются предпочтительным вариантом для терапии, даже если это единственный доступный вариант, и поэтому их редко используют для фаготерапии [2].

Важно отметить, что существующий литический фаг можно адаптировать к штамму пациента. Эта адаптация проводится путём инкубации фага с целевым штаммом в течение ряда пассажей [4]. Взаимодействие между фагом и бактерией может вызывать спонтанные мутации в геноме фага, позволяющие ему приспособиться и инфицировать новый штамм [5]. Результаты этой процедуры неоднозначны и зависят от множества факторов. Выбор правильных факторов может ускорить процесс адаптации и создать высоко литические фаги с

расширенным спектром хозяев. Однако процесс адаптации фагов в различных условиях с последующим отбором факторов и скринингом лучших вариантов трудоёмок, и существует потребность в его совершенствовании.

Помимо изучения характеристик фагов и их взаимодействия с бактериями, крайне важно понимать бактериального хозяина — и его механизмы защиты от фагов. В ходе эволюционной истории бактерии накопили широкий спектр антифаговых систем защиты и механизмов, позволяющих им уклоняться от потенциально терапевтических фагов [6,7]. Изучение распространения антифаговых систем позволяет выбирать терапевтические фаги с контрмеханизмами. Например, целевая бактерия может обладать системами рестрикции-модификации, разрушающими геномы фагов; в этом случае фаг, модифицирующий свой геном, сможет противостоять бактериальным ферментам и даст лучшие терапевтические результаты. Кроме того, бактерии могут избегать фаговой инфекции путём мутаций или снижения экспрессии мембранных белков, используемых фагами как рецепторы. Некоторые из этих белков играют роль в антибиотикорезистентности, и в этом случае, при снижении их экспрессии и появлению резистентности к фагу восстанавливается чувствительность инфекционного агента к антибиотикам.

По всем вышеуказанным причинам изучение этих трёх направлений — пригодности фагов к терапии, спектра бактериальных систем защиты и возможной коэволюции между фагами и бактериями — имеет критическое значение, поскольку это позволяет разрабатывать лучшие варианты лечения и расширять наше понимание факторов, способствующих успеху фаговой терапии.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлась микробиологическая и генетическая характеристика новых бактериофагов и изучение их взаимодействия со своими бактериальными хозяевами, включая противофаговые защитные системы последних. Исходя из поставленной цели, были решены следующие задачи:

1. Изучение биологических свойств фагов *Enterobacter cloacae* EC151 и EC152, *Aeromonas popoffii* AerP_220 и *Stenotrophomonas maltophilia* StM171.

2. Анализ особенностей геномов фагов *E. cloacae* EC151 и EC152, *A. popoffii* AerP_220 и *S. maltophilia* StM171 и определение их таксономического положения.

3. Изучение динамики эволюции фагов *E. cloacae* EC151 и EC152, а также фагов *S. maltophilia* StM171 и StenM174 при культивировании их с бактериями-хозяевами в различных условиях.

4. Пангеномный анализ систем защиты от фагов *S. maltophilia*, включая штаммы, чувствительные к фагу StM171, и поиск генов устойчивости к антибиотикам в геномах фагочувствительных штаммов.

Научная новизна работы. Впервые изучены литические свойства и организация геномов фагов *E. cloacae* EC151 и EC152, *A. popoffii* AerP_220 и *S. maltophilia* StM171. Для таксономической классификации этих фагов были предложены три новых таксономических единицы. Проанализирована динамика эволюции фагов *E. cloacae* EC151 и EC152, а также *S. maltophilia* StenM171 и StenM174 в различных условиях. Для изучения ко-эволюции фагов была оптимизирован метод количественного ПЦР (qPCR). Изучены геномные особенности пяти новосибирских штаммов *S. maltophilia* – хозяев StM171 и определены системы устойчивости к антибиотикам. Впервые проведен пангеномный анализ для 72 штаммов *S. maltophilia*, имевших корректный уровень сборки геномов; проанализированы их системы антифаговой защиты.

Теоретическая и практическая значимость работы. В рамках данной работы были изучены четыре новых бактериофага и их взаимодействие с бактериальными хозяевами. Исследование предоставило новые сведения о факторах, которые могут быть использованы для адаптации фагов для терапевтических целей. Получены данные о системах антифаговой защиты *S. maltophilia* и имеющихся в геномах этих бактерий островках защиты, что позволяет более эффективно подбирать фаги для терапии и выявлять новые системы защиты. Эти результаты имеют важное значение для внедрения фаговой терапии, особенно в отношении бактерий с высокой устойчивостью к антибиотикам.

Положения, выносимые на защиту:

1. Комплексная геномная характеристика показала, что фаг *S. maltophilia* StM171 является представителем нового вида *Nordvirus*, а фаг *A. popoffii*

AerP_220 – представителем нового рода *Yinyavirus* и нового подсемейства *Tolavirinae*.

2. Фаг StM171 может способствовать восстановлению чувствительности к бета-лактамам антибиотикам и появлению резистентности к эритромицину у бактерий-хозяев.
3. Адаптация фагов EC151, EC152, StM171 и StenM174 к их бактериальным хозяевам с течением времени зависит от особенностей фага и условий ко-эволюции; присутствие эволюционно наивного хозяина улучшает результаты адаптации.
4. Комплекс *S. maltophilia* содержит широкий набор систем защиты от фагов, которые значительно различаются у разных штаммов, и островки антифаговой защиты представляют собой консервативные участки генома *S. maltophilia*.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатанные работы. Результаты работ представлены на 13 российских и международных конференциях: Open-Bio (Россия, 2020, 2023 и 2024), Evergreen (США, 2020), Конференция сирийских исследователей-эмигрантов (Сирия, 2020, 2022 и 2024), BioTop (Россия, 2020), От молекулярной биологии до генетической диагностики (Россия, 2023), Европейский конгресс клинической микробиологии и инфекционных заболеваний (Дания, 2023), Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению (Россия, 2024)

Личный вклад соискателя. Автор самостоятельно провел исследования биологических характеристик фагов и бактерий, в том числе: исследование бактериальных биопленок, исследование профиля антибиотикорезистентности бактериальных штаммов и др. Автор также самостоятельно провел биоинформационный анализ геномов фагов и бактерий, включая обработку данных секвенирования и исследование бактериальных систем защиты от фагов. Автор самостоятельно разработал оптимизированный метод qPCR для изучения биологических характеристик фагов. Автор разработал концепцию и спланировал следующие исследовательские проекты: изучение фага StM171, исследование эволюции бактериофагов *in vitro* с использованием qPCR для определения

эффективности фаговой инфекции, исследование *in silico* геномных особенностей изучаемых штаммов бактерий.

Изучаемые фаги первоначально были изолированы к.б.н. Ю.Н. Козловой, секвенирование геномов фагов было проведено к.б.н. А.Ю. Тикуновым, (ЛММБ ИХБФМ СО РАН), секвенирование бактериальных геномов – к.б.н. А. Манаховым (Университет Сириус, Сочи), визуализация фагов с помощью электронной микроскопии была выполнена в отделении электронно-микроскопии ИХБФМ СО РАН и в Государственным Научным центре Вирусологии и Биотехнологий (Вектор), анализ полученных данных проводился совместно с В.В. Морозовой (к.б.н.) и Н.В. Тикуновой (д.б.н.).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Текст изложен на 174 страницах, содержит 41 рисунка и 8 таблиц, список литературы содержит 365 библиографических источника.

Благодарности. Автор выражает признательность сотрудникам Лаборатории молекулярной микробиологии (ЛММБ) Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН за их неизменное терпение на протяжении всего проекта, неоценимую помощь, обучение и поддержку на каждом этапе работы, а также за их постоянное стремление к научному диалогу и конструктивные рекомендации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Бактериофаги: геномика и образ жизни

Бактериофаги (фаги) – это вирусы, поражающие бактерии и археи. Они несут всю генетическую информацию, необходимую для их размножения в соответствующем хозяине [8], однако у них нет механизмов для выработки энергии и рибосом для синтеза белков, и поэтому они являются облигатными паразитами. Как и все вирусы, фаги представляют собой инфекционные частицы, состоящие как минимум из двух компонентов: (а) нуклеиновых кислот, составляющих геном фага, и (б) белковых субъединиц, образующих защитный капсид [9]. Фаги являются одними из наиболее распространенных объектов на Земле; по оценкам, на планете насчитывается до 10^{31} фаговых частиц [10].

Геномы бактериофагов могут быть различных типов, включая одноцепочечную ДНК (оцДНК), двухцепочечную ДНК (дсДНК), одноцепочечную РНК или двухцепочечную РНК [11]. Геномы фагов различаются по размеру: от чрезвычайно маленьких геномов РНК-фагов семейства *Leviviridae*, длина которых может составлять всего около 3,3 т.п.н. [12], до фага с геномом 735 т.п.н. [13], который является крупнейшим секвенированным фагом (база данных NCBI GenBank, май 2023 г.).

Большинство фагов с dsДНК-геномом обладают структурой, называемой “хвостом”, и принадлежат отряду *Caudoviricetes*. Их можно разделить на три морфологические группы: миофаги (myophages) с длинным сокращающимся хвостом, сифофаги (siphophages) с длинным несокращающимся хвостом и подофаги (podophages) с коротким хвостом (рис. 1) [14].

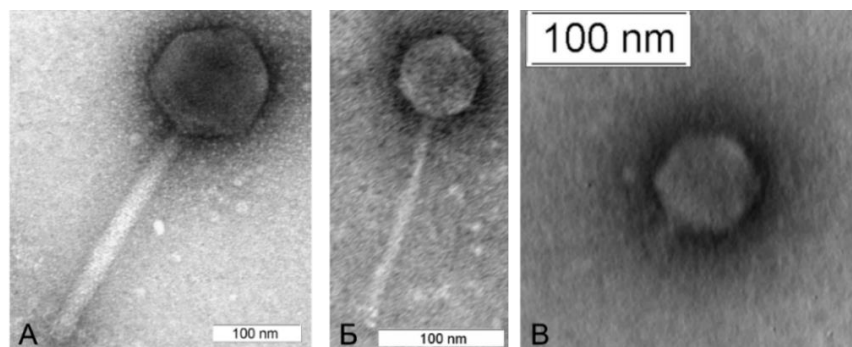


Рисунок 1. Примеры трёх морфологических групп хвостатых фагов: А – фаг AesS_266 (миофаг) [15]; Б – фаг AP45 (сифофаг) [16] и В – фаг StenM174 (подофаг) [17].

Геномы различных хвостатых фагов упакованы в капсиды с одинаковой плотностью, и размер капсида варьируется в зависимости от размера генома. На инфекционность и стабильность фага влияет количество ДНК, упакованной в капсиде. Таким образом, поддержание стабильного размера генома фага в ходе его эволюции важно для стабильности вириона. Слишком большая потеря или добавление генетического материала в ходе эволюции фага может привести к потере стабильности вириона, и, следовательно, существует эволюционное давление для обеспечения упаковки и стабильности вириона. Консервативность размера генома играет важную роль в эволюции бактериофагов, обеспечивая механизм приобретения и потери ДНК, который не зависит от функции приобретенных генов. Таким образом, вновь приобретенная ДНК обеспечивает резервуар генетической информации для потенциального использования в будущем, а не отбирается для немедленного использования [18].

Сравнение нуклеотидных последовательностей геномов бактериофагов показывает, что они чрезвычайно разнообразны [19], при этом специфичность фагов по отношению к своим хозяевам может быть существенным препятствием для генетического обмена между ними. Кроме того, фаги, заражающие общего хозяина, могут проявлять значительное разнообразие, что свидетельствует о наличии дополнительных барьеров для генетического обмена [20–22].

С геномной точки зрения бактериофаги состоят из набора взаимозаменяемых «модулей», состоящих из одного или нескольких генов, и считаются «мозаичными» по своей природе; геном каждого фага состоит из комбинации этих модулей. Мозаичная природа фагов, как это изложено в модульной теории Ботштейна (1980), диктует, что фаги развиваются латерально посредством горизонтального переноса генов, а не от какого-либо общего предка, как это наблюдается у бактерий, и предполагает, что фаги не эволюционируют в целом масштабе генома, но в большей степени на уровне их модулей. Хотя все бактериофаги в некоторой степени мозаичны, не все модули или гены в пределах данного генома будут участвовать в мозаицизме в одинаковой степени [18,23]. Определенные группы генов (включая структурные гены, гены лизиса и репликации ДНК), которые необходимы для полноценного функционирования вируса, называются «кóровыми генами», учитывая их высокую степень

консервативности, а также их присутствие в больших наборах фаговых геномах. По сравнению с другими, более изменчивыми областями генома, эти ко́ровые гены проявляют минимальную степень мозаицизма в ходе эволюции бактериофага. «Неосновные гены», с другой стороны, это те гены, которые не распространены среди родственных групп фагов и часто встречаются в так называемых гиперпластических областях многих фаговых геномов [24,25].

Мозаицизм фаговых геномов может возникать в результате одного из двух типов рекомбинации: гомологичной или негомологичной. Гомологичная рекомбинация, заключается в переносе генов или дивергентных последовательностей между фагами посредством распознавания фланкирующих гомологичных последовательностей [26]. Негомологичная рекомбинация – это генетический обмен между фагами, который, по-видимому, происходит случайным образом, что приводит к очень низкой относительной частоте жизнеспособного фагового потомства. Несмотря на это, селективно выгодные продукты негомологичной рекомбинации представляют собой чрезвычайно важный процесс, в котором генерируются новые комбинации генов и участков генов [19,24].

Учитывая, что у фагов, как правило, отсутствует консервативная последовательность, достаточно длинная, чтобы ее можно было распознать механизмом рекомбинации, полагали, что негомологичная рекомбинация является основной движущей силой мозаицизма бактериофагов [27]. Рекомбиназы, такие как Rad52-подобные рекомбиназы, также могут играть определенную роль в эволюции фагов. Действительно, тип рекомбинации, которая способствует разнообразию фагов, по-видимому, сильно зависит от различного селективного давления, оказываемого на фаги [28]. Хотя считается, что это происходит по всему геному, негомологичная рекомбинация одного или нескольких основных генов может нарушить функционирование фага и почти всегда приведет к образованию нежизнеспособного рекомбинантного фага. Таким образом, низкий уровень мозаичности, наблюдаемый в основных генах, вероятно, обусловлен элиминацией большинства рекомбинантов с селективными недостатками [24,29].

В ходе инфицирования частица бактериофага (вирион) встречается с потенциальной бактериальной клеткой-хозяином, и, если рецептор-связывающие поверхностные белки (обычно экспонированы на кончике хвоста) соответствуют специфическим рецепторам на внешней поверхности клетки-хозяина, то запускается каскад событий, приводящих к проникновению генома фага (а иногда и вспомогательных молекул) в цитоплазму клетки-хозяина, где инициируется жизненный цикл бактериофага [24].

Жизненный цикл бактериофагов различается и может быть разделен на следующие типы:

А) Литический цикл вирусной инфекции: вирулентные бактериофаги немедленно размножаются и вызывают лизис хозяйской клетки, обеспечивая высвобождение потомства [11]. Среди вирулентных фагов хвостатые фаги класса *Caudoviricetes* лучше подходят для терапевтического применения [30]. Эти вирулентные хвостатые фаги следуют литическому циклу, который начинается со специфического прикрепления фаговых рецептор-связывающих белков к молекулам рецепторов на поверхности клетки-хозяина. Это взаимодействие часто включает два этапа: начальную обратимую фазу, а затем необратимую фазу. После необратимого связывания, в ряде случаев ферменты фага разрушают клеточную стенку, и генетический материал вводится в клетку. После синтеза ранних белков фага метаболизм клетки-хозяина, включая репликацию ДНК и биосинтез белка, перенаправляется на воспроизводство фаговой нуклеиновой кислоты и белков. Во время этого процесса геном хозяина обычно разрушается. Как только будут собраны полные дочерние вирусные частицы, начинается лизис клеток для высвобождения фаговых частиц. Бактериальный лизис запускается на поздних стадиях специальными фаговыми белками, включая холины (для обеспечения проницаемости внутренней клеточной мембраны) и эндолизины (для разрушения пептидогликана), с потерей целостности клеточной стенки, что приводит к лизису из-за разницы осмотического давления [31,32].

Б) Умеренный цикл вирусной инфекции: Некоторые бактериофаги могут инициировать лизогенную инфекцию, при которой вирусный геном поддерживается внутри клетки-хозяина в ожидании некоего пускового события. Бактериофаги, которые могут вступать в лизогенные циклы, называются

умеренными, а бактерии в ассоциации с этими фагами, называются лизогенами. Лизогения - это длительное партнерство между бактериальной клеткой и заражающим фагом, и бактерия обычно толерантна и даже может извлечь выгоду из присутствия фага [24,33]. Умеренные фаги либо встраивают свой генетический материал в геном хозяина, либо их геном находится в форме кольцевой плазмиды в цитоплазме, где они размножаются вместе с хозяином до тех пор, пока не включают литический путь, как это наблюдается для вирулентных фагов [11]. Хвостатые умеренные фаги вступают в литический инфекционный цикл, спонтанно или в ответ на специфический стимул.

Лизогенные циклы также начинаются с адсорбции вириона умеренного фага на восприимчивую бактериальную клетку. Процесс интеграции генома умеренного фага в хромосому обычно осуществляется узкоспециализированными интегразами и приводит к появлению профагов, которые представляют собой фаговые геномы, интегрированные в бактериальные геномы. Этот процесс может быть случайным и может осуществляться транспозазами, как в случае с фагом *Mu* [33]. Многие умеренные фаги иногда встраиваются в бактериальные хромосомы в нескольких местах. Некоторые из них у мультихромосомных видов бактерий могут встроиться в несколько хромосом одновременно [34].

После заражения клетки-хозяина, профагам необходимо выключить подавляющее большинство своих генов, отчасти из-за того, что большинство из них не нужны в состоянии профага (например, гены кодирующие белки капсида), но также и потому, что некоторые из них могут кодировать токсичные для хозяина продукты (например, ген *kill* фага λ). Запрет на транскрипцию этих генов поддерживается белками-репрессорами фагов, которые способны подавлять активность промоторов, необходимых для выхода фагов из состояния лизогении. Очень часто репрессоры представляют собой сложные молекулярные сенсоры, способные распознавать молекулярные сигналы и побуждать профаги вступать в литическую стадию в ответ на такие сигналы. Для многих профагов, представленных преимущественно большими группами лямбдоидных фагов, таким сигналом является запуск регулонов SOS-ответа, вызывающих самоуничтожение репрессоров в процессе аутопротеолиза [35]. Для других профагов, таких как фаг *Mu* или P2-подобные профаги, даже несмотря на то, что

сигнал, индуцирующий профаг, неизвестен и не синхронизирован, также наблюдается массивная индукция профагов [33]. При этом инактивация репрессоров профага приводит к активации промоторов, связанных с продуктивным циклом, и, таким образом, к развитию цикла производства вирионов потомства и разрушения клетки-хозяина [24].

Некоторые умеренные бактериофаги могут вызвать хронический, не убивающий хозяйскую клетку, но тем не менее высокопродуктивный тип инфекции. Обычно это нитчатые бактериофаги семейства *Inoviridae*. Они широко используются в молекулярной биологии и химии белков, но редко рассматриваются для терапевтического использования [24].

Изучение бактериофага, предназначенного для терапии, обычно включает определение круга его хозяев, образа жизни, литической активности и геномных особенностей. Изучение этих аспектов фага проводится с использованием широкого спектра инструментов классической микробиологии в дополнение к растущему числу молекулярных методов, включающих инструменты биоинформатики, а в последнее время даже и методы машинного обучения для геномного анализа.

Биологические особенности бактериофага включают:

1. Диапазон хозяев: спектр штаммов бактерий, которые способен инфицировать фаг в дополнение к своему первоначальному хозяину, который был использован для его выделения; у фага может быть широкий спектр хозяев, что означает, что он способен инфицировать множество штаммов бактерий одного и того же вида или даже разных видов, или у него может быть узкий круг хозяев, означающий, что он заражает 1-2 штамма бактерий.
2. Время адсорбции: время, необходимое фагу для адсорбции на поверхности бактериального хозяина.
3. Латентный период: время, необходимое фагу для производства нового потомства после заражения целевого бактериального штамма. Обычно чем короче латентный период, тем эффективнее фаг в фаготерапии.
4. Размер выхода потомства: количество фагового потомства, которое производит один фаг, заражающий одну бактерию; обычно чем выше это число, тем лучше для терапии.

5. Литическая активность: способность фага уменьшать количество бактериальных клеток после заражения. Уменьшение на несколько порядков обеспечивается фагом, обладающим высокой литической активностью; уменьшение на один-два порядка свидетельствует о низкой литической активности фага.

6. Морфология бляшек: бляшки, образованные фагом в двухслойном агаре, могут указывать на ферментативные свойства и эффективность фага при инфицировании. Прозрачные бляшки могут указывать на то, что фаг строго литичен, тогда как мутные бляшки могут указывать на то, что фаг может быть умеренным, полупрозрачные ореолы вокруг бляшек могут указывать на наличие ферментативной активности белков фаговой частицы.

7. Подавление бактерий: время, необходимое инфицированным бактериям для развития устойчивости к бактериофагу; чем дольше фаг может подавлять бактерии, тем лучше для терапии.

8. Стабильность фага: например, при разном pH, разных температурах, при длительном воздействии ультрафиолетовом (УФ) излучении [36].

Таксономические исследования фагов включают их классификацию для определения их положения на эволюционных путях и взаимосвязей с другими фагами. Это делается путем анализа геномных и протеомных характеристик изучаемого фага и сравнения его с другими известными фагами. Одним из способов анализа является определение нуклеотидной идентичности геномов с использованием таких показателей, как средняя нуклеотидная идентичность (ANI) по всей геномной последовательности, которая дает представление о таксономических рангах. Международный комитет по таксономии вирусов в основном использует значения ANI для классификации фагов по родам и видам, устанавливая пороговые значения $>95\%$ для видов и $>70\%$ для родов [37]. Такой вариант анализа может быть использован в случае, если в базах данных фаговых геномов уже существуют близкие к изучаемому геному последовательности. Но зачастую нуклеотидные последовательности вновь открытых фагов сильно отличаются от уже известных фаговых последовательностей (например, ANI $<25\%$ или вообще отсутствует значимое сходство с известными фаговыми геномами), поэтому для уточнения классификации фагов используются

дополнительные инструменты. Помимо попарного сравнения геномов, филогенетические деревья могут быть построены с использованием отдельных консервативных фаговых генов, таких как гены, кодирующие капсидный белок или большую субъединицу терминазы. Такой подход используется, чтобы проследить эволюционную историю, предполагая иерархическую модель происхождения. Однако этот подход ограничен, когда фаг имеет богатую историю мозаицизма, и каждый из ключевых генов может указывать на дивергентный эволюционный путь.

Инструменты кластеризации протеома решают эту проблему, используя различные стратегии: например, онлайн-ресурс ViPTree на основе геномной последовательности фага генерирует протеомное филогенетическое дерево. Для этого программное обеспечение использует алгоритм tBLASTx, то есть выполняет попарные сравнения аминокислотных последовательностей, транслированных с изучаемого фагового генома с базой данных, содержащей тысячи фагов. Это позволяет визуализировать эволюционные связи даже между отдаленно родственными фагами с низким нуклеотидным сходством [38]. Существует другой метод кластеризации, vConTACT2, который выполняет кластеризацию на основе сети, а не иерархических деревьев. Эта сеть генерируется путем вычисления показателей межгеномного сходства на основе общих белковых профилей и содержания генов, а затем применения алгоритмов, таких как алгоритм кластеризации Маркова и ClusterONE, для определения таксономических групп [39]. Точность методов кластеризации критически зависит от качества эталонных баз данных, и в целом, фундаментальным ограничением для классификации фагов является отсутствие универсального маркерного гена (в отличие от гена 16S рРНК у прокариот), а также высокое генетическое разнообразие, быстрые темпы эволюции и обширный мозаицизм, что в большинстве случаев обуславливает необходимость использования несколько методов для обоснования классификации нового фага.

1.2. Рост устойчивости к антибиотикам и перспективы фаготерапии

Одним из возможных применений бактериофагов является их терапевтическое использование в клинических условиях, особенно с учетом

активности литических бактериофагов против лекарственно-устойчивых бактерий. Особую важность представляет их потенциальное использование в борьбе с 12 приоритетными патогенами, выделенными Всемирной Организацией Здравоохранения [2,3].

Истоки и применение этого метода, называемого «фаговой терапией», восходят как минимум к работам Феликса д'Эрелля и других [40]. Хотя препараты фагов не получили широкого распространения за пределами бывшего Советского Союза, они производились Институтом Пастера во Франции до 1974 года и в США до 1990-х годов [41]. Фаговые терапевтические продукты постоянно использовались в странах Восточной Европы, особенно в Российской Федерации и Республике Грузия, но устойчивый интерес к ним за пределами бывшего Советского Союза замедлился с открытием антибиотиков [40]. С уменьшением количества открытий антибиотиков и ростом числа бактерий с множественной лекарственной устойчивостью фаги стали рассматривать в качестве альтернативного метода лечения определенных типов бактериальных патогенов. Фагам уделяется особое внимание в качестве заменителей антибиотиков в сфере безопасности пищевых продуктов и в сельском хозяйстве для ограничения распространения устойчивых к антибиотикам супербактерий [42]. Птица, молочные продукты и обработанные пищевые продукты являются примерами современного успешного применения бактериофагов [1]. Например, в США, FDA одобрило коммерческие препараты фагов против распространенных бактериальных патогенов, таких как *Listeria monocytogenes* и *Salmonella spp.*, для обработки готовых к употреблению пищевых продуктов [43–45].

Известно, что в ходе большинства бактериальных инфекций образуются биопленки. Биопленки — это сообщества микроорганизмов, прикрепленных к поверхностям и окруженных экзополимерным матриксом собственного производства, и концентрацию антибиотика, необходимую для уничтожения биопленок, обычно трудно достичь *in vivo*. Вот почему антибиотикотерапия, направленная на подавление бактерий, не эффективна против биопленок [46] и необходимо использовать другие антимикробные агенты, в том числе бактериофаги, способные разрушать матрикс биопленок за счет ферментативной активности структурных белков фаговой частицы.

Ведущими факторами, объясняющими ограниченное использование фагов, являются зачастую изменчивые и плохо изученные результаты их эффективности, а также высокая специфичность к патогенным бактериям по сравнению с антибиотиками общего спектра [40,47]. Фаготерапия требует точной идентификации бактериального возбудителя и исследования *in vitro* его чувствительности к доступным фагам [41,47]. Однако, возможно самым важным препятствием является отсутствие конкретной нормативной базы, которая учитывает персонализированные методы лечения, или неопределенность для фармацевтической промышленности, связанная с трудностями регистрации интеллектуальных патентов на препараты фагов [47,48].

Более того, хотя в некоторых ситуациях фаги могут заменить антибиотики, контролируемых крупномасштабных клинических исследований их безопасности и эффективности проведено недостаточно. Необходимы дополнительные исследования, чтобы определить, могут ли фаги стать реальной альтернативой антибиотикам. Компания Biocontrol Ltd. сообщила о первом клиническом исследовании эффективности фаготерапии для лечения хронического отита, вызванного устойчивой к антибиотикам *Pseudomonas aeruginosa*, в 2009 году в Великобритании, показав значительное улучшение состояния пациентов [49]. Последующие клинические исследования, такие как Phagoburn, Европейская инициатива по оценке лечения устойчивых к лекарствам инфекций ожоговых ран, или исследования Фонда Гейтса, подчеркивают, что фаговая терапия является главной целью будущих клинических исследований [43,50].

Логика совместного применения фагов и антибиотиков проистекает из понимания того, что два достаточно разных селективных давления, вероятно, будут более эффективными, чем любое из них по отдельности [43]. Взаимодействия между факторами стресса являются синергическими, аддитивными или антагонистическими. В первом случае совокупный эффект представляет собой сумму большую, чем сумма отдельных эффектов, действующих в одном направлении [51]. Хотя успех лечения более вероятен при синергическом эффекте, успех в лечении можно также достичь с помощью простых аддитивных эффектов, особенно *in vivo*, когда иммунная система хозяина работает в качестве третьего фактора элиминации инфекции [52]. Описаны

примеры положительного взаимодействия между антибиотиками и литическими фагами при контроле бактериальных патогенов как *in vitro*, так и *in vivo*. Фаги в сочетании с антибиотиками уничтожали штаммы *Klebsiella pneumoniae*, образующие биопленку, и предотвращали появление устойчивых вариантов *in vitro* [1]. Комбинированное применение фагов и антибиотиков также останавливало инфекцию задних конечностей, вызванную метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus*, у мышей с диабетом [53], и полностью защищало цыплят от инфекций *Escherichia coli* [54]. В этих и других случаях комбинированное лечение литическим фагом с антибиотиком приводило не только к лучшему контролю или уничтожению бактерий, но и к полному предотвращению появления резистентных вариантов по сравнению с лечением одним противомикробным препаратом [43].

Потенциальным нежелательным последствием совместной терапии фагами и антибиотиками является обострение инфекции из-за появления более вирулентных мутантных штаммов бактерий, которые могут ухудшить исход заболевания, если они связаны с резистентностью. Хотя эта потенциальная проблема при комбинированном применении в настоящее время не изучена, доказательства ее существования при использовании противомикробных препаратов противоречивы. Например, кворум сенсинг может координировать выработку бактериями определенных факторов вирулентности [55], а воздействие фагов или антибиотиков по отдельности, как было показано, может привести к отбору вариантов с повышенной вирулентностью [56,57]. Этот эффект появляется при использовании фагов, нацеленных на бактериальные рецепторы, чувствительные к сигнальным молекулам кворума. Таким образом, некоторые фаги могут являться триггерами повышения вирулентности патогенной бактерии [58].

Устойчивость к антибиотикам часто ассоциируется с вирулентностью. Так, например, в недавнем исследовании было показано, что устойчивость *P. aeruginosa* к антибиотикам была связана с такими вирулентными свойствами, как преимущество в приспособленности *in vitro* и *in vivo* по сравнению с родительскими штаммами, чувствительными к антибиотикам [59]. Однако, наблюдалась и обратная взаимосвязь, как в случае потери поринов у *Acinetobacter*

baumannii, что привело как к более высокой устойчивости к антибиотикам, так и к пониженной вирулентности [60]. Кроме того, ряд исследований показал, что бактерии, устойчивые к литическим фагам, ослабляют вирулентность в отношении бактериальных хозяев, ассоциированных с разными макроорганизмами - от рыб и растений до человека [61–63]. Возможное объяснение состоит в том, что устойчивость к фагам влияет на экспрессию факторов патогенности или снижает способность бактерий к росту, что приводит к появлению менее вирулентных бактериальных вариантов [61–63].

При комбинированном лечении, антибиотики и фаги могут совместно нацеливаться на конкретный бактериальный фактор вирулентности, такой как компоненты клеточной стенки (например, сочетание бета-лактамовых антибиотиков и фагов, которые прикрепляются к липополисахариду, ЛПС), сокращая спектр как устойчивых, так и вирулентных бактериальных вариантов. Совместное использование антибиотиков и фагов также может снизить дозы обоих противомикробных препаратов, значительно уменьшив тяжесть побочных эффектов или осложнение, например, за счет замедления высвобождения бактериальных токсинов после лизиса и подавления развития септического шока. Необходимо экспериментальное исследование, чтобы определить, как резистентность к комбинированной антибиотико-фаговой терапии приводит к изменениям вирулентности бактерий. На эту взаимосвязь, вероятно, влияет ряд факторов, специфичных для бактериальных и фаговых штаммов, включая молекулярные механизмы вирулентности и резистентности, а также факторы, зависящие от окружающей среды, изменения уровней или путей инфекции и резистентности [43,64].

Ряд исследований показал, что фаговая инфекция приводит к эволюционному компромиссу, в результате которого эволюция устойчивости бактерий к фагам изменяет механизм эффлюксной помпы, вызывая повышенную чувствительность к препаратам нескольких классов антибиотиков. Этот подход, использующий фаги в качестве целевого антибактериального средства, может продлить клиническую эффективность существующих антибиотиков и потенциально снизить частоту инфекций, устойчивых к антибиотикам [65].

Пример такого исследования – это изучение штамма *P. aeruginosa* PAO1, который приобрел устойчивость к фагам vB_Pae_QDWS и vB_Pae_W3. Устойчивые варианты демонстрировали повышенную чувствительность к гентамицину и полимиксину В. Анализ полных геномов этих фагоустойчивых мутантов выявил 64 гена с несинонимичными однонуклеотидными полиморфизмами и 31 ген с инсерционно-делеционными мутациями. Кроме того, было зафиксировано значительное снижение скорости адсорбции фагов на клетках фагоустойчивых вариантов, что делает нарушение адсорбции фагов основной причиной развития устойчивости [66]. Другой эксперимент с тем же бактериальным штаммом *P. aeruginosa* PAO1, который приобрел устойчивость к фагу OMKO1, выявил повышенную чувствительность штамма к эритромицину [67]. Третий эксперимент, проведенный на том же бактериальном штамме, показало повышение чувствительности к тетрациклину, цефтазидиму, эритромицину и ципрофлоксацину после фаговой инфекции [65]. Четвертое исследование, проведенное на клинических штаммах *P. aeruginosa*, продемонстрировало мутации или делеции рецепторов MexXY-OprM, что привело к развитию устойчивости к фагам PIAS и PAPSZ1, а также к повышенной чувствительности к тетрациклину, фосфомицину, цефтазидиму и гентамицину [68].

Однако исследования показали, что отбор по устойчивости к фагам также может привести к повышению устойчивости к антибиотикам. Так, были рассмотрены четыре бактериофага семейства *Microviridae* (ID8, NC28, WA11 и WA13), инфицирующие *E. coli*. Устойчивые к фагам мутанты *E. coli*, которые приобрели устойчивость к одному штамму фага, сохраняли устойчивость к другим фагам благодаря перекрывающимся механизмам адсорбции. Мутации, лежащие в основе фагорезистентного фенотипа, оказывали влияние на структуру и/или синтез ЛПС. Поскольку ЛПС участвуют как в фаговой инфекции, так и в резистентности к некоторым антибиотикам, исследователи затем определили, существуют ли компромиссы, связанные с устойчивостью к фагам, при воздействии различных классов антибиотиков. Они обнаружили, что только один из четырех мутантов *E. coli*, устойчивых к фагам, демонстрирует компромиссный результат. Это подчеркивает различия между устойчивостью к фагам и

антибиотикам. Удивительно, но при обработке новобиоцином были обнаружены доказательства синергической плейотропии для некоторых мутантов, что привело к повышению их устойчивости к антибиотикам, хотя бактерии ранее не подвергались воздействию новобиоцина, чтобы развить устойчивость к нему [69]. В другом исследовании, посвященном бактериофагам *E. coli*, было показано, что резистентная к фагу U136B *E. coli* увеличила свою устойчивость к некоторым антибиотикам из-за мутаций в генах *tolC* и *lps*, которые отвечают за устойчивость к антибиотикам и служат рецепторами для изучаемого фага [70]. Все эти данные свидетельствуют о неоднозначном влиянии конкретного фага на антибиотикорезистентность той или иной бактерии.

1.3. Факторы, влияющие на коэволюцию фагов и бактерий

1.3.1. Скорость накопления мутаций в фаговых геномах и мутационная нагрузка

При описании изменений, происходящих в коэволюционирующих фагах и бактериях, две концепции имеют решающее значение для понимания ограничений и масштабов их адаптации: частота мутаций и мутационная нагрузка. Частота мутаций отражает количество мутаций, возникающих в популяции в определённое время. Обычно её оценивают путем анализа числа замен в образцах, полученных на различных стадиях существования популяции, которая эволюционирует с течением времени. [71]. У различных микроорганизмов этот показатель существенно варьируется. В он оценивается примерно в 10^{-10} мутаций на нуклеотид за репликацию для бактерий и от 10^{-7} до 8×10^{-7} мутаций на нуклеотид за репликацию для некоторых фагов с дсДНК [72] и от 5×10^{-3} мутаций на геном за репликацию для фага M13 [73]. По другим оценкам, это составляет от 2×10^{-4} до $4,7 \times 10^{-3}$ замен нуклеотидов на сайт в год для вирулентных фагов [74,75] и от $1,2 \times 10^{-4}$ замен на сайт в год для умеренных фагов [76]. Хотя считается, что высокая частота мутаций способствует быстрой адаптации вирусов, полезные мутации, как правило, встречаются довольно редко, поскольку большинство мутаций обычно являются нейтральными или вредными [77,78].

Термин “мутационная нагрузка” относится к общей генетической нагрузке в популяции, возникающей в результате накопления вредных мутаций. В ходе эволюции в популяциях могут возникать различные вредные мутации, которые потенциально снижают среднюю приспособленность их представителей и могут приводить к элиминации некоторых из них. Этот процесс приводит к тому, что естественный отбор действует против этих вредных мутаций, устанавливая баланс между избирательным давлением на них и их продолжающимся возникновением в результате мутагенеза. В равновесном состоянии частота доминантной вредной мутации представляется отношением m/s , где m - частота мутаций, а s - селективный недостаток мутации. В этом равновесном состоянии мутационная нагрузка может быть рассчитана как эквивалент скорости мутаций, что означает, что по мере возникновения мутаций они вносят свой вклад в общий уровень приспособленности бактериальной популяции, тем самым влияя на её способность выживать при атаках фагов [79].

1.3.2. Механизмы коэволюции фагов и бактерий

Эволюция геномов как фагов, так и бактерий включает накопление мутаций и приобретение генетического материала посредством генетической рекомбинации. Генетическая рекомбинация происходит на двух различных уровнях. На микроуровне рекомбинация может изменять несколько нуклеотидов одновременно. На макроуровне она может приводить к приобретению или удалению целых генов или их фрагментов, что со временем изменяет генетическое содержание организма.

Фаги могут кодировать различные белки, способствующие рекомбинации, включая белки системы рекомбинации Red [80], рекомбиназы и транспозазы [81]. Рекомбинация между фагами в основном происходит при коинфекции, это явление, которое, как показали исследования, широко распространено в популяциях бактерий [82–84]. Таким образом, умеренные фаги могут получать ДНК из дефектных профагов в геноме хозяина посредством неточной гомологичной рекомбинации [28], в то время как литические фаги могут рекомбинировать как с другими литическими фагами, так и с профагами или остатками профагов, присутствующими в геноме хозяина [85]. В геномах фагов

были обнаружены признаки генетической рекомбинации [86,87], а высокая вариабельность содержания генов, наблюдаемая в природных популяциях фагов, свидетельствует о том, что приобретение и потеря генов происходят довольно часто [88]. Однако скорость этих процессов в эволюции геномов фагов до сих пор остается неизвестной [74].

Взаимодействуя с фагами, бактерии выработали широкий спектр механизмов противофаговой защиты [89]. Эти механизмы включают системы рестрикции-модификации (RM), системы предотвращения инфицирования, системы распознавания белков, системы токсин-антитоксин (ТА), аргонавты, CRISPR-Cas-системы, системы модификации поверхности и другие [90,91]. Некоторые из этих защитных стратегий предотвращают заражение бактерий фагами, сохраняя бактериальные клетки. Например, система RosmerTA кодирует токсин, который вызывает деполяризацию бактериальной мембраны, что препятствует способности фага адсорбироваться и внедрять свой геном. Кроме того, она вырабатывает антитоксин, который нейтрализует действие токсина, тем самым сохраняя жизнеспособность бактерий [92]. Другая система, известная как система Nachiman, производит два белка: один из них контролирует целостность бактериального генома, одновременно инактивируя второй белок. Когда бактериальный геном повреждается во время фаговой инфекции, активируется второй белок, обладающий нуклеазной активностью, что приводит к разрушению генетического материала внутри бактериальной клетки. Следовательно, хотя сама бактерия может быть повреждена, этот механизм служит для защиты соседних бактериальных клеток.

Одной из наиболее распространенных стратегий, используемых бактериями для противодействия фаговым инфекциям, является модификация рецепторов внешней мембраны, используемых фагами для адсорбции. Например, известно что кишечная палочка развивает резистентность к фагу λ из-за мутаций в регуляторном гене *malT*, который подавляет экспрессию рецептора хозяина — белка внешней мембраны LamB [93–95].

Некоторые из этих антифаговых систем демонстрируют высокую степень консервативности среди различных штаммов и видов бактерий, тогда как другие подвергаются фаг-зависимой структурной или функциональной модификации

[96]. Примерами известных систем защиты бактерий от бактериофагов являются CRISPR-Cas, (RM)-системы, подобные RM (RM-like) системы, а также механизмы, основанные на распознавании фаговых белков и независимые от обнаружения чужеродных нуклеиновых кислот. Кроме того, к ним относятся системы abortивной инфекции и системы TA. Эти системы демонстрируют разнообразие стратегий, которые бактерии развили для защиты от фагов [97].

Было замечено, что системы защиты от фагов часто демонстрируют тенденцию к кластеризации в схожих геномных регионах, обозначаемых как «островок защиты», в различных штаммах одного и того же вида бактерий [98–100]. Это позволило выявить другие системы защиты в аналогичных регионах геномов других бактерий [101]. Пангеномный анализ выявил системы защиты от фагов и их локализацию в геномах для *E. coli* [101] и *P. aeruginosa* [102]. Параметры, установленные для определения того, что составляет островок защиты (defense islands), в этих исследованиях схожи. В исследовании систем защиты от фагов, обнаруженных в *E. coli*, было дано определение «островка защиты», который определялся как геномный регион, в котором система защиты от фагов была выявлена хотя бы у двух штаммов. Кроме того, островок должен содержать более десяти генов, включая систему защиты от фагов; он должен быть окружен пятью координатами (core) генами (общими для более чем 80% штаммов *E. coli*) [97]. Также островок защиты может быть пустым по крайней мере в одном штамме [101]. Согласно другому исследованию антифаговых систем в *P. aeruginosa*, островок защиты должен быть окружен специфическими маркерными генами, без необходимости наличия случаев пустого островка в некоторых штаммах или включения элементов, которые позволили бы островкам защиты передаваться между штаммами *P. aeruginosa* [102].

Большинство бактериофагов демонстрируют строгую видовую или штаммовую специфичность в отношении своих хозяев. В отличие от антибиотиков, фаги способны эволюционировать и адаптироваться к изменениям в бактериальных системах защиты в процессе коэволюционного взаимодействия [103]. Фаги разработали специальные механизмы преодоления бактериальной защиты. Например, при снижении экспрессии в *E. coli* белка LamB, появляются варианты фага λ , несущие мутации в рецептор-связывающем домене фагового

белка J, что позволяет фагу использовать новый бактериальный рецептор OmpF. В ответ *E. coli* накапливает дополнительные мутации в OmpF или белковом комплексе внутренней мембраны ManXYZ, который транспортирует ДНК фага λ в цитоплазму для противодействия фаговой инфекции [93–95].

Например, фаги разработали защитные механизмы против некоторых бактериальных систем ТА. Некоторые T4-подобные фаги синтезируют белок TifA, который прямо взаимодействует как с эндорибонуклеазой ToxN (токсином системы ТА типа III), так и с бактериальной РНК. Это взаимодействие приводит к формированию высокомолекулярного рибонуклеопротеинового комплекса, подавляющего активность ToxN [104]. Таким образом, эволюция антифаговых систем у бактерий и соответствующих контрмеханизмов у фагов представляет собой динамичное взаимодействие, позволяющее обеим системам адаптироваться с течением времени в результате их длительного взаимодействия.

1.3.3. Возникновение фагорезистентности после инфекции бактериофагами

Бактерии могут развивать устойчивость к фаготерапии благодаря спонтанным мутациям, приобретению систем RM, адаптивному иммунитету с использованием кластерной системы, связанной с короткими палиндромными повторами с регулярными промежутками (CRISPR-Cas), а также благодаря плазмидам и мобильным генетическим островкам, которые могут нести гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Эти механизмы могут использоваться бактериями для воздействия на различные этапы жизненного цикла фага, включая прикрепление, проникновение, репликацию и лизис клетки-хозяина. Наблюдаются различные фенотипы устойчивости, возникающие в результате различных механизмов. Эти фенотипы могут варьироваться в зависимости от того, является ли устойчивость частичной или полной, от того, что подразумевается под адаптацией, связанной с устойчивостью, и от возможности противодействия мутациям в заражающем фаге [4].

Спонтанные бактериальные мутации приводят к возникновению устойчивости к фагам и коэволюции фагов и бактерий, что может привести к фаговой устойчивости за счет модификации фаг-ассоциированных рецепторов на

поверхности бактерий. Важно отметить, что такие изменения могут быть связаны со снижением приспособленности по сравнению с чувствительными к фагам штаммами. Когда мутация происходит в бактериальных липополисахаридах или когда бактерия испытывает нарушения роста в результате мутаций в генах, участвующих в основных функциях клеток, устойчивые к фагам бактерии могут стать менее вирулентными.

Бактериальные системы RM, часто называемые примитивными иммунными системами бактерий, распространены повсеместно. Они представляют собой важные защитные механизмы против вторжения фаговых геномов. Эти системы состоят из двух противоположных ферментативных активностей: эндонуклеазы рестрикции и метилтрансферазы. Механизм защиты бактериальных систем RM основан на распознавании статуса метилирования геномов вторгающихся фагов. Метилированные последовательности распознаются как собственные, в то время как неметилированные последовательности генома вторгшегося фага воспринимаются как чуждые и расщепляются рестриктазами. Роль рестриктаз заключается в распознавании и расщеплении чужеродных последовательностей нуклеиновых кислот в определенных участках, тогда как функция метилтрансфераз состоит в обеспечении идентификации собственных и чуждых нуклеиновых кислот путем переноса метильных групп на одну и ту же специфическую последовательность нуклеиновой кислоты внутри бактериального генома.

Система CRISPR-Cas регулирует адаптивный иммунитет бактерий. Бактерии могут развивать адаптивный иммунитет против фагов, приобретая уникальную часть механизма CRISPR-Cas, называемую спейсерами, в результате предыдущей инфекции. Бактериальный адаптивный иммунитет против фагов отличается от других защитных механизмов тем, что бактерии способны распознавать предшествующие инфекции, сохраняя фрагменты фаговой ДНК (спейсеры) в своей собственной ДНК для нейтрализации будущих инфекций. Удивительно, но бактерии могут не только распознавать перенесенные инфекции с помощью системы CRISPR-Cas, но и передавать этот опыт будущим поколениям.

Бактериальные мобильные генетические элементы (МГЭ) могут способствовать устойчивости бактерий к фаготерапии. Они отвечают за горизонтальный перенос генов, отвечающих за устойчивость к фагам, между бактериями. Например, конъюгативные плазмиды, обеспечивающие устойчивость к фагам, могут быстро распространяться как внутри одного бактериального вида, так и между различными видами. Независимо от выбора антибиотиков, плазмиды, отвечающие за устойчивость к антибиотикам, в изобилии встречаются в бактериальных популяциях, поскольку они влияют на приспособленность бактерий [101].

1.3.4. Козволюционная динамика

Козволюция бактерий и фагов представляет собой классический пример взаимной адаптации между хозяевами и паразитами. Эта адаптация следует определенной динамике, которую можно разделить на две основные категории: динамику гонки вооружений (arms race dynamics) и флуктуирующую динамику отбора (fluctuating selection dynamics), также известную как динамика Красной королевы (Red Queen dynamics). Помимо этих основных категорий, описаны и другие динамические процессы, такие как скачкообразная динамика, динамика "убей победителя" (kill the winner dynamics), динамика "верни победителя" (piggy-back the winner) и динамика "перетасовки сообщества" (community shuffling dynamics), хотя они изучены менее подробно.

Динамика гонки вооружений

Динамика гонки вооружений определяется направленным отбором в пользу все более резистентных хозяев и все более вирулентных паразитов, что приводит к появлению и накоплению новых механизмов фаговой инфекционности и/или резистентности хозяина [102,103]. Направленный отбор в динамике гонки вооружений означает, что каждая новая мутация, повышающая инфекционность фагов или устойчивость бактерий к ним, основывается на существующем статусе. По мере продолжения сосуществования расширяются диапазоны устойчивости или инфекционности. В этом случае внутри популяции формируется иерархическая структура, в которой каждый генотип представляет собой подмножество более общего генотипа, который находится на одну ступень

ниже по коэволюционной лестнице [104]. Как правило, получающаяся в результате адаптации популяция хозяев демонстрирует меньшее генетическое разнообразие и более низкие уровни генетической изменчивости [105].

Чаще всего, динамика гонки вооружений представляет собой краткосрочную коэволюционную модель, которая со временем ослабевает. Основной причиной такого замедления является растущая цена приспособленности фагов и бактерий по мере повышения инфекционности и резистентности [110]. Эта цена также сдерживается потреблением ресурсов и ограниченным числом потенциальных мутаций. После нескольких поколений совместной эволюции новые мутантные варианты бактерий и фагов могут закрепиться в популяции. Впоследствии может возникнуть флуктуирующая динамика отбора, позволяющая поддерживать генетическое разнообразие, поскольку различное селективное давление позволяет множеству аллелей сосуществовать в разных пропорциях, а не оставаться фиксированными [106,107]. В то время как флуктуирующая динамика отбора может привести к формированию субпопуляций, в которых фаги и бактерии взаимодействуют независимо от других модулей, эволюционная траектория может вернуться к динамике гонки вооружений внутри каждой отдельной субпопуляции. Эта реверсия создает локализованные паттерны коэволюционной адаптации [111].

Флуктуирующая динамика отбора

Когда мутации устойчивости больше не приносят пользы бактериям, это может привести к долгосрочному их сосуществованию с бактериофагами за счет изменения динамики отбора в процессе коэволюции [106]. Флуктуирующая динамика отбора представляет собой долгосрочные коэволюционные процессы, которые часто связаны с изменениями в распространенности генотипов, обусловленными колеблющимся отбором в системах хозяин-паразит [108]. На эту динамику влияет отрицательный частотно-зависимый отбор, который отдает предпочтение хозяевам, сопротивляющимся наиболее часто встречающимся генотипам фагов, и фагам, заражающим наиболее распространенные генотипы хозяев. Поскольку преобладающие генотипы хозяев становятся мишенями для фаговых инфекций, последующий отбор против них приводит к увеличению

частоты встречаемости более редких генотипов хозяев. В конце концов, эти более редкие генотипы становятся наиболее распространенными, и цикл повторяется [102,106].

Долгосрочная флуктуирующая динамика отбора способствует разнообразию популяций. Поскольку мишенью являются только наиболее распространенные бактерии, могут сосуществовать несколько геновариантов. Если каждый бактериальный клон независимо эволюционирует против специализированных фагов, то каждое взаимодействие будет иметь свою собственную эволюционную траекторию, потенциально формируя четкую иерархию геновариантов по мере их диверсификации [104]. Увеличенное разнообразие хозяев поддерживает более широкий генетический полиморфизм фенотипов резистентности, что, в свою очередь, может повысить устойчивость популяции при столкновении с новыми генотипами фагов [104].

Предполагается, что если фаги адаптируются быстрее, чем их хозяева, то колебания флуктуирующей динамики, вероятно, приведут к появлению фагов, которые лучше адаптируются к своим нынешним хозяевам по сравнению с прошлыми и будущими хозяевами. И наоборот, если хозяева адаптируются быстрее, чем фаги, наблюдается противоположный эффект [109].

Скачкообразная динамика

Скачкообразная динамика является гибридной динамикой, которая была предложена после того, как в экспериментах по совместной инкубации было обнаружено противоречие между генотипическими и фенотипическими характеристиками бактерий и фагов [95]. Эта динамика характеризуется тем, что отбираются отдельные генотипы со все более широким спектром хозяев, в то время как предпочтение отдается хозяевам, проявляющим повышенную резистентность, как в динамике гонки вооружений. Однако разнообразие хозяев и паразитов, возникающее на ранней стадии процесса коэволюции, сохраняется, способствуя появлению редких особей с выгодными фенотипами из этого пула для замены доминирующих штаммов. Следовательно, в то время как генотипические паттерны указывают на изменчивую динамику отбора, отбор на

фенотипическом уровне работает аналогично модели динамики гонки вооружений [95].

Динамика "Убей победителя"

Эта динамика позволяет предположить, что фаги и бактерии могут сосуществовать и поддерживать экосистемы, характеризующиеся большим разнообразием штаммов, несмотря на ограниченные ресурсы и распространенность инфекций. Вирулентные фаги в основном размножаются в быстрорастущих бактериях, тем самым препятствуя конкурентному вытеснению медленно растущих бактерий. Фаги, способные инфицировать множество хозяев, имеют решающее значение как для эволюции экосистемы путем уничтожения доминирующих штаммов бактерий, так и для поддержания разнообразия, позволяя медленно растущим бактериям сосуществовать со своими быстрорастущими собратьями. В этом сценарии распространенность вирусов определяется различиями в сродстве к субстрату среди сосуществующих видов бактерий [114,115].

Динамика "Кто победит".

Согласно этой динамике, фаги могут переходить от литического образа жизни к лизогенному в условиях, характеризующихся высоким микробным изобилием и скоростью роста, чтобы воспользоваться успехом своих хозяев. Переход к умеренному жизненному циклу снижает уровень контроля фагов за численностью бактерий и способствует исключению суперинфекции, тем самым предотвращая инфицирование одних и тех же бактериальных клеток близкородственными фагами. Следовательно, микробное разнообразие снижается [112]. Однако важно отметить, что это наблюдение в значительной степени основано на данных о морской и пресноводной среде и не обязательно может распространяться на другие сообщества, например, на кишечник человека [113].

Динамика изменения сообществ

Профаги могут быть вредны для своих бактериальных хозяев, поскольку их индукция приводит к лизису хозяина [118]. Индукция фагов, вероятно, чувствительна к стрессу, и хотя спонтанная индукция является редким событием

с минимальными негативными последствиями для популяции бактерий-хозяев, различные факторы окружающей среды могут превратить индукцию из редкого и случайного явления в детерминированный процесс [119]. Например, у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника процесс воспаления, вероятно, усиливает индукцию профагов, способствуя дисбактериозу кишечника за счет изменения соотношения симбионтов и патобионтов-паразитов, что способствует повторному занятию ниши патобионтами [118]. В океанах профаги были уподоблены молекулярным бомбам замедленного действия, которые могут быть активированы изменением солености или воздействием различных загрязняющих веществ [119].

1.3.5. Факторы, влияющие на результаты экспериментов по коэволюции

Анализ исследований, включенных в этот обзор, выявил три основные группы факторов, которые могут влиять на результаты коэволюции: факторы, связанные с наличием специфических фагов и бактерий; факторы, касающиеся условий, при которых происходит коэволюция; геномные факторы, включая мутационную нагрузку (рис. 2).

Продолжительность наблюдений

Короткие эксперименты по совместной эволюции бактерий и фагов часто приводят к динамике гонки вооружений, что приводит к отбору универсальных фагов и бактерий, которые обычно слабее своих предковых штаммов. Совместно эволюционирующие бактерии и фаги способствуют появлению универсальных бактерий, которые проявляют более широкую устойчивость к инфекционным фагам, а также универсальных фагов с более широкими диапазонами специфичности. Однако, цена устойчивости увеличивается на протяжении всего процесса совместной эволюции. Эта закономерность наблюдалась в экспериментах, включающих совместную эволюцию *Pseudomonas fluorescens* SBW25 и фага SBW25F2 [120].

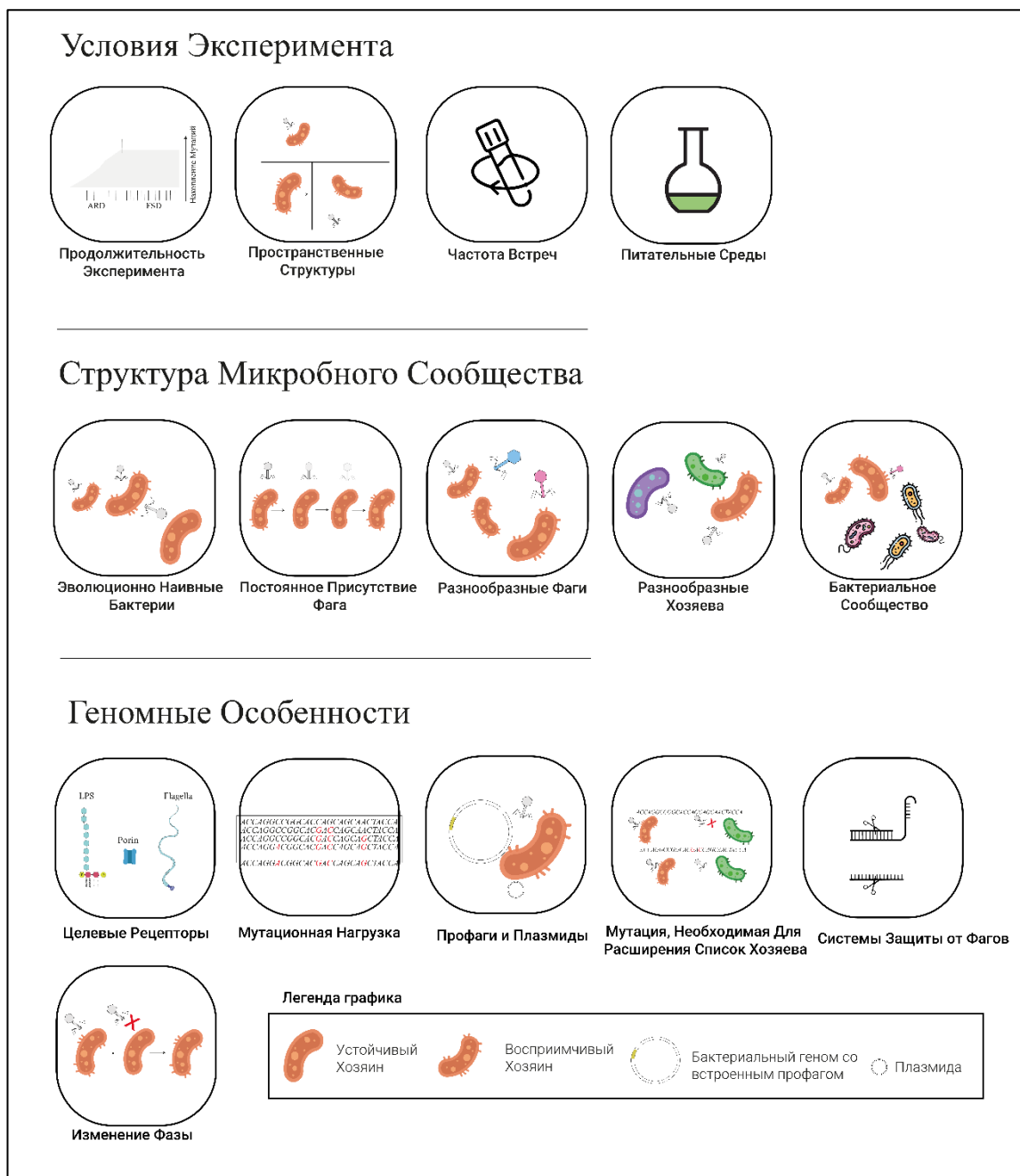


Рисунок 2. Факторы, влияющие на коэволюцию фагов и бактерий. ARD: Динамика гонки вооружений, FSD: флуктуирующая динамика отбора, LPS: липополисахарид. *Ideed et al. 2025*

В течение более длительных периодов времени цена устойчивости увеличивается и сдвигает динамику отбора от динамики гонки вооружений к флуктуирующей динамике отбора, как можно видеть из исследования, проведенного в течение шестидесяти раундов в той же системе *P. fluorescens* SBW25 - фаг SBW25F2 [121]. В ещё одном исследовании сообществ бактерий и фагов на листьях деревьев конского каштана фаги собирались ежемесячно с восьми деревьев в течение шести месяцев. Результаты показали, что фаги были

более вирулентными для современных бактериальных хозяев или тех, что были в недавнем прошлом, по сравнению с бактериями из отдалённого прошлого. Примечательно, что фаги, собранные в конце сезона, были несколько менее заразными для бактериальных хозяев, чем намного раньше в этом сезоне. Эта закономерность предполагает флуктуирующую динамику отбора, а не динамику гонки вооружений [122].

Взаимодействия между лизогенами и штаммами, чувствительными к фагам, формируются антагонистической коэволюцией фагов и бактерий. Эти процессы могут включать ключевые физиологические черты, такие как капсула, и зависеть от временных рамок эволюционного процесса. В коротких временных рамках простые и дорогостоящие инактивирующие мутации являются адаптивными, однако в долгосрочной перспективе изменения, влекущие за собой более выгодные компромиссы между устойчивостью к фагам и приспособленностью клеток, становятся преобладающими [123].

Предсуществующая способность фагов адаптироваться к новым хозяевам и мутационной нагрузке бактерий

Способность фагов адаптироваться к нецелевым штаммам бактерий связана с количеством точечных мутаций, необходимых для заражения новых хозяев [120,124]. Расширение диапазона хозяев фага может потребовать предрасположенности к адаптации к имеющимся штаммам бактерий, например, приобретение единственной точечной мутации. Например, инкубация фага *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* F6 с тремя непермиссивными штаммами *Pseudomonas* вместе с его штаммом-хозяином привела к появлению новых универсальных фагов после 20 пассажей, которые были способны заражать ранее непермиссивные штаммы [125].

Способность бактерий адаптироваться к фагам зависит от их мутационной нагрузки и приспособленности. Бактерии с высокой мутационной нагрузкой и сниженной приспособленностью, как правило, менее способны развивать устойчивость к фагам, поскольку они сталкиваются с большими издержками в эволюционном процессе. Например, в популяции *P. fluorescens* SBW25, бактерии с более высокой мутационной нагрузкой испытывали более быстрое снижение

приспособленности в ходе совместной эволюции, и их средняя устойчивость к современным фагам была ниже по сравнению с популяциями с более низкой мутационной нагрузкой. Кроме того, скорость направленной совместной эволюции была ниже, если фаги коэволюционировали с мутировавшими бактериальными популяциями [126]. Влияние мутационной нагрузки на бактерии было также продемонстрировано в другом исследовании той же системы фаг-бактерия. Это исследование показало, что бактерии, которые накопили мутации, вызванные УФ-излучением, были менее приспособлены к фагам [127].

Дополнительным фактором в совместной эволюции фагов и бактерий является относительный эволюционный потенциал каждого партнера. Бактерии, как правило, имеют больший эволюционный потенциал, чем фаги, из-за их более протяженных геномов, которые предлагают более широкие возможности мутаций. Коэволюционная система обычно управляется эволюцией бактериальной фагорезистентности. Бактерии развивают резистентность к фагам посредством мутаций, которые изменяют или устраняют фаговые рецепторы, процесс, который может происходить чаще, чем способность фага адаптироваться путем изменения его рецептор-связывающих белков. Это несоответствие эволюционного потенциала часто приводит к тому, что эволюция бактериальной фагорезистентности доминирует над коэволюционной динамикой [128].

Бактериальные рецепторы, на которые воздействует фаг

При изучении совместной эволюции шести различных фагов и их хозяина, *P. aeruginosa* PAO1, динамика варьировалась в зависимости от конкретных вовлеченных фагов, некоторые стали более вирулентными, в то время как другие стали менее вирулентными [120,124]. Коэволюционная динамика была связана с типом рецептора, используемого фагами для заражения. В эксперименте некоторые фаги использовали в качестве рецепторов бактериальные пили, тогда как другие были нацелены на ЛПС. Чтобы развить устойчивость к фагам, бактерии, которые использовали пили, могли уменьшить количество пилей на своей поверхности. Это уменьшение плотности пилей уменьшило адсорбцию фагов, зависящих от пилей. Однако потеря пилей налагала на бактерии издержки в приспособленности, поскольку это ухудшало их способность перемещаться,

делая эту адаптацию нежелательной. В ходе эволюции этот компромисс можно предотвратить, способствуя флуктуирующей динамике отбора. Следовательно, фаги, нацеленные на пили, индуцировали эту колеблющуюся динамику отбора, в то время как те, которые связывались с ЛПС, способствовали динамике гонки вооружений [124].

Другое исследование того же бактериального штамма с использованием различных фагов показало схожие результаты [129]. Совместная эволюция штамма *P. aeruginosa* PAO1 с двумя специфическими фагами, фагом 14-1, который нацелен на рецепторы ЛПС, и фагом LUZ19, который связывается с пилями, привела к рецептор-зависимым результатам. Коэволюционная система *P. aeruginosa* PAO1-фаг 14-1 продемонстрировала характеристики динамики гонки вооружений и показала локальную адаптацию с появлением нескольких мутаций в гене *wzu*, связанном с рецептором ЛПС. В свою очередь, система *P. aeruginosa* PAO1-фаг LUZ19 продемонстрировала флуктуирующую динамику отбора, характеризующуюся наличием частичных делеций в гене *pilF*, который связан с пилями типа IV [129].

Наличие дополнительных фагов, специфичных для одного и того же бактериального хозяина

Присутствие нескольких фагов в эксперименте может иметь двойное воздействие на коэволюцию фагов и бактерий. С одной стороны, это может действовать как фактор эволюционного стресса для фагов, потенциально препятствуя их способности адаптироваться к своим хозяевам. С другой стороны, это может также способствовать генетическому обмену посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, тем самым повышая устойчивость фагов, позволяя им обходить механизмы иммунитета хозяина, такие как системы CRISPR-Cas.

Использование нескольких фагов, нацеленных на один штамм бактерий, может ускорить возникновение бактериальной резистентности, если объединенные литические эффекты различных фагов являются синергическими [130]. Например, заражение *P. aeruginosa* пятью фагами одновременно (PEV2, LUZ19, LUZ7, 14-1 и LMA2), которые нацелены на различные рецепторы

клеточной поверхности (ЛПС, рецепторы, зависимые от Top-V, или пили типа IV), сместило динамику от флуктуирующего отбора к динамике гонки вооружений. Этот сдвиг произошел, потому что разнообразие фагов ускорило эволюцию хозяина, усилив отбор резистентных хозяев [130]. Аналогичным образом, сравнение комбинаций от двух до пяти фагов против *P. syringae* показало, что большее количество разнообразных фагов приводило к более быстрому возникновению бактериальной резистентности. Интересно, что использование смеси из двух фагов сопровождалось бактериальной резистентностью и контррезистентностью со стороны фага. Напротив, смесь из пяти фагов потенциально функционировала без динамики гонки вооружений и колебаний резистентности. Добавление большего количества фагов в смесь приводило к более быстрому возникновению резистентности к фагам, что позволяет предположить, что фаги могут конкурировать друг с другом за места прикрепления на поверхности бактериальной клетки, тем самым снижая их общую эффективность [131].

Наличие нескольких фагов, нацеленных на одного и того же хозяина, может помочь им обойти иммунитет CRISPR-Cas, способствуя образованию химерных фагов посредством рекомбинации. Это наблюдалось в экспериментах, где использование нескольких фагов, которые коэволюционировали с *Streptococcus thermophilus*, увеличивало устойчивость фагов к системе CRISPR-Cas путем замены последовательностей, являющихся целью для CRISPR. Кроме того, использование нескольких фагов может продлить продолжительность коэволюции фага-хозяина, ослабляя способность хозяина вырабатывать достаточный иммунитет против любой отдельной популяции фагов [132].

Различные фаги могут индуцировать уникальные мутации в своем хозяине. Например, использование двух генетически различных фагов против *Enterococcus faecalis* VPE25 и phi47 привело к индукции различных мутаций в генах, кодирующих макромолекулы клеточной стенки, необходимые для фаговой инфекции, в частности *PIPEF* и *Epa*, которые требуются для успешного заражения фагами VPE25 и phi47, соответственно [133]. Аналогичным образом, использование генетически-разнообразных фагов, нацеленных на разные участки на поверхности бактерий *P. fluorescens*, привело к быстрой начальной

резистентности к фагам; однако со временем наблюдалось снижение резистентности, что контрастирует с динамикой гонки вооружений, наблюдаемой при использовании одного фага. Это может быть связано с генетическими ограничениями или затратами, связанными с выработкой резистентности к нескольким фагам [134].

В некоторых случаях использование отдельных фагов приводило к появлению бактериальной резистентности без какой-либо контрадаптации со стороны фагов или антагонистической коэволюции. Однако введение дополнительных фагов запускало эволюционную динамику и способствовало адаптации фагов. Это наблюдалось в экспериментах с фагами к *Salmonella sp.* [135] и *Vibrio harveyi* [13], где только применение фаговых коктейлей привело к адаптации как фагов, так и бактерий.

Увеличение разнообразия хозяев

Хотя иногда возможно расширить круг хозяев фага, включив новые непермиссивные бактериальные штаммы в коэволюционную систему фаг-бактерия, этот подход может привести к издержкам, связанным со скоростью адаптации к этим новым хозяевам. В экспериментах по адаптации фага *E. coli* øJB01 для заражения нескольких непермиссивных штаммов, увеличение количества и разнообразия штаммов привело к замедлению этого процесса адаптации [136]. При сравнении коэволюции фага øJB01 для заражения двух ранее непермиссивных штаммов по сравнению с тремя непермиссивными штаммами, фаг, адаптированный к системе с двумя хозяевами, продемонстрировал лучшую приспособленность. Напротив, фаг, адаптированный в системе с тремя хозяевами, столкнулся с большим селективным давлением, чтобы сохранить свою способность заражать всех трех хозяев. Дополнительные эксперименты по расширению круга хозяев с использованием экспериментальной системы с двумя хозяевами показали, что на эволюцию универсальных или специализированных фагов влияют соотношения двух хозяев и сила компромиссов в приспособленности, связанных с каждым хозяином [136].

Наличие бактериального сообщества

Присутствие других видов бактерий может существенно влиять как на плотность конкретной популяции бактерий, так и на популяцию специфичных фагов, а также на их взаимодействия [137], как наблюдалось в системах с участием *P. fluorescens* SBW25 F2 [113] и *P. aeruginosa* с ее фагом РТ7 [138]. Более того, присутствие как разных видов бактерий, так и фага может иметь синергетический эффект. Например, было замечено, что в системах сточных вод, в то время как присутствие как сообщества, так и фага по отдельности снижало концентрацию *Klebsiella sp*, совместный эффект фага и сообщества привел к вымиранию этой популяции [139]. Напротив, в некоторых случаях присутствие дополнительных видов бактерий может смягчить воздействие фагов. Так было выявлено, что фаги подавляют рост штамма *P. fluorescens* в присутствии почвенных бактерий, при этом фаги фактически увеличивали концентрацию этого штамма в отсутствие других бактерий [113].

Кроме того, исследования показали, как контекст сообщества влиял на эволюционные компромиссы, с которыми сталкивались изучаемые бактерии. Исследование *Enterococcus faecium* продемонстрировало, что наличие сообщества разных бактерий позволило бактериям избежать компромисса между устойчивостью к фагам и вирулентностью, способствуя развитию механизмов устойчивости, которые не снижают вирулентность [140].

Постоянное присутствие фагов и/или эволюционно наивного хозяина

Эксперименты по расширению диапазонов хозяев фагов показали, что наличие эволюционно наивных (предковых) хозяев имеет решающее значение для распространения фагов и для изучения влияния различных мутаций на их адаптивность [136]. В исследовании с участием *P. fluorescens* SBW25 и его фага SBW25F2, фаги коэволюционировали со своим бактериальным хозяином в течение 24 дней, адаптируясь быстрее по сравнению с теми, которые эволюционировали с постоянным бактериальным генотипом (например, эволюционно наивный хозяин). Большинство выявленных мутаций были связаны с механизмами инфицирования хозяина [141].

При сравнении различных сценариев в течение 12 дней (коэволюция, эволюция с эволюционно наивными бактериями или чередование этих двух условий) было обнаружено, что фаги в целом увеличили свой диапазон инфекционности за счет уменьшения скорости роста. Однако в опытах с чередованием сценариев появились фаги с более расширенным диапазоном инфекционности без снижения скорости их размножения [142].

Отсутствие фагов, вызывающих бактериальную резистентность, может перенаправить ресурсы бактерий в другие направления, тем самым восстанавливая чувствительность к фагам [108]. Различные клоны *P. syringae pv. tomata* DC3000, которые развили резистентность к пяти фагам *Pseudomonas*, при дальнейшей инкубации в отсутствие этих фагов приобрели различные мутации и восстановили чувствительность к тем же фагам [143]. Аналогичные результаты наблюдались у штаммов *Prochlorococcus*, восстанавливающих чувствительность к пяти T7-подобным фагам [144]. Напротив, исследование устойчивых к T6 *E. coli* не обнаружило восстановления чувствительности к фагам даже после 45,000 поколений [145].

Условия роста

В средах с высоким содержанием ресурсов повышенная доступность питательных веществ смещала эволюционные модели от флуктуирующего отбора к динамике гонки вооружений. Этот сдвиг наблюдался в 12-дневном коэволюционном эксперименте с участием *P. fluorescens* SBW25 и фага SBW25F2 [146]. Эксперимент с *Salmonella enterica* и фагом vB_Sen_STGO-35-1 в богатых средах в течение 21 дня выявил быстрое возникновение бактериальной резистентности в первый день. Однако, субпопуляция чувствительных бактерий, по-видимому, сохранялась, что позволяло фагу оставаться в системе, хотя и с многократно сниженным титром [147]. Подобная динамика была отмечена в богатой питательными веществами системе для *E. coli* с фагом PP01, где и бактерии, и фаги непрерывно развивались во взаимной гонке вооружений [148]. Напротив, 21-дневный эксперимент с *P. fluorescens* SBW25 и фагом SBW25F2 в бедных питательными веществами средах привел к полному исчезновению фага [149].

В богатой питательными веществами среде и при перемешивании скорость коэволюции может возрасти за счет увеличения вероятности контактов между более инфекционными фагами и бактериями. Это взаимодействие приводит к более широкой фагорезистентности среди бактерий и большей инфекционности среди фагов, тем самым способствуя отбору универсальных штаммов [120]. Такой результат согласуется с переходом от флуктуирующего отбора к динамике гонки вооружений [150].

Большинство описанных экспериментов проводились *in vitro*. Однако сравнение фагов *P. aeruginosa* 14–1 и PNM, изолированных после фаготерапии *in vivo*, с соответствующим экспериментом *in vitro* выявило схожую эволюционную динамику. Динамика характеризовалась быстрой эволюцией фагорезистентности у бактерий и ограниченными доказательствами эволюции фагов. Фагорезистентные бактерии из обеих сред демонстрировали пониженную вирулентность; *in vivo* это было связано с более низкими темпами роста, в то время как изоляты *in vitro* демонстрировали повышенное образование биопленки [151].

Кроме того, изменение условий роста путем добавления бактериальных эндоспор позволило бактериальным видам, на которые были нацелены фаги, поддерживать фенотипическое разнообразие, которое в противном случае могло бы быть утрачено в процессе отбора [152]. В экспериментах по коэволюции фагов и бактерий также используют пространственно структурированные плавающие пластины, которые представляют собой полутвердые агаровые смеси (обычно 0,3%-ный агар на питательных средах, таких как LB или триптоновый бульон). Такие элементы обеспечивают пространственную структуру и подвижность бактерий посредством хемотаксиса, и в экспериментах по коэволюции с участием *E. coli* и фага T7 они способствовали как фенотипической, так и генотипической изменчивости и фагов, и бактерий. Этот подход привел к более длинным мутационным путям и выявил мутации, которые редко наблюдаются в средах при хорошем перемешивании [153]. И наоборот, проверка необходимости пространственной изоляции для создания разнообразных вложенных структур путем коэволюции *E. coli* и фага Ф21 в простом адаптивном эксперименте показала, что такие структуры могут быть не нужны [111].

Фазовая вариация у бактерий

Изменение состояния бактерий является важнейшим механизмом, который позволяет им адаптироваться к фаговой инфекции, генерируя фенотипическое разнообразие в пределах своей популяции. Этот процесс включает обратимые изменения в определенных геномных локусах, часто кодирующих поверхностные структуры, например, модификации гликанов, которые могут препятствовать адсорбции фагов [154]. Так, *Campylobacter jejuni* может уклоняться от определенных фагов посредством стохастического, фазово-переменного включения/выключения своих фаговых рецепторов, процесса, опосредованного простыми повторами последовательностей (SSR). Исследования показывают, что фаги влияют на эволюцию SSR-опосредованной фазовой вариации [155].

Результаты показывают, что контр-отбор, снижающий изменчивость локуса фазовой вариации, может стабилизировать поддержание фага. Компенсаторный отбор между различными состояниями бактерий влияет на эволюционную стабильность частоты мутаций, указывая на то, что экстремальные частоты мутаций (очень высокие или очень низкие) являются эволюционно невыгодными. При отсутствии селективного давления скорости эволюции локусов, отвечающих за фазовую вариацию, имеют тенденцию быть ниже базового уровня мутаций [155,156].

Фазовая вариация также играет важную роль в выживании бактерий, изменяя экспрессию поверхностных молекул и тем самым модифицируя взаимодействие с внешними факторами [155]. Например, представители микробиоты человеческого кишечника, *Bacteroidetes*, производят различные фазово-вариабельные капсульные полисахариды (CPS), которые определяют тропизм хозяина для фагов. При литической инфекции фагов выбирается экспрессия непермиссивных вариантов CPS, что повышает выживаемость бактерий. В случаях, когда CPS отсутствует, *Bacteroides thetaiotaomicron* может избегать фаговую инфекцию, изменяя экспрессию восьми фазово-вариабельных ЛПС; конститутивная продукция одного из них придаёт устойчивость к нескольким бактериофагам [157].

Эффекты системы CRISPR-Cas и других антифаговых систем защиты

Хотя система CRISPR-Cas может помочь бактериям противостоять фаговой инфекции, она также может обеспечить преимущества выживания фагам за счет ускорения эволюции фаговых мутантов. Так, было показано, что присутствие системы CRISPR-Cas увеличивает скорость мутаций в фаговых геномах на шесть порядков по сравнению с отсутствием давления CRISPR-Cas [158]. В условиях гонки вооружений фаги будут эволюционировать, чтобы избежать действия CRISPR-Cas, предпочтительно выбирая варианты с полиморфными позициями в областях инициаторной последовательности или смежных мотивов протоспейсера (PAM). Например, направленные изменения в геноме фага наблюдались при длительной совместной инкубации *S. thermophilus* DGCC7710 и фага 2972 [132]. Этот эффект, который также наблюдался и у других фагов, помогает им преодолевать иммунитет CRISPR-Cas, специфичный к определённой последовательности.

Напротив, мутанты фага DC-56, которые появились в ходе коэволюционного эксперимента, не обязательно были связаны со стратегией уклонения от иммунитета CRISPR-Cas. Накопление мутаций в областях генома, соответствующих PAM и протоспейсерам, не было благоприятным из-за неспособности этих мутаций идти в ногу с изменчивостью спейсеров, которые есть у разных бактерий в популяции. В такой ситуации фаги могут использовать рекомбинацию; присутствие нескольких фагов может помочь им уклониться от действия системы CRISPR-Cas, как показано, например, при использовании двух фагов против *S. thermophilus* [132].

Система CRISPR-Cas играет решающую роль в стабилизации сосуществования фагов и бактерий в коэволюционных экспериментах. Долгосрочное сосуществование фагов и хозяев облегчается высоким разнообразием аллелей CRISPR, как это наблюдалось в экспериментах с фагом DC-56 [132]. Это явление согласуется с моделью, которая предполагает, что иммунитет CRISPR-Cas стабилизирует систему фаг-хозяин. Эта стабильность достигается с помощью распределенного по популяции иммунитета, где разнообразный массив локусов CRISPR обеспечивает надежный иммунитет во всей популяции. Пока ни одна бактериальная популяция не будет значительно

превосходить другие, фаги будут продолжать находить восприимчивых хозяев, снижая селективное давление для мутации своих целевых протоспейсеров или областей PAM. Например, в исследовании с участием популяции *Gordonia* и фага DC-56, самая многочисленная популяция имела массив CRISPR только с предковыми спейсерами, ни один из которых не соответствовал геному фага идеально. Следовательно, в долгосрочной перспективе ни хозяин, ни вирус не вымирают, в отличие от лабораторных экспериментов по коэволюции, где устойчивость, опосредованная CRISPR, приводила к быстрой элиминации фагов [159,160].

Помимо CRISPR-Cas, бактерии обладают обширным репертуаром других систем защиты от фагов, включая системы рестрикции-модификации и недавно открытые системы, такие как Thoeris и Gabija. Эти системы оказывают сильное и многоуровневое селективное давление, при котором фаг, преодолевший одну систему, сталкивается с другой и должен к ней адаптироваться. Наличие этих систем влияет на адаптацию фагов, заставляя их эволюционировать путем приобретения специфических мутаций или механизмов противодействия, специфичных для преодоления каждой системы. Системы защиты каждого вида могут быть разнообразными среди штаммов вида, поддерживать определенный уровень бактериальной гетерогенности и снижать шансы фагов на адаптацию к ним, способствуя сосуществованию, а не вымиранию. Наконец, некоторые из этих систем постоянно адаптируются к попыткам фагов адаптироваться к ним [6,7].

Присутствие профага или плазмиды

Умеренные фаги предоставляют своим хозяевам преимущество в приспособленности во время конкуренции. Профаги могут повышать приспособленность хозяев в совместной культуре, ставя в невыгодное положение нелизогены. Однако это конкурентное преимущество, опосредованное профагами, может быть компенсировано эволюцией механизмов резистентности в конкурирующих штаммах [123].

Кроме того, было обнаружено, что носительство плазмид ограничивает коэволюционную динамику между бактериями и фагами. В популяциях *P. fluorescens*, несущих плазмиды, бактерии развили более низкие уровни

устойчивости к фагам, в то время как фаги развили более низкую инфекционность по сравнению с популяциями без плазмид [161]. Присутствие фагов привело к появлению высоких частот мукоидных бактериальных колоний в популяциях, несущих плазмиды. Мукоидность обеспечивает слабую частичную устойчивость к определенным фагам, таким как SBW25F2, что могло снизить селективное давление для более сильных мутаций устойчивости. Наличие плазмид ограничило как эволюцию бактериальной устойчивости, так и инфекционность фагов, при этом бактерии без плазмид развили значительно более высокие показатели устойчивости к фагам по сравнению с бактериями, несущими плазмиды [161].

1.3.6. Ограничения проведённых исследований по коэволюции фагов и бактерий

Текущее представление о динамике флуктуирующего отбора и динамике гонки вооружений в системах фаг-бактерия в значительной степени основано на теоретических моделях, которые предполагают бесконечные размеры популяции и игнорируют воздействие окружающей среды, которое может изменить размеры популяции [112]. Большинство исследований были сосредоточены на системах *P. aeruginosa* или *P. fluorescens* плюс фаг. Некоторые работы были посвящены фагам *E. coli*. Однако фаги, инфицирующие другие бактерии из группы ESKAPE, были слабо изучены в экспериментах по коэволюции.

Продолжительность и результаты таких исследований значительно различаются, большинство из них проводились менее чем 30 дней в лабораторных условиях. Долгосрочные исследования в основном включали экологические или клинические образцы, собранные в течение месяцев или лет [162]. Отсутствие долгосрочных контролируемых лабораторных экспериментов усложняет понимание потенциального появления редкого фенотипа фага или накопления мутаций, к которым бактериальные хозяева не могут адаптироваться. Проведение таких исследований улучшило бы наши прогнозы потенциальных результатов использования фагов в лечении пациентов с хроническими инфекциями.

Тестирование установленной эволюционной динамики выявляет несколько недостатков теоретических моделей. Например, динамика гонки вооружений предполагает, что новые мутации будут иметь синергические и накапливающиеся

эффекты, предсказывая, что фаги с широким диапазоном хозяев будут распространяться быстрее, чем фаги с узким диапазоном [163], и что бактериальные штаммы с самой высокой устойчивостью продолжают развивать устойчивость к фагам лучше или быстрее, чем другие штаммы. Однако экспериментальные данные показывают, что мутации могут быть неаддитивными, позволяя появляться редким фаговым клонам, если новые мутации взаимодействуют синергически с существующими мутациями, таким как мутации белка J фага λ [164–166]. Эта неаддитивность мутаций была также продемонстрирована экспериментально на примере *E. coli* при изучении взаимодействий между двумя мутациями, *malT*⁻ и $\Delta 777$, которые появились во время инкубации с фагом λ [95].

Другим недостатком экспериментов по эволюционной динамике являются предположения о незначительных эффектах, вызванных мутациями. Между тем, мутации с большим эффектом, такие как *malT* в *E. coli*, могут придавать почти полную устойчивость к некоторым λ -фагам, позволяя штаммам, в которых они появляются, доминировать по сравнению с другими, что противоречит предположению о незначительных эффектах мутаций [95].

Ещё одним ограничением является игнорирование рекомбинации, которая может внезапно повысить приспособленность фага и способствовать доминированию редких клонов, а также позволить ему обойти средства бактериальной защиты, такие как CRISPR-Cas [140,158,167].

Проблемы воспроизводимости в экспериментах по коэволюции могут быть вызваны давлением абиотического отбора, хотя некоторые эксперименты показали повторяющуюся эволюцию на уровне генов [128,133,168]. Лабораторные эксперименты часто сталкиваются с трудностями из-за хорошего перемешивания сред, это приводит к быстрой стагнации и к меньшей генетической изменчивости. Устранение этих ограничений имеет решающее значение для прогнозирования результатов взаимодействия фагов и бактерий и повышения применимости этих результатов в фаговой терапии [153].

1.3.7. Роль коэволюции фагов и бактерий для фаготерапии

Общее влияние факторов экспериментов на бактерии и фаги и основная динамика эволюции показаны на рисунке 3.

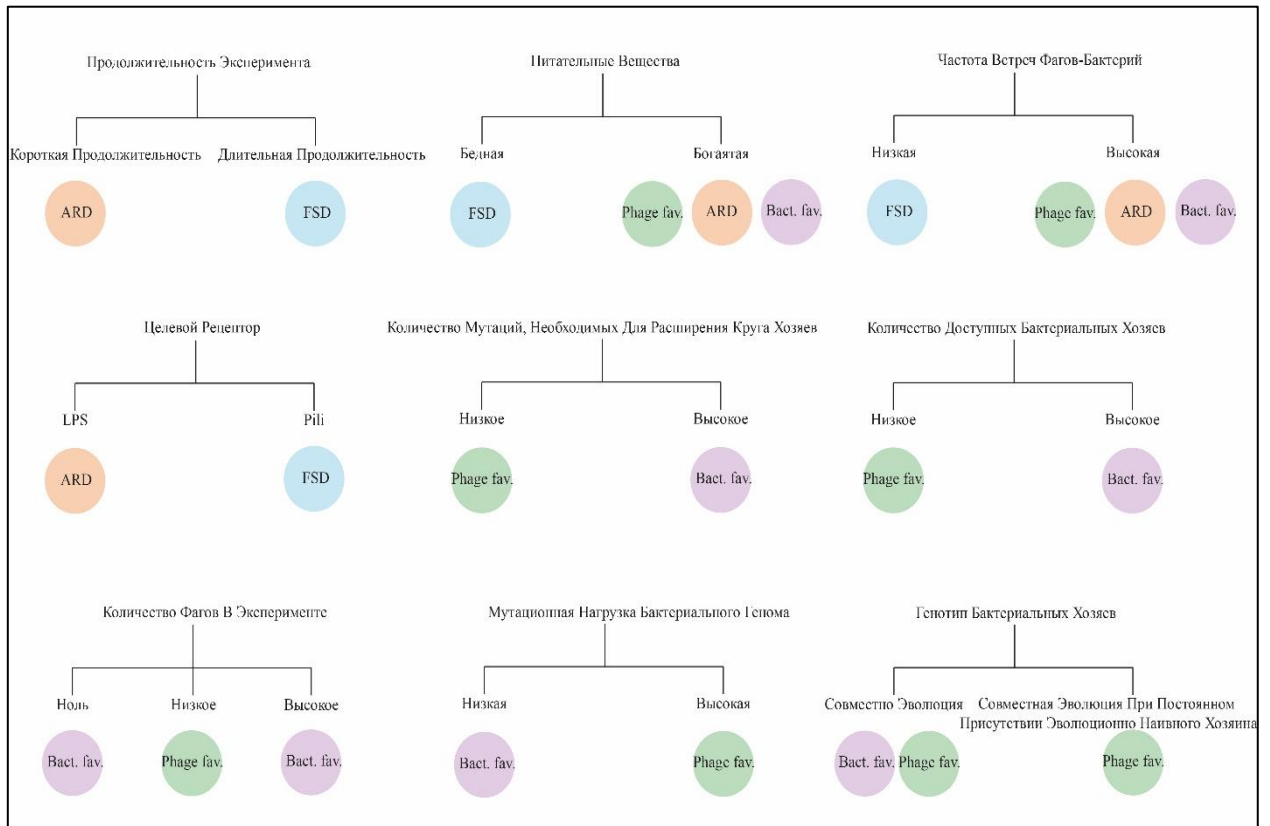


Рисунок 3. Обзор результатов коэволюции фагов и бактерий в различных условиях. ARM - динамика гонки вооружений, FSD - динамика флуктуирующего отбора, Bact. fav. - условия, благоприятствующие адаптации бактерий; Phage fav. - условия, благоприятствующие адаптации фагов. *Jdeed et al. 2025*

Влияние на спектр хозяев фага

Эволюционировавшие фаги могут приобретать расширенный диапазон хозяев для изначально непермиссивных штаммов, используемых в эксперименте, но не для штаммов того же вида бактерий, которые не были частью эксперимента. Так, в эксперименте по коэволюции фага SBW25F2 с его хозяином *P. fluorescens* SBW25 было показано, что, хотя все коэволюционировавшие фаги имели более широкий диапазон хозяев, чем предковый фаг, и могли дифференциально инфицировать коэволюционировавшие варианты *P. fluorescens* SBW25, ни один из них не мог инфицировать ни один из других 150 альтернативных штаммов *P. fluorescens*, к которым фаг SBW25F2 не был адаптирован [169]. Этот результат указал на фундаментальные генетические ограничения адаптации этого фага. В

новых клонах фагов с расширенным диапазоном хозяев были обнаружены мутации в гене хвостовых фибрилл; однако эти мутации были недостаточны для того, чтобы фаги заражали другие штаммы [169]. Важность этого результата заключается в том, что он противоречит предположению о том, что фаги с широким кругом хозяев могут быть генетически предрасположены заражать хозяев, с которыми они никогда не сталкивались [169].

Экспериментальная коэволюция цианобактерий и специфического фага привела к появлению фагов, способных инфицировать изначально устойчивый штамм, который генетически отличался от цианобактерий, с которыми коэволюционировал фаг. Однако этот устойчивый штамм был экспериментально получен из штамма, который изначально был чувствителен к фагу; следовательно, коэволюция фактически не привела к увеличению числа штаммов, которые могли быть инфицированы [170].

Совместно эволюционировавшие фаги не расширили свой круг хозяев и в нескольких других исследованиях [169]. Хотя антагонистическая коэволюция бактерий и фагов распространена в естественных популяциях, она мало влияет на изменение круга хозяев, если только не было изначальной генетической совместимости между хозяином и паразитом и/или отсутствия вторичных защитных механизмов для противодействия репликации фагов внутри хозяина [169]. Кроме того, при отсутствии изначальной совместимости бактерий и фагов спонтанная мутация сама по себе вряд ли приведет к фаговой инфекции, и может потребоваться горизонтальный перенос генов [169]. Это было показано в исследовании, в котором фаг JB01, его штамм-хозяин *E. coli* O127 и три непермиссивных штамма *E. coli* коэволюционировали вместе, и фаг адаптировался к этим ранее непермиссивным хозяевам [136]. Однако эти три штамма *E. coli* не были выбраны случайным образом, они были выбраны на основании данных, указывающих на то, что изучаемому фагу требуется единственная точечная мутация для заражения этих штаммов [136].

Несколько факторов могут объяснить, почему коэволюционировавшие фаги не смогли заразить все новые штаммы бактерий. (1) Отсутствие подходящих фаговых рецепторов на непермиссивных штаммах. (2) В некоторых случаях у устойчивых штаммов отсутствовали механизмы, необходимые для производства

новых вирионов после инъекции геномного материала фага (электропорация не способствовала производству фаговых частиц) [124]. (3) У устойчивых бактерий, вероятно, есть различные защитные механизмы, такие как системы RM, CRISPR-Cas, исключение суперинфекции или другие антифаговые системы [171].

Влияние экспериментов по коэволюции на бактериальное подавление

Коэволюция фагов с бактериями приводит к появлению «обученных» фагов, которые препятствуют возникновению устойчивости к фагам у бактерий. Фаг λ , который коэволюционировал со штаммом *E. coli* B REL606 в течение 30 дней, затем сравнивали с предковым фагом λ . Обученный фаг развил способность связываться с двумя бактериальными рецепторами вместо одного, как у предкового фага [167]. Это значительно задержало появление резистентных бактерий; резистентные бактерии появлялись через 15 или более дней при инкубации с адаптированным фагом вместо 3 дней при инкубации с предковым фагом [167].

Анализ фаговой терапии показал многообещающие результаты при использовании обученных фагов. В модели легочной инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, коктейль фагов продемонстрировал улучшенные клинические результаты и снижение бактериальной нагрузки, при этом совместное применение эволюционировавших и предковых фагов еще больше задержало возникновение резистентности [131,172]. Кроме того, коэволюционное обучение может помочь фагам обойти механизмы бактериальной резистентности. Например, когда у бактерии появились мутации в мембранном транспортере, чтобы противостоять коктейлю фагов, обученный универсальный фаг смог преодолеть эту резистентность благодаря мутациям, накопленным им во время обучения [173].

Однако не все взаимодействия фагов и бактерий приводят к гонке вооружений или значительному подавлению. В некоторых случаях, особенно при использовании культуры одного фага без антибиотиков, бактерии быстро развивают необратимую фагорезистентность без видимой эволюционной борьбы, как это наблюдалось в случае с *Salmonella enteritidis* и фагом ϕ San23, в то время

как добавление антибиотика или использование нескольких фагов увеличивает чувствительность бактерий к фагу [135].

Бактерии не могут развить мутантов, которые полностью устойчивы к фагам из-за ряда ограничений, таких как ограниченные ресурсы и затраты на приспособленность. Кроме того, длительная коэволюция может привести к появлению штамма с высокой устойчивостью к фагам без эволюционных затрат, что отражается на восстановлении конкурентоспособности бактерий на этапе флуктуирующей динамики отбора при эволюции фага ОМКО1 с *P. aeruginosa* [128].

Влияние на восстановление чувствительности к антибиотикам

Было показано, что бактерии могут развить устойчивость к фагам, одновременно восстановив чувствительность к амоксициллину, ампициллину и гентамицину под влиянием давления отбора фагов и конкурентоспособности бактерий. Более того, влияние давления отбора фагов на компромисс между устойчивостью к антибиотикам и фагам было более выражено на стадии динамики гонки вооружений, чем на стадии динамики флуктуирующего отбора [110].

Например, исследования с участием *P. aeruginosa* и фага ОМТО1 продемонстрировали, что динамика гонки вооружений привела к компромиссу между устойчивостью к фагам и антибиотикам, тогда как динамика флуктуирующего отбора не показывает этот компромисс столь же четко. Это говорит о том, что эволюционное давление во время динамики гонки вооружений может заставить бактерии пойти на компромисс в отношении устойчивости к антибиотикам, поскольку бактерии адаптируются к фаговой инфекции [128].

Влияние коэволюции на разнообразие бактерий

Фаги играют жизненно важную роль в контроле популяций бактерий, как путем содействия гетерогенной бактериальной дифференциации, так и путем адаптации к изменениям восприимчивости их хозяев [174]. Однако их влияние на эволюцию бактерий является сложным и противоречивым. С одной стороны, коэволюция с фагами может ускорить удаление вредных мутаций из популяций хозяев. С другой стороны, отбор фагом устойчивых хозяев может привести к

сужению популяции, уменьшая эффективный размер популяции и увеличивая накопление вредных мутаций [126].

Появление резистентности к фагам может привести к расходам на приспособленность для бактериальных хозяев, хотя эти расходы могут варьироваться. Некоторые резистентные к фагам изоляты могут не испытывать значительного снижения патогенности или вирулентности, в то время как другие в результирующей популяции могут быть скомпрометированы. Например, бактерии, обработанные одним или несколькими фагами, могут развить устойчивость без значительного дефицита приспособленности, как это наблюдается у некоторых мутантов [131].

Фаги также управляют адаптивными реакциями у бактерий, такими как эволюция мукоидного фенотипа в популяции *P. fluorescens* SBW25 в процессе коэволюции с литическими фагами. Кроме того, фаги могут выбирать хозяев, которые участвуют в явной конкуренции, влияя на экологическую и эволюционную динамику [175].

1.4. Виды бактерий, включенные в исследование

1.4.1. *Enterobacter cloacae*

Семейство *Enterobacteriaceae* включает подвижные грамотрицательные палочки, относящиеся к порядку *Enterobacterales*, классу *Gamma proteobacteria*. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* являются факультативными анаэробами. В состав семейства *Enterobacteriaceae* входят многие роды, такие как *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* и другие, которые играют важную роль в медицине, сельском хозяйстве и окружающей среде. В настоящее время род *Enterobacter* насчитывает 22 вида [176,177], встречающихся во множестве экологических местообитаний. Эти бактерии обнаруживают в воде, почве, и они могут быть фитопатогенами для различных видов растений [177]. Кроме того, виды *Enterobacter* обнаруживаются в составе нормальной микробиоты кишечника человека и животных. Среди представителей рода *Enterobacter* только определенные виды или подвиды связаны с внутрибольничными инфекциями и вспышками. Наиболее часто выделяемыми видами при клинических инфекциях являются *E. cloacae* и

Enterobacter hormaechei [178]. *E. cloacae* обладает природной устойчивостью к ампициллину, амоксициллину, цефалоспорином первого поколения и цефокситину из-за конститутивной продукции AmpC β-лактамазы. Также он демонстрирует высокую частоту ферментативной устойчивости к цефалоспорином широкого спектра действия [179]. *E. cloacae* может вызывать бактериемию, эндокардит, септический артрит, остеомиелит, инфекции кожи и мягких тканей, а также инфекции нижних дыхательных путей, мочевыводящих путей и внутрибрюшные инфекции [179,180].

1.4.2. *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia — это грамотрицательная палочковидная облигатная аэробная подвижная бактерия с несколькими полярными жгутиками [181]. Род *Stenotrophomonas* относится к семейству *Xanthomonadaceae* (группа *Xanthomonas*), порядку *Xanthomonadales*, классу *Gammaproteobacteria* и типу *Pseudomonadota* [182–184]. Впервые *S. maltophilia* была выделена в 1943 году [185] и представляет собой широко распространённый микроорганизм, обнаруживаемый в различных средах, включая почти все водные и влажные экосистемы [186,187]. Её выделяют из животных, почвы и корней растений [100,188–190]. *S. maltophilia* обнаруживается и в больницах, где была выявлена её способность образовывать биоплёнки на медицинских устройствах и имплантах, используемых для людей [181,191,192]. Исследования показали, что клинические изоляты *S. maltophilia* имеют более высокий уровень мутаций по сравнению с изолятами из окружающей среды, что позволяет предположить, что клинические изоляты адаптируются к местным условиям [100,181].

Представители *S. maltophilia* демонстрируют высокую фенотипическую и генетическую гетерогенность, образуя так называемый комплекс *S. maltophilia* [193]. В дополнение к присущей *S. maltophilia* высокой устойчивости к различным антибиотикам, она может приобретать устойчивость посредством горизонтального переноса генов, ответственных за устойчивость [187,194,195]. Хотя *S. maltophilia* не является высоковирулентным возбудителем, она ассоциируется с различными инфекциями, наиболее часто с респираторными. *S. maltophilia* вызывает значительный уровень смертности среди пациентов с

ослабленным иммунитетом [187], пациентов с муковисцидозом и сопутствующими злокачественными новообразованиями [194]; также было установлено, что *S. maltophilia* выделяется в 9,4% образцов крови, полученных от онкологических пациентов и инфекциями кровотока [196,197]. Уровень смертности пациентов с бактериемией *S. maltophilia* варьируется от 14% до 69% [181,198,199]. Природная устойчивость *S. maltophilia* к различным антибиотикам, а также её способность развивать резистентность к новым антибиотикам и образовывать биоплёнки привели к тому, что Всемирная Организация Здравоохранения включила этот вид в список ведущих устойчивых к лекарствам патогенов в больницах по всему миру [191,200].

1.4.3. *Aeromonas popoffii*

A. popoffii была впервые описана в 1997 году [201]. Эти грамотрицательные палочковидные бактерии обладают способностью к продукции детерминантов вирулентности, включая биологически активные внеклеточные ферменты, токсины и биоплёнки. Они относятся к роду *Aeromonas*, который принадлежит к семейству *Aeromonadaceae*. В настоящее время род *Aeromonas* включает 31 вид [202]. Представители рода *Aeromonas* широко распространены в водных экосистемах, а также могут быть выделены из неводных сред обитания, организмов животных и пищевых продуктов, в особенности из готовых к употреблению блюд, содержащих морепродукты. Установлено, что отдельные виды *Aeromonas* способны к относительно беспрепятственному росту в пищевых продуктах при условиях охлаждения в различных упаковочных средах в широком диапазоне значений pH и концентраций NaCl. Штаммы ряда видов *Aeromonas* демонстрируют способность к продукции метаболитов, ассоциированных с процессами порчи различных видов морепродуктов [203]. Ввиду высокой распространенности в морепродуктах и овощах, бактерии рода *Aeromonas* часто рассматриваются в качестве «новых патогенов пищевого происхождения».

Для *A. popoffii* был установлен ряд потенциальных факторов вирулентности [204], а также получены данные о ассоциации с воспалительными заболеваниями мочевыводящих путей. Терапия инфекций, вызванных данными микроорганизмами, осложняется наличием у видов *Aeromonas* природной

устойчивости к пенициллинам, ряду цефалоспоринов и эритромицину. Ципрофлоксацин, как правило, проявляет активность в отношении штаммов *Aeromonas*, однако описаны отдельные случаи резистентности [205–208].

Раневые инфекции представляют собой второй по распространенности тип инфекций у человека, ассоциированных с *Aeromonas*, возникающих при контакте поврежденных кожных покровов с пресной водой или почвой [209–211]. Кроме того, имеются данные о том, что использование *Hirudo medicinalis* в постоперационном периоде может приводить к инфицированию *Aeromonas veronii*, с потенциальным развитием подкожного абсцесса и сепсиса [212]. Наряду с *A. veronii*, определенные виды *Aeromonas* обладают способностью вызывать широкий спектр заболеваний у человека; при этом большинство штаммов, выделяемых в клинических случаях, представлены *Aeromonas caviae*, *Aeromonas dhakensis* и *Aeromonas hydrophila* [202,211]. Иные виды, обычно ассоциированные с заболеваниями рыб, такие как *Aeromonas salmonicida*, также были зафиксированы в случаях инфицирования человека [213].

Таким образом, высокая исходная устойчивость изучаемых бактерий ко многим антибиотикам, а также их способность к образованию биопленок, существенно осложняют выбор оптимального препарата для лечения инфекций, вызванных этими микроорганизмами. Возникновение устойчивости бактерий к антибиотикам и возможность оптимизации фаговой терапии с помощью эволюционных подходов послужили мотивацией для изучения факторов, определяющих взаимодействие между бактериями и бактериофагами.

В рамках этого исследования был проведен комплексный анализ, который включал изучение биологических свойств фагов, профилей устойчивости бактериальных штаммов к антибиотикам и механизмов защиты от фагов у *S. maltophilia*. Экспериментальные протоколы включали инкубационные тесты для оценки эффективности фагов в различных условиях окружающей среды. Кроме того, была усовершенствована методика qPCR для высокопроизводительной характеристики способности фагов инфицировать различные популяции бактерий.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Реактивы, буферы, среды и наборы

Полиэтиленгликоль (PEG) 6000 (AppliChem, Германия), протеиназа К, РНКаза А и ДНКаза I (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США), додецилсульфат натрия (ДСН) и этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Sigma-Aldrich, США), фенол (Медиген, Россия), хлороформ (Реахим, Россия), кристаллический фиолетовый (Crystal Violet) (Carl Roth, Германия), диски для определения чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом (OXOID, Великобритания), содержавшие: гентамицин (10 мкг), ампициллин (10 мкг), амоксициллин (30 мкг), ампициллин с сульбактамом (20 мкг), цефокситин (30 мкг), цефтазидим (10 мкг), цефепим (30 мкг), хлорамфеникол (30 мкг), левофлоксацин (5 мкг), ципрофлоксацин (5 мкг), клиндамицин (2 мкг), тетрациклин (30 мкг) и триметоприм с сульфаметоксазолом (1.25/23.75 мкг). STM-буфер (10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂); TE-буфер (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM ЭДТА). Среда Мюллера-Хинтона (Oxoid, Великобритания), бульон Лурия-Бертани (LB) (Becton Dickinson and Company, США), Tryptic soy broth (TSB) (Conda Pronadisa, Испания). Набор реагентов для создания ДНК-библиотек Nextera (Illumina, США), набор реагентов MiSeq, версии v.1 (2×150 п.о.) и v.2 (2 × 250 пар оснований) (Illumina, США), набор D-cells для выделения ДНК из клеток животных и бактерий («Биолабмикс», Россия), TruSeq DNA PCR-Free и адаптеры TruSeq Illumina (New England Biolabs, США), набор для секвенирования NovaSeq 6000 S2 (реагенты v1.5, 2 × 150 циклов) (Illumina, США). Таq ДНК-полимераза («Биолабмикс», Россия), и олигонуклеотиды для количественного ПЦР (Биоссет, Россия и ЛСБ ИХБФМ, Россия).

2.2. Оборудование

Бокс биобезопасности БМБ-II-«Ламинар-С» (Lamsystems, Россия), шейкер-инкубатор Ecotron (Infors ht, Швейцария), термостат ТС-1/80 (СКТБ СПУ, Россия), центрифуга 5418R (Eppendorf, Германия), водяные бани Grant (Biosan, Латвия), автоклав ГКа-25 ПЗ (Касимовский приборный завод, Россия), флуориметр Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США), ультразвуковой дезинтегратор Covaris S220 (Covaris, США), спектрофотометр iMark (Bio-Rad,

Япония), ПЦР-амплификатор Bio-Rad CFX 1000 (Bio-Rad, США), ПЦР-амплификатор Gene Explorer (BIOER, Китай).

2.3. Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды, использованные для ПЦР-скрининга фага StM171 и для оценки инфекционной активности бактериофагов с использованием qPCR, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для изучения бактериофагов

Фаг	Идентификатор праймера	Последовательность олигонуклеотида 5'-3'	Целевой ген и номер (CDS)	Размер продукта (п.н.)	Эксперимент
EC151	151_F	aggagcaggtagaaca	Гипотетический белок в кластере генов модификации 7-дезагуанина (QSL98919.1)	82	Количес- твенный ПЦР
	151_R	gtcgtcgattgaaactatcct			
	151_P	[FAM] ctggacagggcgccagcaatggat [BHQ1]			
EC152	152_F	cccagtgatcttatcgcaac	Гипотетический белок (WZX10802.1)	99	
	152_R	atgatgcctatcgaaactggt			
	152_P	[FAM] accactccagtgccagttacaacg [BHQ1]			
StM171	stm_stru_for	gcaggatccagtactacct	Структурный белок (QYW06389.1)	118	
	stm_stru_rev	aatgcaacgtcgatattcgt			
	stm_stru_probe	[FAM] ccgctgtgggtgccttcta [BHQ1]			
	frdcap171	cggccaactacaaccacat	Капсидный белок (QYW06405.1)	508	ПЦР
	revcap171	ttggactggatgacctcgc			
	frdtail171	caactacaaccccgctatc	Хвостовой белок (QYW06360.1)	612	
	revtail171	caggttctccagcacacagt			
StenM174	174_F	tcaggettactctgttca	Белок, содержащий муреин-трансгликозилазу (WPK42350.1)	102	Количес- твенный ПЦР
	174_R	cacttgtcattccacgtcag			
	174_P	[FAM] accgctgcgcagatcaagca [BHQ1]			

2.4. Бактериальные штаммы и бактериофаги

В работе использовали бактериальные штаммы из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур (КЭМТК) ИХБФМ СО

РАН. Спектр литической активности фага EC151 исследовали на восьмидесяти штаммах *E. coli* и *E. cloacae*, фага EC152 - на восьми штаммах *E. cloacae*, фаг AerP_220 - на двадцати семи штаммах *Aeromonas*, а фага StM171 - на десяти штаммах *S. maltophilia* и семидесяти пяти штаммах *P. aeruginosa*. Бактериальные штаммы выращивали на LB, инкубировали при 37°C для всех бактериальных штаммов, за исключением штаммов *Aeromonas*, которые инкубировали при 28°C.

В работе использовали фаги *E. cloacae* EC151 и EC152, фаг *A. popoffii* AerP_220, и фаги *S. maltophilia* StM171 и StenM174. Фаги EC151 и EC152 были выделены из образцов куриного помета и навоза КРС, соответственно, с использованием штамма-хозяина *E. cloacae* КЭМТК 2064. Фаг AerP_220 выделен из реки Иня, Новосибирская область, с использованием штамма-хозяина *A. popoffii* КЭМТК 4062. Фаги StM171 и StenM174 были выделены использованием штамма-хозяина *S. maltophilia* КЭМТК 2355, из сточных вод больницы и из птицефермы, соответственно.

Фаги были изолированы к.б.н. Козловой Ю. Н. и депонированы в КЭМТК ИХБФМ СО РАН. Электронные микрофотографии бактериофагов были получены в Группе микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН.

2.5. Исследование бактерий

2.5.1. Определение чувствительности бактериальных штаммов *S. maltophilia* к антибиотикам, селекция изолятов *S. maltophilia* с устойчивостью к фагу StM171 и повторное тестирование их резистентности к антибиотикам

Для эксперимента были взяты штаммы *S. maltophilia* (КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670), чувствительные к фагу StM171. Чувствительность бактериальных штаммов *S. maltophilia* (КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670) к тринадцати антибиотикам различных классов оценивали методом диско-диффузионного анализа. Диаметр зоны ингибирования роста бактерий меньше или равно 5-6 мм использовали в качестве критерия устойчивости, поскольку рекомендации Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) для *S. maltophilia* отсутствуют для большинства клинически используемых антибиотиков. Минимальную

ингибирующую концентрацию (МИК) некоторых антибиотиков определяли методом последовательного разведения с применением уменьшающихся концентраций антибиотиков к планктонным культурам *S. maltophilia*. Эксперимент проводили с использованием культуральных 96-луночных планшетов, инкубируя культуры с антибиотиком в течение 16 часов при температуре 37°C. По окончании инкубирования считывали оптическую плотность (OD₆₀₀) в лунках планшета. МИК определяли, как предельную концентрацию антибиотика, при которой не происходит увеличения оптической плотности, соответственно, нет роста бактерий.

Отдельные колонии бактериальных штаммов *S. maltophilia*, выросшие внутри зоны конфлюэнтного лизиса бактерий фагом StM171 в верхнем агаре, были отобраны и пассированы трижды на LB-агаре. Далее, полученные клоны BIMs (так называемые бактериофаг-резистентные мутанты или bacteriophage-insensitive mutants) были протестированы после трех пассажей на чувствительность к фагу StM171, чтобы убедиться, что StM171 утратил способность инфицировать их. Для проверки наличия генома StM171 в бактериальных штаммах *S. maltophilia* были разработаны два набора праймеров, нацеленных на гены, кодирующие белок капсида и хвостовой части (Таблица 1). Матрицу для ПЦР готовили следующим образом: бактериальную ДНК из бактериальных колоний, выросших на LB-агаре, выделяли методом бойлинга, т.е. переносили колонию в 50 мкл деионизованной воды, суспендировали на вортексе и далее суспензию нагревали при 95 °С в течение 10 минут. Затем образцы центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 5 минут и супернатант использовали в качестве матрицы для ПЦР, следуя протоколу, приведенному в таблице 2.

Таблица 2. Протокол для ПЦР-скрининга на наличие фаговой ДНК StM171 в клетках

Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
95	180	1
95	20	25
55	20	
72	40	

Для оценки влияния антибиотиков на фагоустойчивые клоны *S. maltophilia* было проведено тестирование 13 антибиотиков методом диско-диффузионного анализа (гентамицин, ампициллин, амоксициллин, ампициллин с сульбактамом, цефокситин, цефтазидим, цефепим, хлорамфеникол, левофлоксацин, ципрофлоксацин, клиндамицин, тетрациклин и триметоприм с сульфаметоксазолом). Для тестирования брали по одному фагоустойчивому клону, выделенному от каждого штамма *S. maltophilia* (КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670), в качестве контроля использовали исходные штаммы. Эксперимент проводили в трёх повторностях, где каждый из антибиотиков был протестирован три раза против ВІМ и исходных штаммов.

2.5.2. Исследование образования и ингибирования биопленки *S. maltophilia*

Способность к образованию биопленок пяти штаммов *S. maltophilia* (КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670), чувствительных к StM171, определяли по ранее описанному протоколу с некоторыми модификациями [214]. Бактериальные штаммы инкубировали на агаре Мюллера-Хинтона (Oxoid, Великобритания) в течение ночи при 37 °С, после чего колонии суспендировали в бульоне LB (Becton Dickinson and Company, США) до оптической плотности $OD_{600} = 0,5$. Затем 20 мкл бактериальной суспензии переносили в 180 мкл жидкой среды TSB, содержащей 1% глюкозу, и инкубировали в 96-луночных планшетах в течение 24 часов при 37 °С. Лунки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), планшет сушили при 60 °С и окрашивали кристаллическим фиолетовым. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра при OD_{600} . Эксперимент выполняли в трех биологических повторах.

Для оценки влияния StM171 на образование биопленок использовали тот же протокол с добавлением StM171 при конечной множественности заражения (Multiplicity of infection, MOI) = 0,1. Эксперимент выполняли в трех биологических повторах.

Эксперименты по сочетанному использованию различных антибиотиков и фага StM171 выполняли по аналогичному протоколу с добавлением следующих антибиотиков: ампициллина, левомицетина, левофлоксацина, тетрациклина и гентамицина в конечной концентрации 40% от МИК для соответствующих

планктонных культур *S. maltophilia*. Эксперимент выполняли в трех биологических повторах.

2.5.3. Индукция профагов

Чтобы определить возможное присутствие профагов, их индуцировали с помощью ультрафиолетового облучения с длиной волны 254 нм. Для этого аликвоты по 100 мкл экспоненциально-растущей бактериальной культуры подвергали облучению в течение различного времени (от 10 до 40 секунд) [215].

2.5.4. Выделение, очистка и секвенирование геномной ДНК штаммов *S. maltophilia*

ДНК штаммов *S. maltophilia* КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670 выделяли с использованием набора D-cells для выделения ДНК из клеток животных и бактерий (Биолабмикс, Россия). Полученную ДНК растворяли в 10% ТЕ-буфере, после чего измеряли ее концентрацию на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Для подготовки к секвенированию ДНК фрагментировали до среднего размера 500 п.н. на ультразвуковом дезинтеграторе Covaris S220 (Covaris, США).

Библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора TruSeq DNA PCR-Free с адаптерами TruSeq Illumina. Количественную оценку библиотек проводили с помощью набора КАРА, после чего их объединяли в эквимоллярных концентрациях. Секвенирование выполняли на платформе Illumina NovaSeq 6000 (США) с набором реагентов S2 v1.5 (2×150 циклов). Демультимплексирование необработанных данных проводили программой bcl2fastq v2.20.0.422 с параметрами по умолчанию.

Первичную обработку данных секвенирования выполняли следующим образом: риды подвергались качественной оценке с помощью FastQC (версия 0.12.1) [216]. Обрезку адаптеров и фильтрацию по качеству проводили в программе Trimmomatic (версия 0.39) [217], обработанные риды повторно оценивали с помощью FastQC. Сборку контигов осуществляли с помощью программы SPAdes (версия 3.15.4) [218], качество контигов оценивали с использованием программы Quast (версия 5.2.0) [219], используя в качестве референса геном *S. maltophilia* NCTC10258 (LS483377.1). Автоматизированную

референсную сборку скаффолдов проводили в Ragtag (версия 2.1.0) [220] с использованием штамма NCTC10258 в качестве ориентира. Итоговое качество сборки повторно оценивали с помощью QUASt. Все использованные алгоритмы и программы применялись с параметрами по умолчанию, если не указано иное. Подготовку библиотек и секвенирование геномов бактериальных штаммов осуществляли к.б.н. Манахов А. Д. и к.б.н. Митина М. С.

2.5.5. Анализ бактериальных геномов *in silico*

Собранные бактериальные геномы были аннотированы с использованием программы Prokka (версия 1.14.6) [221]. Предполагаемые профаги внутри геномов были обнаружены и аннотированы с помощью программы Phigaro (версия 2.3.0) [222]. Для поиска последовательностей CRISPR и белков Cas использовали программу CRISPR/Cas Finder (версия 4.2.20) [223]. Геномы визуализировали с помощью программы Proksee (версия 1.14.6). Все программы применялись с параметрами по умолчанию.

2.5.6. Генотипирование устойчивости к антибиотикам *in silico*

Поиск генов антибиотикорезистентности в геномах штаммов *S. maltophilia* осуществляли с использованием аналитического пакета Vastoria (версия 2.2.0) [224]. В работе были задействованы следующие инструменты и базы данных: программа AMRFinderPlus (версия 3.10.45) [225] и программа ABRicate (версия 1.0.0) [226] для скрининга генов устойчивости к противомикробным препаратам в следующих базах данных: ARG-ANNOT (v.6) [227], CARD (версия 3.2.8) [228], ResFinder (версия 4.1.5) [229], VFDB (по состоянию на 2023.04.17) [230], MEGARes (версия 2.0) [231], в качестве результата использовали только гены с покрытием более 80%. Сравнительные результаты были визуализированы с помощью программы Circos (версия 0.69.8) [232], размещенной на платформе Galaxy (версия 23.2.rc1) [233].

2.5.7. Анализ бактериального пангенома *in silico*

Пангеномный анализ был проведен следующим образом: из 1902 геномов *S. maltophilia*, доступных в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=40324> дата обращения — 4

апреля 2024 года), выбрали те, которые имеют полный уровень сборки с использованием параметра отбора “assembly level: complete”, и исключили атипичные геномы, которые могут включать неправильно классифицированные штаммы “exclude: atypical genomes”. В результате выборка составила 67 геномов, которые были использованы в дополнение к новосибирским штаммам для последующего анализа. Далее все выбранные бактериальные геномы были аннотированы с помощью программы Prokka (версия 1.14.6) [221]. Анализ пангенома был выполнен для новосибирских секвенированных штаммов *S. maltophilia*, а также для тех, которые были загружены из GenBank. Для этого использовали программное обеспечение Roary (версия 3.11.2) [234] с параметрами по умолчанию. Визуализация результатов анализа пангенома была осуществлена с помощью программы Roary plots (версия 0.1.0), входящей в состав программы Roary.

2.5.8. Анализ систем противофаговой защиты

Поиск систем защиты от фагов проводили с использованием программного обеспечения Defense-finder (версия 1.2.2) [97], размещенного на платформе сервера Galaxy [233]. Данное программное обеспечение для поиска сходных последовательностей использует алгоритм скрытых марковских моделей (Hidden Markov Model, HMM). При этом поиск проводится против базы данных RefSeq DB, которая содержит бактериальные геномы с выявленными ранее антифаговыми защитными системами. В дальнейший анализ были включены только антифаговые системы, удовлетворявшие следующим требованиям:

1. показатель статистической значимости (E-value) $<1 \times 10^{-5}$ для выравниваний исследуемых последовательностей против последовательностей из базы данных,
2. покрытие исследуемой последовательности против референсных последовательностей из базы данных (процент выровненных позиций гена) превышает 40%, покрытие HMM-профиля хитом (процент выровненных позиций модели) превышает 65%, а показатель HMMER bit score для выравнивания выше 90.

Эти пороговые значения были выбраны для обеспечения высокой специфичности предсказаний при сохранении чувствительности к дивергировавшим системам: показатель статистической значимости (E-value) $<1 \times 10^{-5}$ исключает ложноположительные совпадения случайного происхождения, покрытие профиля $\geq 65\%$ обеспечивает соответствие исследуемых последовательностей функциональным доменам антифаговой защиты, покрытие последовательности $\geq 40\%$ обеспечивает достоверность сходства нуклеотидных последовательностей, а bit score >90 подтверждает статистически значимую длину и качество выравнивания.

Дополнительно были изучены литературные данные по каждой выявленной системе защиты, чтобы отделить системы, у которых экспериментально подтверждена функция, от тех, для которых предполагается наличие такой активности.

Для оценки степени консервативности антифаговых систем аминокислотные последовательности, кодируемые каждым геном каждой системы защиты от фагов, были извлечены из геномов *S. maltophilia* и выровнены с помощью MUSCLE (версия 3.8.425) [235]. Далее, с использованием той же программы рассчитывали матрицу идентичности для анализируемых белков, полученные величины были усреднены для каждого белка и использованы для оценки консервативности этих белков.

2.5.9. Определение островков противофаговой защиты

Островки защиты определяли как геномные участки, содержащие системы антифаговой защиты и фланкируемые пятью кóровыми генами на 5'-конце и пятью кóровыми генами на 3'-конце систем антифаговой защиты, при условии наличия таких систем как минимум в двух штаммах *S. maltophilia* [101].

Для идентификации ключевых фланкирующих генов использовали данные присутствия-отсутствия генов, полученные при пангеномном анализе. Основные фланкирующие гены каждого штамма сравнивали с гомологичными последовательностями референтного штамма *S. maltophilia* NCTC10258. Гены считались фланкирующими элементами островка защиты, если они сохраняли идентичный порядок расположения в обоих штаммах. Островки защиты, которые

были найдены только в одном штамме из всех исследуемых штаммов, исключали из дальнейшего анализа.

2.6. Исследование фагов

2.6.1. Нарботка и очистка фаговых препаратов

Для приготовления рабочих фаговых суспензий использовали метод конфлоэнтного лизиса: к 300 мкл ночной культуры хозяина добавляли фаг с $MOI=1$, далее полученную суспензию смешивали с 3 мл 0,7% LB-агара, смесь выливали на LB-агар и инкубировали в течение 18 часов при температуре 37 °С или 28 °С. Затем слой верхнего агара соскабливали в пробирки типа Falcon объемом 50 мл, ресуспендировали в 3 мл буфера STM (10 мМ NaCl, 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 10 мМ MgCl₂) и элюировали в течение 2-6 часов при перемешивании, затем смесь центрифугировали (10 000 g) в течение 30 мин, и супернатант, содержащий фаговые частицы стерильно фильтровали через фильтр 0,22 мкм для удаления клеточного остатка и получения чистой суспензии фагов [236].

Титр фага определяли, нанося аликвоты по 5-10 мкл последовательных разведений фагового препарата на двухслойный агар со свежеприготовленным газоном штамма-хозяина. После инкубации в течение 16 часов подсчитывали количество образующихся бляшек и рассчитывали количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) и титр в исходном фаговом препарате.

2.6.2. Анализ биологических свойств фагов

Все эксперименты по изучению биологических свойств были проведены в трех технических повторениях. Инкубирование бактериальных штаммов-хозяев проводили при температуре 37°С для фагов EC151, EC152, StM171 и при 28°С для AerP_220. Спектр хозяев исследуемых фагов определяли методом серийных разведений [237] на свежеприготовленных бактериальных газонах с использованием штаммов из КЭМТК ИХБФМ СО РАН. Фаги наносили на верхний слой агара, чашки Петри инкубировали в течение ночи при соответствующей температуре. Появление бляшек свидетельствовало о том, что исследуемые бактерии чувствительны к исследуемому фагу.

Для изучения биологических характеристик EC151 и EC152 использовали хозяйский штамм *E. cloacae* КЕМТС 2064, для AerP_220 – *A. popoffii* КЕМТС 4062, для StM171 – *S. maltophilia* КЕМТС 2355.

Для определения количества продуцируемых фаговых частиц в одном цикле фаговой инфекции и латентного периода фагов, по 10 мл культуры бактерий-хозяев каждого фага в средней экспоненциальной стадии роста собирали центрифугированием и ресуспендировали в 0,5 мл LB. К суспензии клеток добавляли исследуемый бактериофаг с MOI=0,01 (относительно концентрированной культуры) инкубировали в течение 5 мин при 37°C для EC151, EC152, StM171 и при 28°C для AerP_220 для адсорбции фагов. После этого клетки отделяли центрифугированием от несвязавшихся фаговых частиц и ресуспендировали в 10 мл LB. Инфицированную культуру инкубировали со встряхиванием в течение 1 часа при 37°C для EC151, EC152, StM171 и 28°C для AerP_220. Каждые 5 минут отбирали аликвоты культуры и определяли титр фага, на основе полученных данных строили графики зависимости титра фагов от времени. В каждом эксперименте делали три технических повтора [210, 211].

Литическая активность каждого фага изучалась следующим образом [240]. Экспоненциально растущую культуру штамма бактерии-хозяина (10^7 КОЕ/мл) смешивали с фагом при MOI = 0,01. Затем смесь инкубировали со встряхиванием при 37°C для EC151, EC152, StM171 и при 28°C для AerP_220. Аликвоты отбирали каждые 30 минут, соответствующие разведения аликвот распределяли по чашкам Петри с питательным агаром и инкубировали в течение ночи в термостате. Подсчёт бактериальных колоний проводили на следующий день. В качестве контроля использовали культуру бактерий-хозяев, не инфицированных фагом. На основании полученных данных была рассчитана кривая лизиса бактерий в жизненном цикле каждого фага. Мы классифицировали фаги как высоколитические, если титры бактерий в литической кривой снижались более чем на 3-4 \log_{10} КОЕ/мл в течение 1-4 часов в жидкой культуре [241].

Диапазон хозяев фагов определяли методом спот-анализа: серийные разведения фагового лизата добавляли в каплях по 5 мкл на бактериальные газоны, приготовленные на верхнем слое агара с использованием различных бактериальных штаммов. Чашки Петри инкубировали в течение ночи при

оптимальной температуре для каждого тестируемого штамма; на следующий день появление зон лизиса указывало на восприимчивость хозяина [242]. Хотя четких критериев классификации фагов по диапазону их хозяев не существует, мы следовали правилу, согласно которому фаги классифицируются как имеющие широкий круг хозяев, если они способны инфицировать более 30% протестированных штаммов одного вида [243].

2.6.3. Выделение и очистка фаговой ДНК

Фаговые частицы из фаголизата осаждали 20% PEG6000/2.5 M NaCl с последующей ресуспензией в STM-буфере (10 mM NaCl, 50 mM Трис-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂). Для удаления нуклеиновых кислот хозяина препарат обрабатывали РНКазой и ДНКазой (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C в течение 1 часа (конечная концентрация каждого фермента 5 мкг/мл). Далее проводили лизис фаговых частиц смесью протеиназы К (100-200 мкг/мл), ЭДТА (20 mM) и ДСН (0.5%) с инкубацией 3 ч при 55°C. Дальнейшую очистку ДНК выполняли последовательной экстракцией фенол-хлороформом с последующим переосаждением 96%-ным этанолом.

2.6.4. Секвенирование и сборка геномов фагов

Библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора Nextera DNA Sample Prep (Illumina, США). Парно-концевое секвенирование проводили на платформе MiSeq: для фагов EC151 и EC152 использовали набор (версия 1, 2×150 п.о.), для StM171 - набор (версия 2, 2×250 п.о.). Обрезку ридов выполняли программой Trimmomatic (версия 3.0.) Сборку геномов выполняли с использованием различного программного обеспечения: для EC151 и EC152 проводилась сборка генома в программе CLC Genomics Workbench (версия 6.0.1) (Qiagen, Нидерланды), а для фага StM171 сборку генома делали в программе SPAdes (версия 3.15.2) (по состоянию на 01.08.2021). Для каждого из секвенированных фагов в результате сборки ридов были получены по одному контигу с покрытием ~150× (для EC151, StM171) и ~140× (для EC152). Секвенирование геномных последовательностей фагов и первичный анализ проведены к.б.н. Тикуновым А. Ю.

2.6.5. Анализ фагового генома *in silico*

Для аннотации предполагаемых открытых рамок считывания (ORF) использовали алгоритм RAST [244]; дополнительно верифицировали ORF вручную проверкой предсказанных белков по базе данных NCBI GenBank (Е-значение <math> < 1E5</math>, покрытие запроса $\geq 90\%$, идентичность $\geq 70\%$). Гены тРНК идентифицировали с помощью программы tRNAscan-SE [245]. Компоненты пути модификации 7-дезагуанина у фага EC151 выявляли путем BLASTx/p-анализа (NCBI GenBank) и подтверждали с помощью программы InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>, доступ: 01.06.2021). Дополнительно для уточнения функций предполагаемых белков использовали сервера I-TASSER [246] и HHpred [247]. Содержание GC в геномах рассчитывали с помощью инструмента VectorBuilder GC Calculator [248]. Кроме того, для фага AerP_220 был проведён поиск факторов вирулентности с использованием базы данных Virulence Factor (<https://www.mgc.ac.cn/VFs>, доступ 31 мая 2022 г.) и генов устойчивости к антибиотикам с использованием базы данных The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (<https://card.mcmaster.ca/rgi>, доступ 30 мая 2022 г.) соответственно. Все программы применялись с параметрами по умолчанию.

2.6.6. Филогенетический анализ фагов

Согласно решению Международного таксономического комитета по вирусологии (ICTV), фаги можно классифицировать, используя пороговое значение нуклеотидной идентичности. Виды имеют более 95% общей нуклеотидной идентичности (ANI); роды демонстрируют более 70% ANI с филогенетической согласованностью основных генов. Таксоны уровня субсемейства и семейства создаются, когда два или более отдельных рода связаны между собой, то есть образуют кладу в филогенетическом протеомном дереве. При этом они могут иметь крайне низкую степень сходства нуклеотидных последовательностей (меньше 25%), но должны обладать сходным расположением кóровых генов в геноме (геномной синтенией) и общим происхождением кóровых генов согласно филогенетическому анализу кодируемых ими белковых последовательностей [37].

Для определения таксономического положения фага EC151 был проведен сравнительный анализ его генома с наиболее близкими референсными геномами (фаг *Pseudomonas* NP1 (NC_031058), фаг *Escherichia* 9g (NC_024146) и фаг *Escherichia* Seurat (NC_027378)) с использованием сервера CGView [249]. Выравнивание геномов выполняли программой MAFFT [250], а генетические расстояния рассчитывали в программе MEGA 7.0 [251]. Анализ компонентов пути модификации 7-дезагуанина включал: конкатенацию белковых последовательностей программой BioEdit 7.2 [252], множественное выравнивание (MEGA 7.0) и построение филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия (bootstrap=1000).

Индивидуальный анализ фагов проводили с использованием алгоритма BLAST (на сервере Proksee [253]): фаг StM171 сравнивали с фагами *Stenotrophomonas* Suso (MZ326866) и *Xanthomonas* HXX_Dennis (ON711490), фаг EC152 - с фагами *Cronobacter* vb_Csam_GAP31 (NC_019400) и *E. coli* 4MG (NC_022968), с последующей визуализацией результатов сравнения в программе CGView Builder.

Протеомный анализ выполняли с помощью сервера ViPTree [38] для всех изучаемых фагов с использованием последовательностей фагов, включенных в базу данных GenomeNet/Virus-Host, с добавлением фаговых геномов из базы данных из NCBI GenBank. Для подтверждения таксономической классификации, кластерный анализ протеомов фагов проводили в программе vConTACT2 [39] с использованием последовательностей фагов, включенных в базу данных RefSeq v.216 + с добавлением отсутствующих фаговых геномных последовательностей из базы данных из NCBI GenBank (дата обращения: апрель 2023). Кластеризацию выполняли алгоритмами Markov Cluster algorithm и ClusterONE (порог сходства ≥ 1), результаты визуализировали в программе Cytoscape 3.9.0 [254] с использованием spring-embedded модели, где длина связей между геномами отражает степень их сходства по содержанию общих генов. Для фага StM171 провели направленный поиск гомологов ключевых генов (капсид, хвостовое волокно, белок-рулетка, большая субъединица терминазы) с помощью программы BLASTx (NCBI GenBank, август 2023).

2.6.7. Оптимизация метода количественного ПЦР для характеристики эффективности фаговой инфекции

Эффективность заражения фагами оценивалась по увеличению количества фаговых частиц после инкубации с бактериальным хозяином. Для оценки этого увеличения была проведена количественная ПЦР (qPCR) в соответствии с протоколом, представленным в таблице 3, с использованием олигонуклеотидных праймеров, нацеленных на уникальные гены исследуемых фагов (таблица 3). Исходные данные флуоресценции обрабатывались с помощью алгоритма регрессии в программном обеспечении CFX Manager.

Таблица 3. Протокол для qPCR

Температура, °C	Время, сек	Количество циклов
95	180	1
95	10	39 циклов
55	20	

Для обеспечения воспроизводимости результатов, образцы фагов, используемые для qPCR, были оптимизированы следующим образом: 50 мкл каждого образца инкубировали при 100°C в течение 30 минут для разрушения капсидов. После этого добавляли равный объем хлороформа, смесь энергично встряхивали в течение 10 секунд и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 5 минут. Потом отбирали 5 мкл верхней фракции, содержащей ДНК фага, для qPCR-анализа. При необходимости экстрагированную ДНК разбавляли водой в 5 раз, чтобы уменьшить потенциальное ингибирующее действие бактериальных компонентов.

Предел обнаружения был установлен как самая низкая концентрация фага, которая обеспечивает значение C_q выше фонового шума и в пределах линейного диапазона (~100% эффективности; $\Delta C_q \approx 3,3$ соответствует разведению фага в 10 раз; рис. 4А). Эксперимент проводился в трех технических повторах.

В каждой постановке ПЦР использовались два типа контролей: контроль (#1) использовался для оценки способности фага инфицировать бактерии. Для этого в постановку ПЦР добавляли образец фага, разведенный до концентрации, которая использовалась для инфицирования бактерий (рис. 4Б). Соответственно,

значение C_q для фага, полученного после инкубации с бактериями, сравнивалось с его значением C_q в контроле (#1). Контроль (#2) использовался для количественного определения фаговых частиц в образцах и определения эффективности реакции ПЦР; для этого в каждой постановке ПЦР в качестве стандартов включались три последовательных разведения фага с известным количеством БОЕ/мл (рис. 4В).

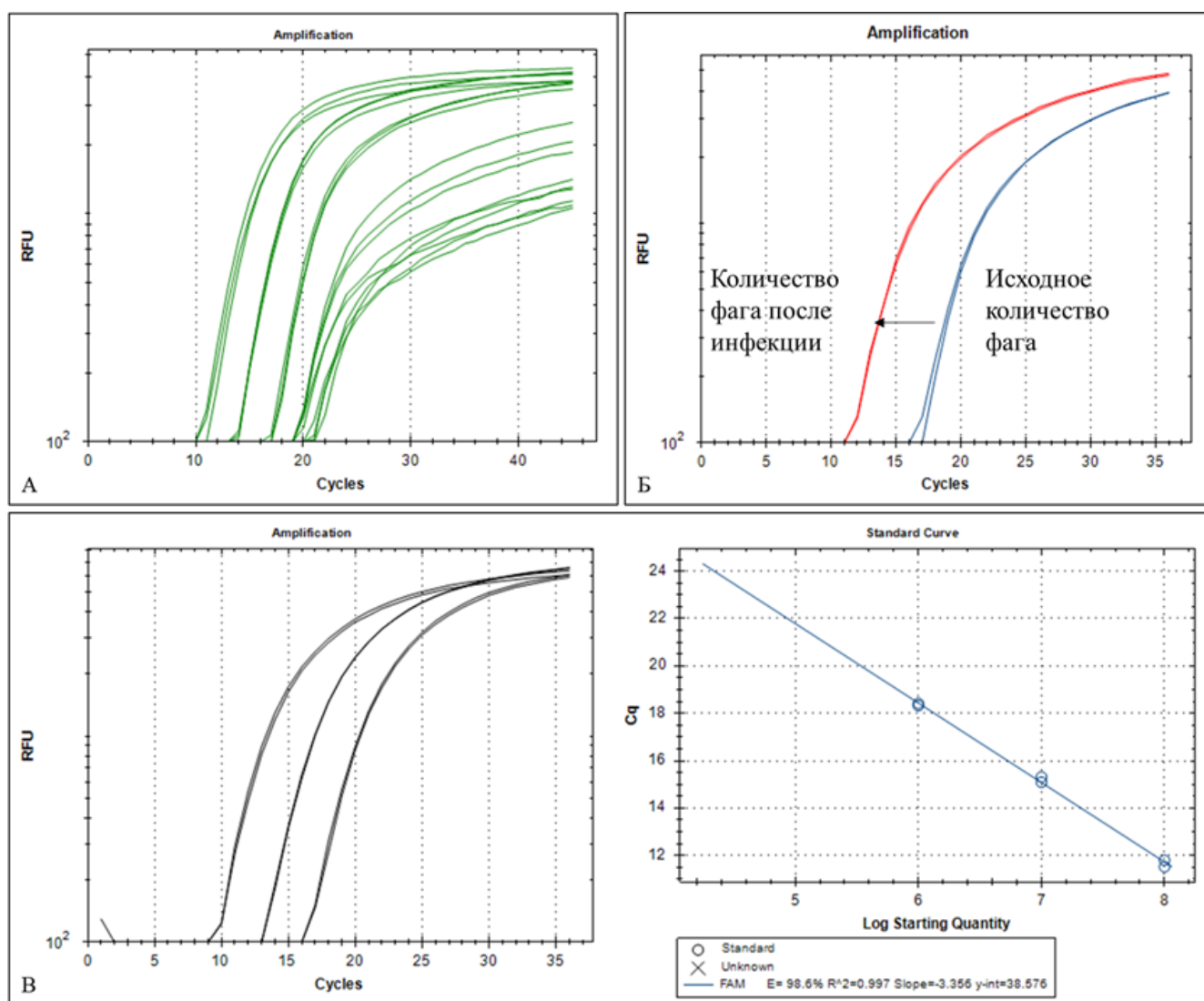


Рисунок 4. Примеры реакций qPCR: А. Серийные разведения образца фага для определения предела обнаружения, Б. Контроль #1, позволяет оценить увеличение количества фага после заражения бактерии, В. Контроль #2, позволяет приблизительно определить титр фага путем сравнения с серийным разведением образца фага с известным количеством БОЕ/мл

Воспроизводимость результатов была рассчитана путем вычисления среднего значения и стандартного отклонения значений C_q , полученных для контрольных образцов (#2) для каждого из четырех исследованных фагов в

разных сериях, кроме того, мы рассмотрели диапазон эффективности реакции и наклон в разных сериях для одного и того же образца.

2.6.8. Эксперимент по коэволюции EC151, EC152, StM171 и StenM174 с их бактериальными хозяевами

Используя оптимизированный метод qPCR, мы исследовали, как процесс адаптации фагов влияет на их способность заражать клоны, полученные от их исходного хозяина. Мы изучили два слаболитических фага, заражающих *E. cloacae* КЭМТК 2064, а именно EC151 и EC152, и два фага, заражающих *S. maltophilia* КЭМТК 2355, слаболитический StM171 и высоколитический StenM174 из коллекции ЛММБ ИХБФМ.

Адаптация фагов осуществлялась путем их продолжительного инкубирования с соответствующими хозяевами. Инкубирование проводилось в двух отдельных биологических повторах продолжительностью 10 пассажей каждый, при этом использовали 4 различных сценария (таблица 4):

1. Сценарий А: коэволюция фага с бактериальным хозяином. Эксперимент проводился для всех четырех фагов, каждый из которых был отдельно пассирован со штаммом-хозяином.

2. Сценарий В: аналогично сценарию А, но с ежедневным добавлением эволюционно наивного (предкового) хозяина; для фагов EC151 и EC152 добавляли *E. cloacae* КЭМТК 2064, для фагов StM171 и StenM174 добавляли исходный штамм *S. maltophilia* КЭМТК 2355

3. Сценарий С: коэволюция фага с хозяином в присутствии конкурирующего фага; StenM174 и StM171 были приготовлены в виде коктейля (оба фага в равных концентрациях) перед началом эксперимента по коэволюции и пассированы вместе, то же самое было сделано для фагов EC151 и EC152.

4. Сценарий D: сочетание сценариев В и С. Использовали коктейли конкурирующих фагов и ежедневно добавляли эволюционно наивных бактерий.

Таблица 4. Факторы, изучаемые в каждом из четырех сценариев

№	Сценарий	Наличие эволюционно наивных бактерий	Наличие конкурирующего фага
1	А	-	-
2	В	+	-

3	C	-	+
4	D	+	+

Знак «+» означает присутствие, знак «-» - отсутствие.

Каждый эксперимент начинался с выращивания бактерий до $OD_{600} = 0,3$, с последующим добавлением фагов при $MOI = 0,1$. Общий объем смеси фагов и бактерий составлял 700 мкл; суспензию инкубировали в пробирках объемом 1,5 мл при 37 °C при перемешивании при 180 об/мин в течение 24 часов (1 пассаж). Далее 35 мкл этой смеси переносили в новую пробирку, содержащую 665 мкл среды LB. Для сценариев В и D в каждом пассаже добавляли дополнительно 10 мкл предковых бактерий, выращенных в тот же день до $OD_{600} = 0,3$, пробирки из предыдущего пассажа хранили далее при 4 °C.

Фаги и бактерии, собранные после 5-го и 10-го пассажа, разделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 минут. Бактериальные осадки, полученные после 5-го и 10-го пассажа (сценарии А и С), ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере и высевали на агаризованную среду LB в чашках Петри. Далее, выросшие отдельные колонии переносили на новые чашки Петри последовательно три раза, после чего анализировали методом ПЦР для подтверждения отсутствия ДНК фагов. Бактерии из сценариев В и D не использовали для дальнейшего анализа из-за содержания эволюционно наивных бактерий, добавляемых при каждом пассаже.

Очищенную центрифугированием суспензию, содержащую фаговые частицы, переносили в новые центрифужные пробирки. Часть суспензии использовали для выделения фаговой ДНК, и количество фаговых геномов определяли с помощью qPCR путем сравнения с контрольными образцами (#2).

Таким образом, к концу эксперимента было получено восемь различных популяций для каждого из фагов, а именно, популяции, адаптированные в соответствии со сценариями А, В, С и D после 5-го и 10-го пассажей. Также было получено по шесть популяций бактерий для каждого фага, а именно, адаптированная против этого фага (сценарий А), адаптированная против конкурирующего с ним фага (сценарий А), адаптированная против смеси обоих фагов (сценарий С), популяции бактерий были собраны после пассажей 5 и 10. В

качестве контролей эффективности адаптации использовали исходные (предковые) варианты фагов и их бактерий-хозяев.

2.6.9. Оценка инфекционной эффективности пассированных фагов

Пассирование бактериальной популяции двумя различными фагами по отдельности или их смесью приводило к образованию разных бактериальных клонов. Чтобы оценить успешность адаптации фага были использованы два критерия: 1) была ли полученная популяция фага способна инфицировать все переменные бактериальные клоны в дополнение к исходному хозяину; 2) существовал ли сценарий адаптации, повышающий эффективность инфицирования фага.

Для ответа на эти вопросы, популяции фагов, полученные в каждом из сценариев (А, В, С, D) после 5-го и 10-го пассажей, были использованы для заражения бактериальных популяций, полученных в ходе эксперимента из сценариев А и С после 5-го и 10-го пассажей. В качестве контролей использовали исходные фаги и исходные бактериальные штаммы. Схема эксперимента была следующей: бактериальные культуры выращивали до оптической плотности $OD_{600}=0.3$, и фаги добавляли в одинаковых количествах, исходя из данных qPCR. Инкубацию проводили в течение ночи без перемешивания в 96-луночных планшетах при 37°C в среде LB. Затем образцы ДНК фагов для ПЦР в реальном времени готовили, как описано ранее (2.6.7).

Таким образом, с помощью qPCR было изучено более 250 взаимодействий фагов с бактериями, при этом qPCR для каждого образца делали в двух технических повторах.

Способность фага к заражению рассчитывалась как отношение количества геномных частиц фага через 24 часа после заражения бактерий к исходному количеству геномных частиц в контрольном образце (#1) (который представляет собой тот же фаг до заражения бактерий), после чего это отношение логарифмировалось по основанию 10 (\log_{10} БОЕ/мл). Таким образом, значительное увеличение количества фага после заражения рассматривалось как показатель способности фага заражать бактерии. Минимальное пороговое значение, установленное для определения способности адаптированного фага

инфицировать бактерии, составляло 0,5, что означает увеличение количества фаговых частиц в 3 раз после инфицирования бактерий по сравнению с исходной концентрацией, или 2.3 Cq по данным qPCR.

$$\begin{aligned} & \text{Способность фага к заражению} \\ & = \log_{10} \frac{\text{количество фаговых геномных ДНК после инфицирования}}{\text{количество референтных фаговых геномных ДНК}} \end{aligned}$$

Увеличение инфекционности рассчитывалось путем сравнения способности адаптированного фага инфицировать бактериальную популяцию со способностью исходного фага инфицировать ту же бактериальную популяцию. Мы учитывали только значительные увеличения, превышающие 1 (т.е. 10-кратное увеличение количества фаговых частиц, инфицируемых адаптированным фагом по сравнению с исходным фагом, или 3,3 Cq в qPCR). Если исходный фаг был неспособен инфицировать определенную бактериальную популяцию, мы рассматривали саму способность адаптированного фага инфицировать эту бактериальную популяцию как признак увеличения инфекционности.

Увеличение инфекционности адаптированного фага

$$= \frac{\text{Способность адаптированного фага к заражению бактерий}}{\text{Способность исходного фага заражать те же бактерии}}$$

2.7. Статистика

Статистический анализ результатов экспериментов по ингибированию биопленки проводился с использованием Python 3.11 и библиотек pandas, NumPy, SciPy, statsmodels, matplotlib и seaborn. Данные о формировании биопленки по всем вариантам обработки (контроль, антибиотики C, AMP, LEV, TE, CN и их комбинации с фагом) сначала оценивались с помощью однофакторного дисперсионного анализа (однофакторный ANOVA), за которым следовал пост-хок тест Тьюки (HSD, $\alpha = 0,05$) для выявления наиболее эффективного варианта воздействия по сравнению с контролем и парных различий. Для оценки комбинированных эффектов антибиотиков с добавлением фага проводился двухфакторный дисперсионный анализ (двухфакторный ANOVA) на реструктуризованном наборе данных, сравнивающим условия «только антибиотик» и «антибиотик + фаг (StM171)», с проверкой основных эффектов антибиотика, фага и их взаимодействия. Дополнительно для каждой пары

антибиотиков (с фагом и без) применялись парные t-тесты (двусторонние) с расчетом размеров эффекта Коэна (Cohen's d) для количественной оценки влияния фага. Процентные ингибирования биопленок рассчитывались по формуле $(\text{среднее контрольное} - \text{среднее}) / \text{среднее контрольное} \times 100$. Перед параметрическими тестами проверялись предположения (нормальность по тесту Шапиро-Уилка, гомоскедастичность по тесту Левена); визуализация включала боксплоты, столбчатые диаграммы с пометками значимости (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

Статистический анализ для оценки изменений чувствительности к антибиотикам проводился с использованием Python и библиотек pandas, NumPy, SciPy, matplotlib и seaborn. Данные о зонах ингибирования (диаметр в мм) по 13 антибиотикам для оригинальных фаг-чувствительных штаммов и их фаг-резистентных мутантов анализировались следующим образом: для каждой комбинации штамм-антибиотик применялись парные t-критерии Стьюдента (двусторонние) для сравнения значений между оригинальными и резистентными вариантами; для каждого штамма отдельно проводился одновыборочный t-критерий на различиях (Resistant - Original) для оценки общего эффекта резистентности. Размер эффекта рассчитывался как средняя разница в зонах ингибирования (Resistant - Original). Визуализация включала детализированные столбчатые диаграммы по штаммам, тепловые карты изменений чувствительности и диаграммы средних эффектов с 95% доверительными интервалами.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Характеристика бактериофагов

3.1.1. Характеристика фага *E. cloacae* EC151

Фаг EC151 образует небольшие мутные бляшки диаметром около 0,5 мм на газоне штамма-хозяина *E. cloacae* КЭМТК 2064 (рис. 5А).

Электронная микроскопия показала, что фаг EC151 имеет слегка удлинённый капсид с размерами 62×76 нм, который соединен с длинным несокращающимся хвостом длиной более 200 нм. Соответственно, морфология фаговых частиц соответствует сифовирусному морфотипу (рис. 5Б).

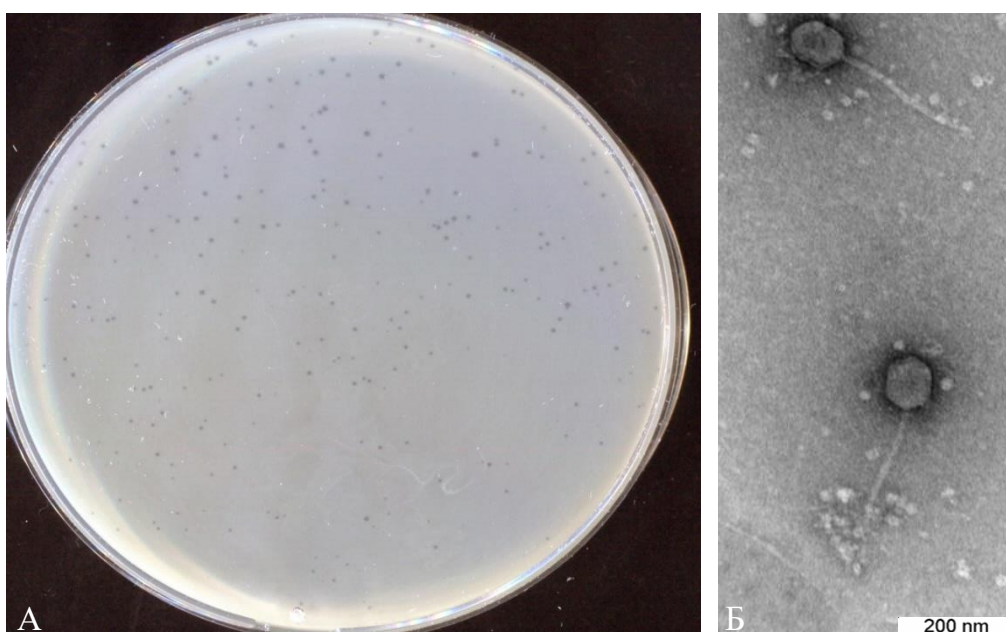


Рисунок 5. Морфологические свойства фага EC151. А: Фотография бляшек, образованных фагом EC151 на газоне штамма-хозяина *E. cloacae* КЭМТК 2064. Б: Просвечивающая электронная микрофотография частицы фага EC151, негативное контрастирование 1%-ным раствором уранилацетата

Исследование литической активности фагом EC151 показало, что латентный период инфекции составил 50 минут (рис. 6А), а выход фага составил 10 фагов на клетку. Фаг уменьшает титр бактерий всего лишь примерно в 0,5 раза (рис. 6Б), что свидетельствует о его низкой литической активности в отношении этого штамма энтеробактера.

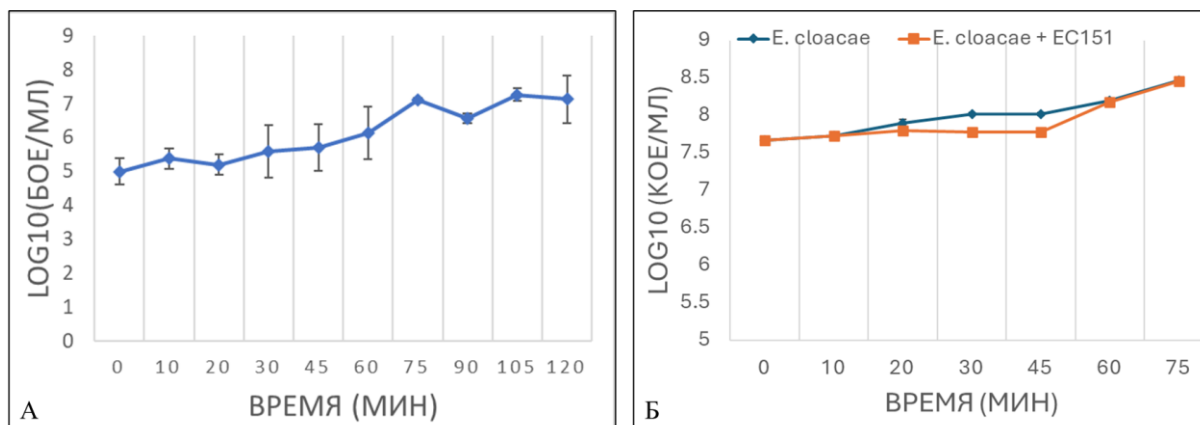


Рисунок 6. Биологические характеристики EC151 против *E. cloacae* КЭМТК 2064. А) одноступенчатая кривая роста EC151 на штамме-хозяине *E. cloacae* КЭМТК 2064. Б) кинетика лизиса, при которой бактериальную культуру, инкубированную с фагом EC151 (*E. cloacae* + EC151), сравнивали с неинфицированной бактериальной культурой (*E. cloacae*).

Было обнаружено, что EC151 обладает узкой специфичностью, будучи способным инфицировать только 2 штамма *Enterobacter* из 44 протестированных; он также не смог заразить ни один из 36 протестированных штаммов родов *Klebsiella*, *Pantoea*, *Shigella*, *Salmonella*, а также *E. coli*.

Геном фага EC151 был секвенирован и аннотирован. Он представляет собой двуцепочечную молекулу ДНК длиной 60753 п.н. и был депонирован в базу данных NCBI GenBank под регистрационным номером MW464860. Геном содержит 58 предполагаемых ORF, 39 из которых кодируют белки с предсказанной функцией, а функция 18-ти ORF не определена, один ген кодировал тРНК-Ser-GCT (рис. 7). В геноме фага EC151 был идентифицирован кластер генов, кодирующих компоненты деазагуанинового пути модификации ДНК. Геном EC151 содержит четыре гена (*folE*, *queD*, *queC*, *queE*), необходимые для синтеза предшественника квеозина (PreQ0), а также ген *dpdA*, кодирующий ДНК-модифицирующий белок (рис. 8). Вероятно, данный фаг модифицирует свою ДНК с помощью *dpdA*, как это было ранее показано для других фагов [255,256]. В состав данного кластера также входит ген, аннотированный с помощью поиска BLASTx как ген белка-транспортера *preQ0*; принадлежность к транспортерам была подтверждена с помощью программы InterProScan. Подобные белки, как предполагается, переносят в клетку предшественники *preQ0* или *preQ1*, захватывая их из окружающей среды [257,258]. Вероятно, фаг EC151

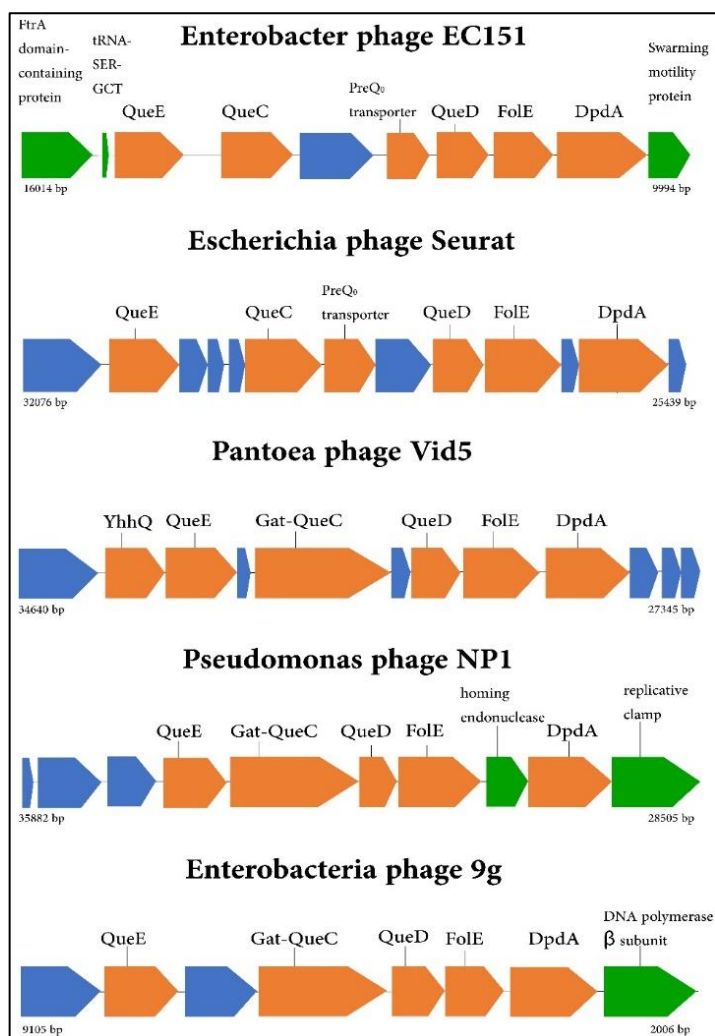


Рисунок 8. Генетический кластер, кодирующий белки системы модификации 7-дезагуанин у EC151 и других фагов. *Morozova et al. 2021*

Чтобы оценить возможную модификацию геномной ДНК фага EC151, геном EC151 был проанализирован *in silico* на наличие сайтов эндонуклеаз рестрикции II типа. Были выявлены и выбраны для дальнейшего анализа сайты *Acc65I* (G[^]GTACC), *KpnI* (GGTAC[^]C), *ApiI* (GGGCC[^]C), *DraI* (TTT[^]AAA), *SalI* (G[^]TTCGAC) и *XmaI* (C[^]CCGGG). Экспериментально было обнаружено, что ДНК EC151 обладает высокой устойчивостью к гидролизу указанными эндонуклеазами, за исключением *DraI*, которая узнаёт последовательность TTT[^]AAA и эффективно гидролизует ДНК. Эти данные свидетельствуют о том, что ДНК EC151 модифицирована (рис. 9).

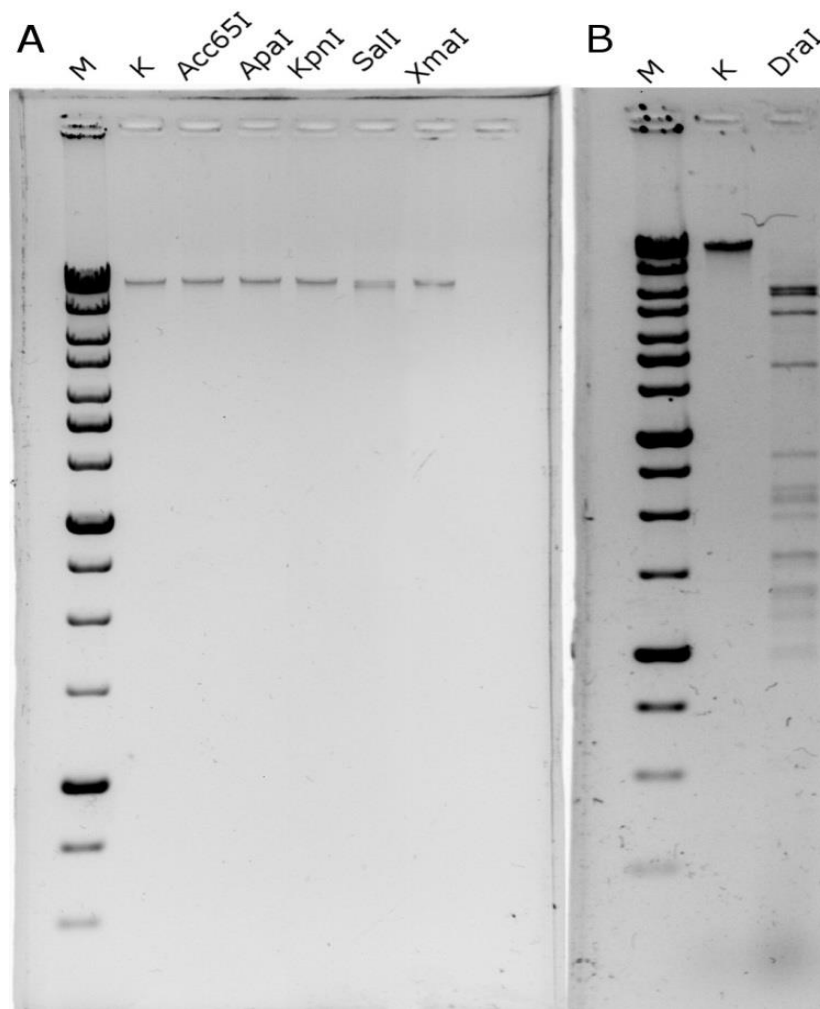


Рисунок 9. Гидролиз ДНК фага EC151, проведенный с использованием эндонуклеаз *Acc65I*, *ApaI*, *DraI*, *KpnI*, *SalI* и *XmaI*. Профиль гидролизованной ДНК анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Дорожки: М-маркёр молекулярной массы ДНК 1 кб (СибЭнзим, Россия), К – интактная ДНК фага EC151. *Morozova et al. 2021*

Фаг EC151 – это первый известный фаг *Enterobacter*, который содержит полный путь синтеза *preQ0*; ранее был известен только фаг *Enterobacter phiEM4* (LC373201) (*Ackermannviridae*; *Agtrevirus*), содержащий один из компонентов пути модификации, ген *queC* (BBD52218) [256]. Нуклеотидная последовательность EC151 показала ограниченное сходство с геномами других фагов, хранящимися в базе данных NCBI GenBank, а алгоритм BLASTx выявил сходство белков деазагуанинового пути модификации ДНК EC151 с белками фагов, принадлежащих к родам *Seuratvirus*, *Nonavirus* и *Nipunavirus* (рис. 10) [259–262]. Кроме того, исследованные белки деазагуанинового пути модификации ДНК обладали сходством с белками многих

неклассифицированных фагов, в частности неклассифицированных вибриофагов и фага *Pantoea* vB_PagS_Vid5 (NC_042120), который является единственным представителем рода *Vidquintavirus* (рис. 10А) [263]. Отметим, что среди геномов фагов, обладающих хотя бы отдаленным сходством с геномом фага EC151, ген, кодирующий тРНК-Ser-GCT, был обнаружен только в геноме фага vB_PagS_Vid5; гены тРНК не были обнаружены в геномах *Nipunavirus*, *Seuratvirus* и *Nonagvirus*.

Кластер генов дезагуаниновой модификации ДНК EC151 проявляет синтению, типичную для *Seuratvirus*. Чтобы оценить происхождение пути модификации ДНК дезагуанином у фага EC151, был проведен филогенетический анализ белков QueE, QueC, QueD, FolE и DpdA этого пути с наиболее сходными соответствующими белковыми последовательностями (рис. 10А). Было обнаружено, что исследуемый кластер белков группируется с аналогичными белками рода *Seuratvirus*. Белки QueC были обнаружены у представителей рода *Seuratvirus* и некоторых неклассифицированных вибриофагов; между тем, представители родов *Nipunavirus*, *Vidquintavirus* и *Nonagvirus* кодируют белки Gat-QueC, которые обладают дополнительным доменом Gat, необходимым для модификации preQ0 в производное G⁺ (archaeosine) в составе тРНК. Белки, сходные с транспортером EC151 preQ0, также были обнаружены у представителей рода *Seuratvirus* и нескольких неклассифицированных фагов, в частности у неклассифицированных вибриофагов (рис. 10Б). Согласно филогенетическому анализу, белок-переносчик preQ0 фага EC151 сформировал отдельную ветвь внутри клады, которая включала соответствующие белки представителей рода *Seuratvirus*. Таким образом, можно заключить, что путь модификации ДНК дезагуанином в геноме EC151 и аналогичный путь в геномах у представителей рода *Seuratvirus*, к которому в основном относятся фаги *Escherichia*, имеет общее происхождение. Фаг EC151 и фаги рода *Seuratvirus*, вероятно, имели общего предка, от которого они унаследовали этот оперон.

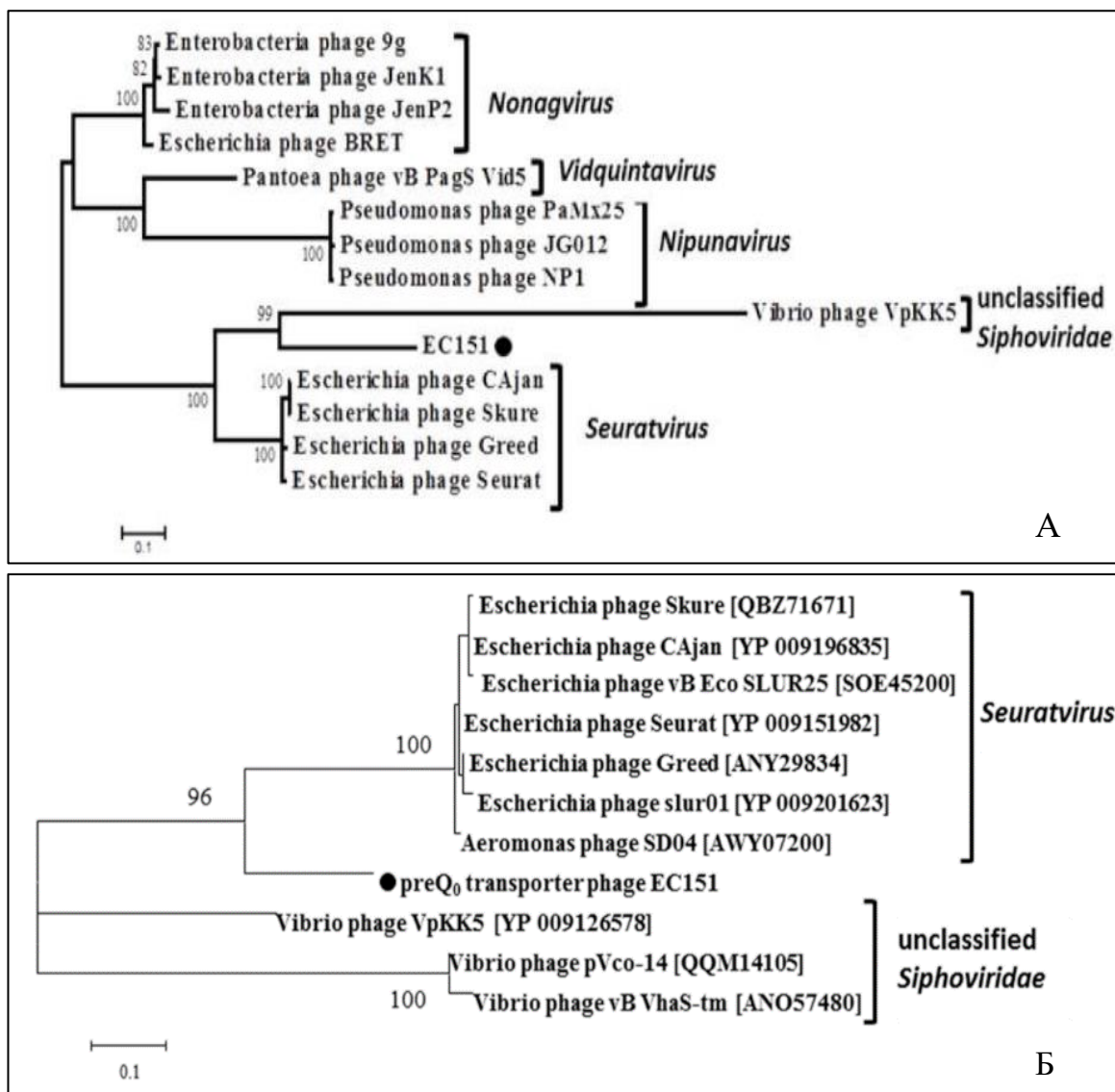


Рисунок 10. Филогенетический анализ белков пути модификации 7-дезагуанина фага EC151 с наиболее схожими белковыми последовательностями. А) Филогенетический анализ конкатенированных белков QueE, QueC, QueD, FoIE и DpdA пути модификации ДНК дезагуанина EC151. Б) Филогенетический анализ транспортера preQ0 с наиболее схожими белковыми последовательностями. Выравнивание и анализ проводились с использованием MEGA 7.0 с применением метода максимального правдоподобия; использовалось значение бутстрепа 1000. Значения поддержки ветвей Байеса выше 80% приведены в узлах. *Morozova et al. 2021*

Сравнительный протеомный анализ фага EC151 с аналогичными фагами показал, что фаг EC151 представляет собой отдельную ветвь в группе последовательностей, содержащих клады, образованные представителями родов *Seuratvirus*, *Nonagvirus* и *Vidquintavirus* (рис. 11).

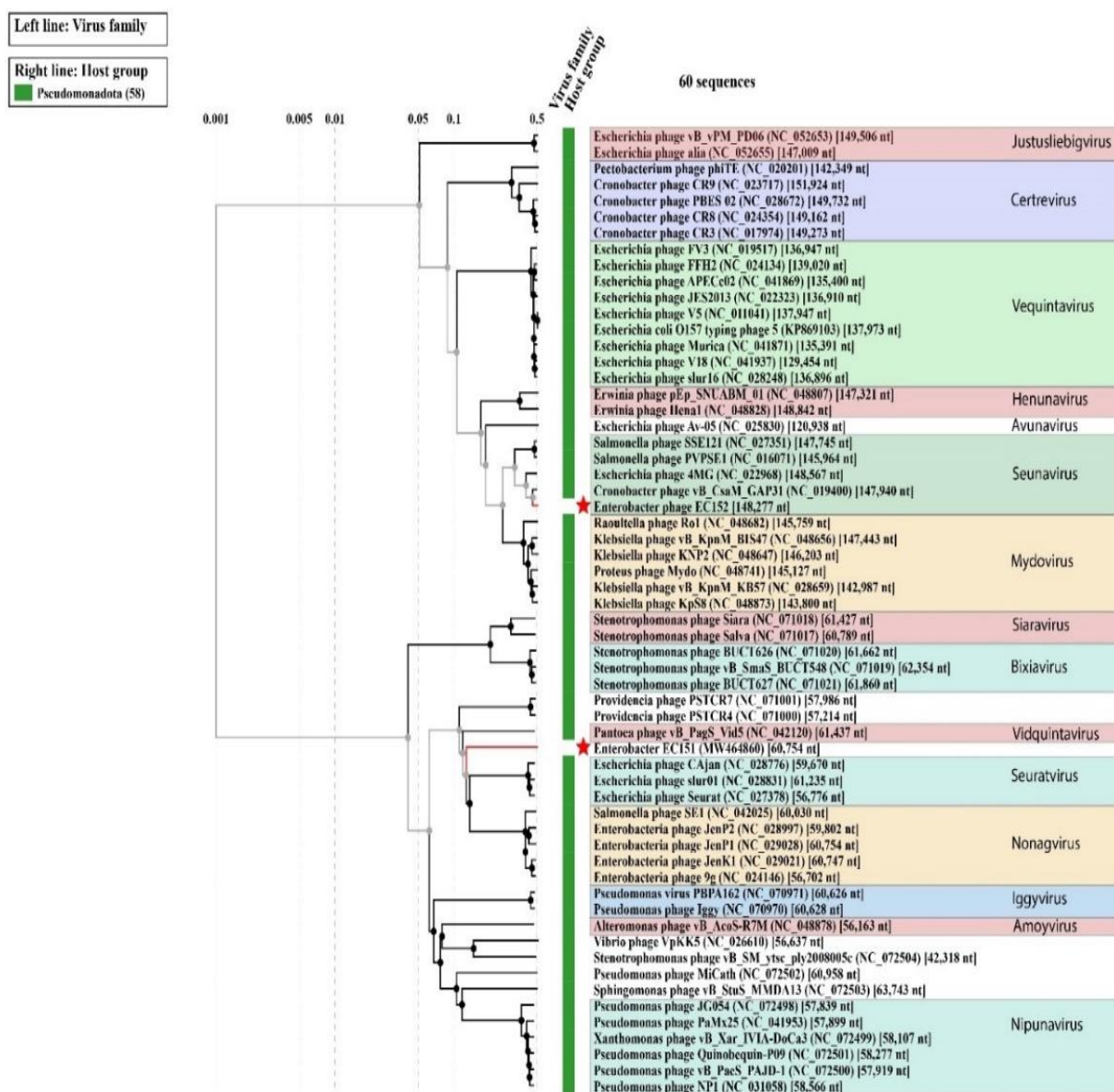


Рисунок 11. Филогенетический протеомный анализ фагов EC151 и EC152 с использованием ViPTree.

Были рассчитаны средние генетические расстояния внутри этих родов и между ними и фагом EC151, и было обнаружено, что генетические расстояния между EC151 и исследованными родами близки к генетическим расстояниям между этими родами (~0,7 замен на сайт); таким образом, EC151 может представлять собой новый род класса *Caudoviricetes*.

Таким образом, фаг EC151 является сифофагом с низкой литической активностью. Анализ генома показал, что он является представителем нового рода и является первым известным фагом *Enterobacter*, геном которого содержит путь системы модификации дезагуанина, включая синтез предшественника.

3.1.2. Характеристика фага *E. cloacae* EC152

Фаг EC152 был выделен из навоза крупного рогатого скота. Этот фаг образует мутные, плохо различимые бляшки диаметром около 0,5 мм на газоне штамма-хозяина *E. cloacae* КЭМТК 2064 (рис. 12А). При просвечивающей электронной микроскопии вирионов фага EC152 были обнаружены икосаэдрические головки диаметром 90-95 нм, соединенные с длинным сокращающимся хвостом длиной около 120 нм. Морфология и размер частиц фага соответствовали морфотипу миовируса (рис. 12Б).

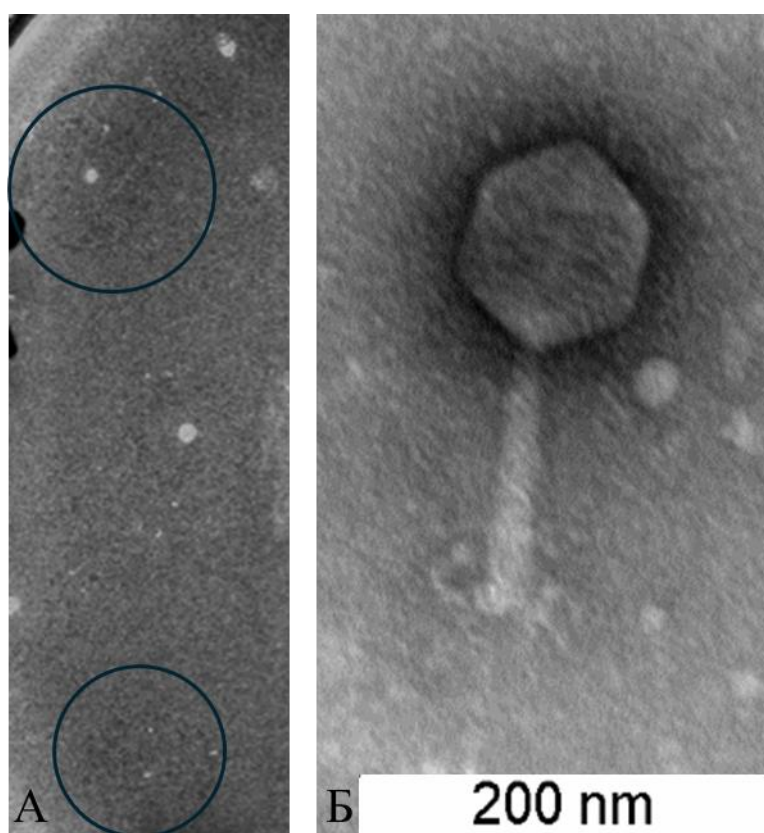


Рисунок 12. Морфологические свойства фага EC152. А: Фотография бляшек, образованных фагом EC152 на газоне штамма-хозяина *E. cloacae* КЭМТК 2064. Б: Просвечивающая электронная микрофотография частицы фага EC152, негативное контрастирование 1%-ным раствором уранилацетата.

Поскольку этот фаг формирует очень мелкие и мутные бляшки, подсчет которых затруднен, для оценки инфекционности фага использовали метод qPCR, при этом оценивали количество реплицирующийся фаговой ДНК в культуре фаг-бактерия. Скорость размножения фага EC152 была близка скорости роста бактерий-хозяев (рис. 13А); титр бактерий, инфицированных фагом EC152, через

1,5 часа после заражения практически совпадал с титром контрольной культуры, не инфицированной фагом EC152, что указывает на то, что фаг размножается параллельно с делением бактерий без очевидного лизиса (рис. 13Б).

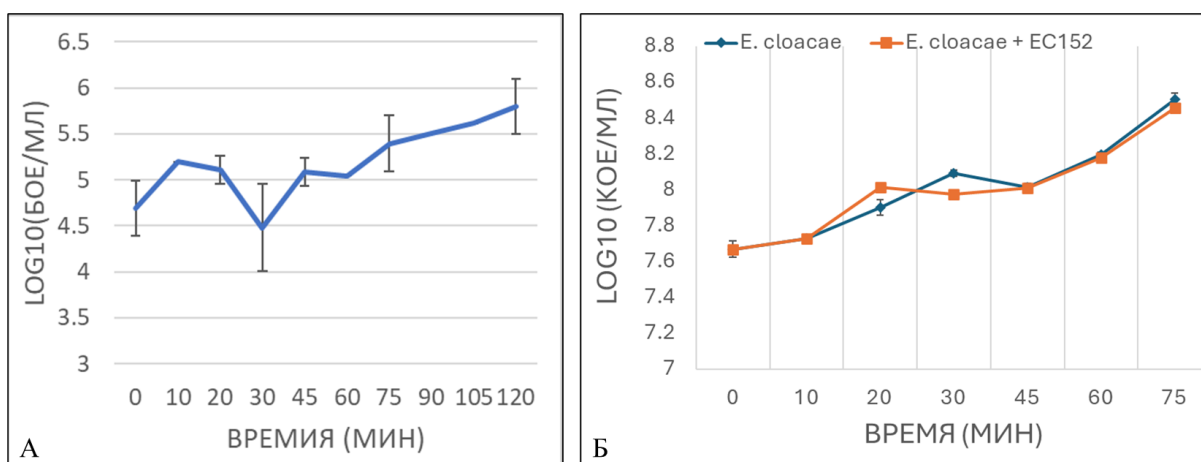


Рисунок 13. Биологические характеристики EC152 против *E. cloacae* КЭМТК 2064. А) одноступенчатая кривая роста EC152 на штамме-хозяине *E. cloacae* КЭМТК 2064. Б) кинетика лизиса, при которой бактериальную культуру, инкубированную с фагом EC152 (*E. cloacae* + EC152), сравнивали с неинфицированной бактериальной культурой (*E. cloacae*).

Было обнаружено, что EC152 был способен инфицировать только 2 штамма *E. cloacae* из 8 протестированных штаммов *E. cloacae*, *E. hormaechei* и *E. xiangfangensis*.

Анализ генома EC152 показал, что он содержит 148277 п.н., геном включает 286 предполагаемых ORF (рис. 14). Для 51 из этих ORF были предсказаны функции, что выявило геном, адаптированный к умеренному образу жизни. Ключевым доказательством этого являются гены интегразы и транспозазоподобного белка, причем последний предполагает потенциальный μ -подобный механизм интеграции в геном хозяина [264]. Фаг EC152 возможно использует стратегию защиты от иммунной системы бактерии-хозяина с помощью двух различных генов ДНК-метилтрансферазы, которые, вероятно, защищают его ДНК, подавляя активность эндонуклеаз рестрикции хозяина. Метаболическая адаптация очевидна в наличии полноценного пути восстановления NAD^+ (NAPR или NAD^+ reconstitution pathway), состоящего из переносчика никотинамидмононуклеотида (NMN) (PnuC) и никотинамиднуклеотидаденилилтрансферазы (NadD). Вероятно, этот модуль позволяет фагу

эффективно захватывать предшественники NAD^+ из клетки хозяина для обеспечения собственной репликации, и этот путь является одним из способов защиты от антифаговых систем бактерий, например в ответ на действие системы Thoeris [265]. Путь NAPR ранее уже был обнаружен у фагов с дсДНК с большими геномами, превышающими 140 кб, которые являются миовирусами [266,267].

Кроме того, наличие гомологов генов *rIIA* и *rIIB* из *RII* локуса указывает на механизмы контроля времени лизиса и преодоления бактериальных систем abortивной инфекции [268,269]. Были обнаружены 22 гена тРНК и ген тРНК-нуклеотидилтрансферазы, что может оптимизировать трансляцию вирусных мРНК. Геном фага EC152 был депонирован в NCBI GenBank под регистрационным номером PP681140.1.

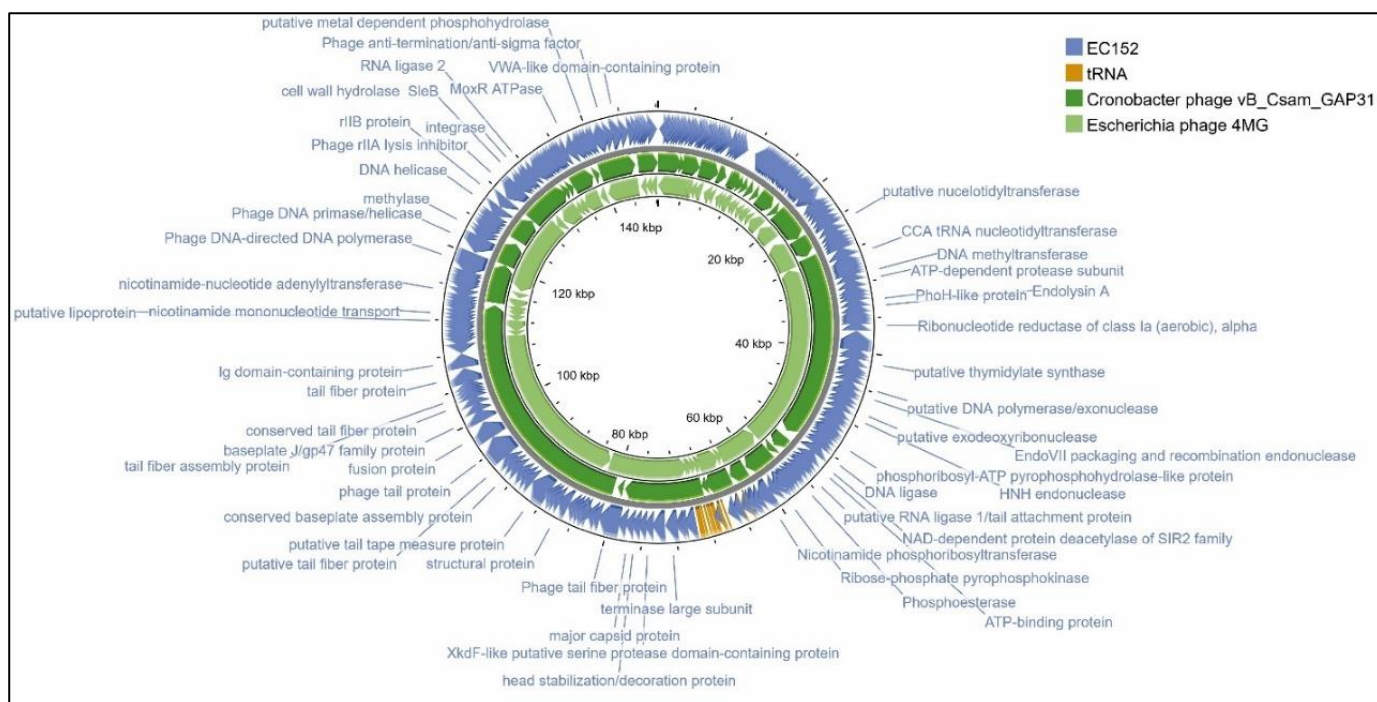


Рисунок 14. Карта генома фага EC152, построенная с использованием сервера Proksee. Открытые рамки считывания генома EC152 обозначены синим цветом во внешнем круге. Для сравнения сходства последовательностей использовали TBFASTX в сравнении с фагом *Escherichia* 4MG (светло-зеленый) и фагом *Cronobacter* vB_Csam_GAP31 (тёмно-зеленый).

Филогенетический протеомный анализ с использованием программного обеспечения ViPTree показал, что фаг EC152 относится к роду *Seunavirus*, в который входят фаги, заражающие *Salmonella*, *Escherichia* и *Cronobacter* (рис. 11). Род *Seunavirus* состоит из пяти фагов с размерами геномов около ~145 т.п.н. и включает фаги *Salmonella* SSE121 (NC_027351), PVPSE1 (NC_016071), фаг *E. coli*

4MG (NC_022968) и фаг *Cronobacter* vB_CsaM_GAP31 (NC_019400). Хотя не все фаги содержат гены интегразы (за исключением vB_CsaM_GAP31), в их геномах присутствуют другие гены, которые указывают на умеренный образ жизни, например, гены, кодирующие транспозазоподобный белок у фагов PVPSE1, 4MG и vB_CsaM_GAP31. Важно отметить, что геномы всех фагов рода *Seunavirus* также включают полный путь утилизации NAD⁺.

Таким образом, фаг EC152 является миофагом с лизогенизирующей активностью. Анализ генома показал, что он является членом рода *Seunavirus* и является первым описанным фагом *Enterobacter*, геном которого содержит полный путь утилизации NAD⁺.

3.1.3. Характеристика фага *A. ropoffii* AerP_220

Бактериофаг AerP_220 был получен из пробы воды, взятой из реки Иня, Новосибирская область. Фаг AerP_220 образовал большие прозрачные бляшки на бактериальном газоне *A. ropoffii* КЭМТК 4062. Бляшки имели диаметр приблизительно 1-2 мм и были окружены полупрозрачным ореолом, вероятно, связанным с активностью деполимеризующих фаговых ферментов (рис 15А). В ходе электронной микроскопии препарата фага AerP_220 были обнаружены икосаэдрические головки диаметром 50-55 нм, соединенные с коротким хвостом длиной приблизительно 10-12 нм. Морфология и размер фаговых частиц соответствовали морфотипу подовируса (рис. 15Б).

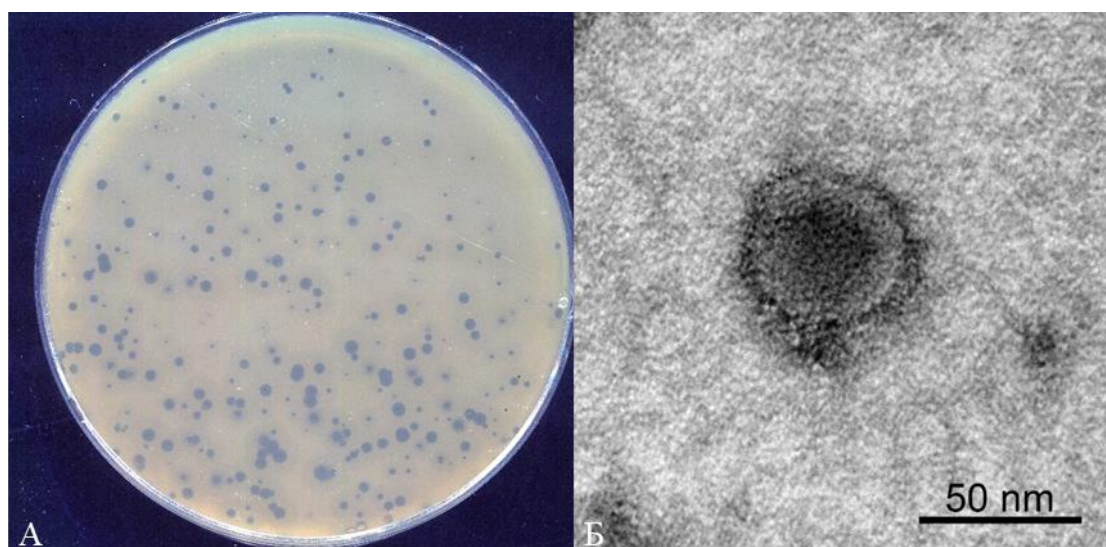


Рисунок 15. Морфологические свойства фага AerP_220. А: Фотография бляшек, образованных фагом AerP_220 на газоне штамма-хозяина *A. ropoffii* КЭМТК 4062

Б: Просвечивающая электронная микрофотография частицы фага AerP_220, негативное контрастирование 1%-ным раствором уранилацетата. *Morozova et al. 2022*

Одноступенчатая кривая роста для фага AerP_220 показала латентный период инфекции продолжительностью около 30 мин с размером выхода фагового потомства ~20 фаговых частиц на инфицированную клетку (рис. 16А). Многоступенчатая кривая лизиса бактерий в жизненном цикле фага выявила литические свойства фага AerP_220. Титр живых бактерий уменьшился на три порядка в течение часа после заражения фагом, после чего количество бактерий начало медленно увеличиваться. Таким образом, полученные данные продемонстрировали высокую литическую активность фага AerP_220 в отношении чувствительного штамма *A. popoffii* КЭМТК 4062 (рис. 16Б).

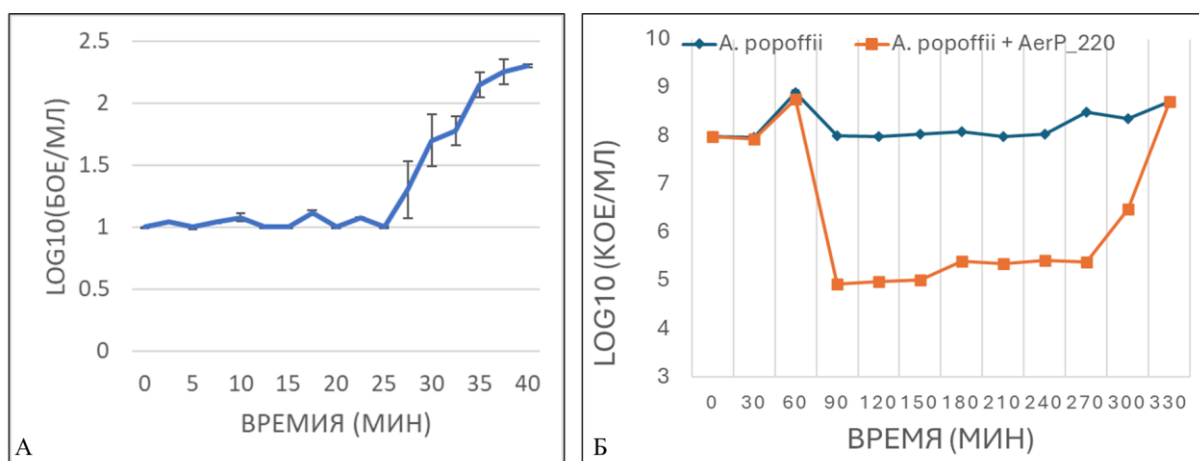


Рисунок 16. Биологические характеристики AerP_220 против *A. popoffii* КЭМТК 4062. А) одноступенчатая кривая роста AerP_220 на штамме-хозяине *A. popoffii* КЭМТК 4062. Б) кинетика лизиса, при которой бактериальную культуру, инкубированную с фагом AerP_220 (*A. popoffii* + AerP_220), сравнивали с неинфицированной бактериальной культурой (*A. popoffii*).

Был проведен анализ спектра возможных хозяев фага AerP_220 с использованием 27 штаммов *Aeromonas* spp., которые были выделены в основном из образцов речной и озерной воды и депонированы в КЭМТК. Фаг AerP_220 был способен инфицировать только один штамм из всех протестированных видов *Aeromonas* – штамм *A. popoffii* КЭМТК 4062. Примечательно, что он не заразил *A. veronii* КЭМТК 4064, который был выделен из того же образца воды, что и *A. popoffii* КЭМТК 4062. Это соответствует общей тенденции к узкому спектру хозяев для фагов подовирусных морфотипов. Однако было протестировано

ограниченное количество штаммов *A. popoffii*, и нельзя исключать, что AерР_220 смог бы инфицировать и другие штаммы, если бы была возможность провести скрининг большего количества штаммов *Aeromonas*.

Размер генома AерР_220 составил 45207 п.н (рис. 17). Последовательность генома фага AерР_220 была внесена в GenBank под регистрационным номером ON624112. В геноме AерР_220 было обнаружено 59 ORF; продукты 33 из них являются белками с известными функциями; 26 кодируют гипотетические белки. Гены, кодирующие факторы вирулентности, гены устойчивости к антибиотикам и гены тРНК, в геноме AерР_220 обнаружены не были.

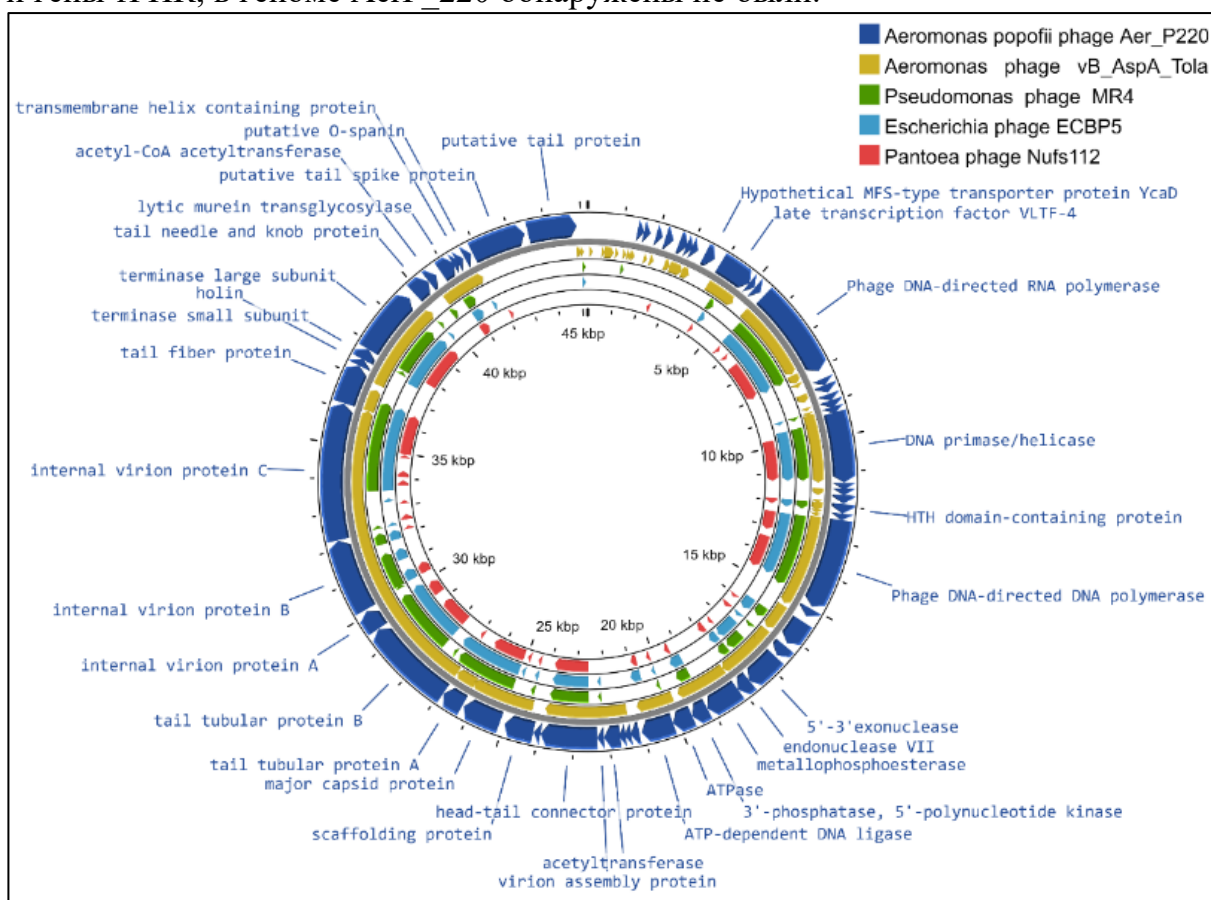


Рисунок 17. Карта генома фага *Aeromonas* AерР_220, визуализированная с помощью программы Proksee. Открытые рамки считывания генома AерР_220 обозначены синим цветом, показанные во внешнем круге. На карте подписаны только белки с предсказанными функциями. Стрелки во внутренних кругах представляют собой сходные кодирующие фрагменты геномов родственных фагов. Алгоритм TBLASTX использовался для сравнительного выравнивания геномов AерР_220, фага *Aeromonas* vB_AspA_Tola (OM913599), фага *Pseudomonas* MR4 (MT104467), фага *Escherichia* EСBP5 (KJ749827) и фага *Pantoea* Nufs112 (OK570185). *Morozova et al.* 2022

Все выявленные ORF являются сонаправленными и сгруппированы в три функциональных кластера. Точное определение границ функциональных кластеров затруднено, поскольку геном AerP_220 содержит несколько потенциальных ORF, не имеющих гомологии с известными последовательностями.

Первый кластер содержит примерно одиннадцать ранних генов, и только два из них кодируют белки с предсказанными функциями. Остальные гены, вероятно, экспрессируются в начале заражения, что обеспечивает метаболические изменения в клетках, необходимые для последующего развития фаговой инфекции. Второй кластер включает более 20 генов метаболизма ДНК; ген ДНК-лигазы расположен в конце этого кластера. Геном содержал как ДНК-полимеразу, так и ДНК-зависимую РНК-полимеразу. Последняя была обнаружена между кластером ранних генов и кластером генов метаболизма ДНК.

Третий кластер (поздние гены) связан со сборкой фаговых капсидов, созреванием ДНК и выходом зрелых фаговых частиц. Большинство генов из этого кластера (22/26 ORF) кодируют белки с предсказанными функциями, и 14 из них, предположительно, являются структурными генами.

Геном AerP_220 был сравнен с геномами других фагов, доступными в базе данных NCBI GenBank, с использованием сервера BLASTN. Наибольшее сходство было обнаружено с геномом другого фага *Aeromonas* vB_AspA_Tola (OM913599) [270]. Идентичность последовательностей составила 62,9%, а покрытие - 55%. Было обнаружено некоторое сходство между фрагментами генома AerP_220 и фрагментами генома фага *Pseudomonas* MR4 (MT104467), фага *Escherichia* ECBP5 (KJ749827), фага *Pantoea* Nufs112 (OK570185), однако покрытие было низким. Сравнение генома фага AerP_220 и геномов перечисленных фагов с помощью программного обеспечения Proksee выявило явное сходство геномной организацией (рис. 17).

Сравнительный протеомно-филогенетический анализ фага AerP_220 был проведен с использованием программного обеспечения ViPTree. Было показано, что геномы AerP_220 и vB_AspA_Tola образуют отдельную ветвь в кластере, содержащем геномы фагов *Pantoea* Nufs112 (OK570185), *Reminis* (MN478376), *Pectobacterium* PP99 (NC047802), *Escherichia* ECBP5 (KJ749827) и *Pseudomonas*

MR4 (MT104467) (рис. 18). Два фага из этого кластера, *Escherichia* ECBP5 и *Pectobacterium* PP99, ранее были классифицированы как представители рода *Gajwadongvirus* порядка *Autographivirales* (Основной список видов ICTV 2021.v1; <https://talk.ictvonline.org>, дата обращения - 9 мая 2022 года).

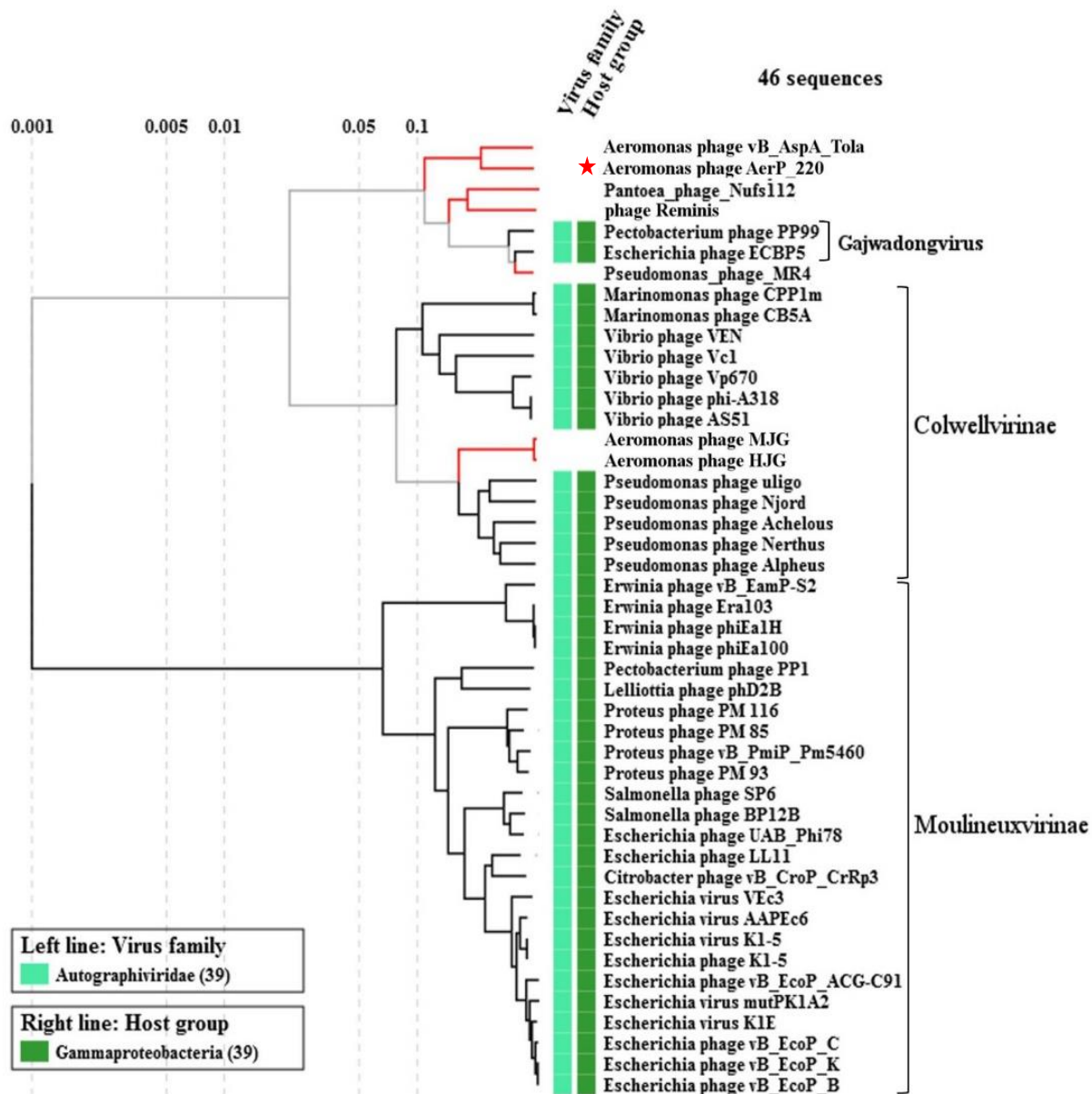


Рисунок 18. Сравнительный протеомный филогенетический анализ фага AerP_220 и подобных фагов, выполненный с помощью ViPTree. Исследуемый фаг AerP_220 отмечен красной звездочкой. Красные филогенетические ветви отмечают последовательности фагов, которые не были найдены в базе данных Virus-Host. Эти геномы были загружены из базы данных NCBI GenBank и добавлены в анализ вручную. *Morozova et al. 2022*

Описанный кластер был ближе к *Colwellvirinae* и *Mouligneuxvirinae*, чем к другим подсемействам порядка *Autographivirales*. Геномы других фагов

Aeromonas из порядка *Autographivirales*, включая MJG (MK455769) и HJG (MK455770) [271], имели очень низкую идентичность с геномом AerP_220 и не группировались с фагами AerP_220 и vB_AspA_Tola.

Для дальнейшего изучения таксономии фага AerP_220 была рассчитана матрица межгеномного сходства генома AerP_220 с шестью наиболее близкими геномами фага (фаг *Aeromonas* vB_AspA_Tola, фаг *Pectobacterium* PP99, фаг *Escherichia* ECBP5, фаг *Pseudomonas* MR4, фаг *Pantoea* Nufs112 и фаг *Ralstonia* Reminis) с использованием VIRIDIC (рис. 19). Попарное сходство геномов в большинстве случаев было ниже порогового значения (70% нуклеотидной идентичности для полной длины генома), установленного подкомитетом ICTV по бактериальным вирусам для создания родов фагов [272]. Исключением стали геномы трех фагов: фага *Pseudomonas* MR4, фага *Escherichia* ECBP5 и фага *Pectobacterium* PP99. Уровни идентичности подтвердили, что эти фаги принадлежат к одному и тому же роду, роду *Gajwadongvirus*. Межгеномное сходство геномов AerP_220 и vB_AspA_Tola, рассчитанное с использованием VIRIDIC (рис. 19), было близко к разграничению между родами фагов, но ниже 70%. Основываясь на этих фактах и на протеомном анализе с использованием ViPTree, исследуемый фаг Aer_220 образует новый род *Yinyavirus*.

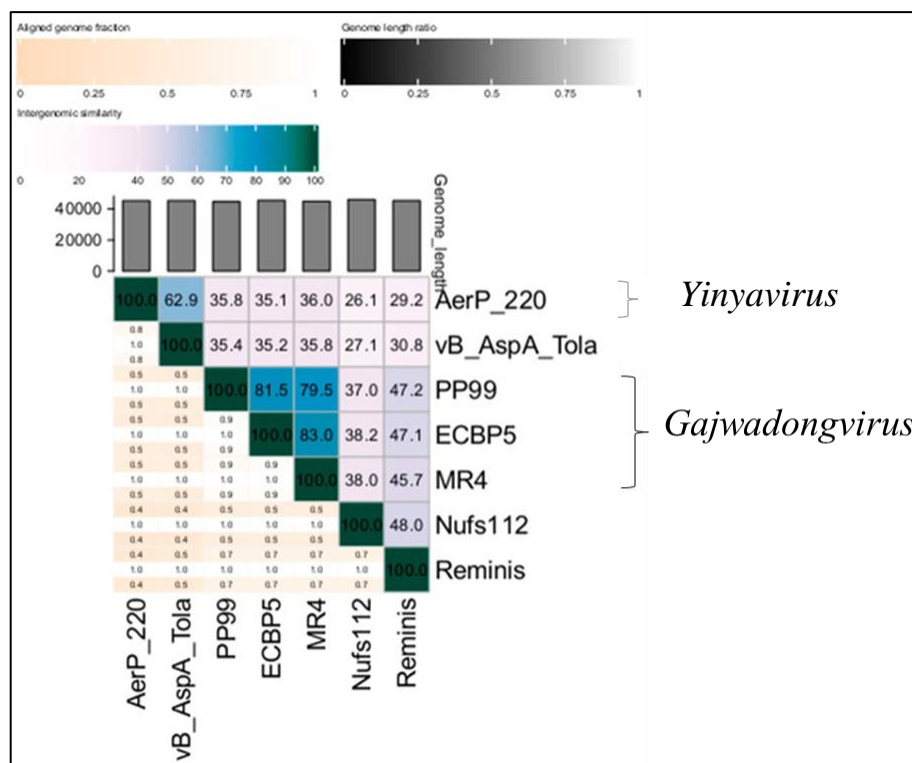


Рисунок 19. Матрица межгеномного сходства, определённая с помощью VIRIDIC для фагов *Aeromonas* AerP_220, *Aeromonas* vB_AspA_Tola (OM913599), *Pectobacterium* PP99 (NC047802), *Escherichia* ECBP5 (KJ749827), *Pseudomonas* MR4 (MT104467), *Pantoea* Nufs112 (OK570185) и *Ralstonia* Reminis (MN478376). Шкала цветового кодирования представлена над матрицей. *Morozova et al.* 2022

Филогенетический анализ продуктов, кодируемых консервативными генами (большая субъединица терминазы, ДНК-зависимая РНК-полимераза и основной белок капсида), был проведен с использованием их предсказанных аминокислотных последовательностей. Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Joining и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененных с использованием модели JTT, а затем выбора топологии с более высоким значением логарифмического правдоподобия. Идентичные последовательности были исключены из анализа, а также были исключены все позиции, содержащие пробелы и недостающие данные. Окончательный анализ включал в себя наиболее близкие 35 аминокислотных последовательностей. Филогенетический анализ последовательностей больших субъединиц терминазы показал, что белковые последовательности AerP_220 и vB_AspA_Tola образуют группу с хорошей поддержкой, и эта группа входит в кластер с соответствующими последовательностями фага *Pantoea* Nufs112, фага *Ralstonia* Reminis и трех представителей рода *Gajwadongvirus* (рис. 20А). Топология филогенетических деревьев последовательностей РНК-полимеразы и основных капсидных белков была сходной (рис. 20В, 20С). Эти филогенетические деревья соответствовали результатам протеомного анализа ViPTree. Предположительно, фаги AerP_220 и vB_AspA_Tola, род *Gajwadongvirus*, а также неклассифицированные фаги *Pantoea* Nufs112 и *Ralstonia* Reminis образуют новое предполагаемое подсемейство в составе порядка *Autographivirales*. Мы предлагаем назвать его *Tolavirinae*.

Чтобы проверить эту гипотезу, с помощью программного обеспечения ViPTree было рассчитано межгеномное сходство 46 геномов, включенных в протеомный филогенетический анализ (таблица 5). Сходство между фагами из предложенного подсемейства *Tolavirinae* было сопоставимо с таковыми внутри подсемейств *Colwellvirinae* и *Moulineuxvirinae* и было выше, чем сходство между этими подсемействами.

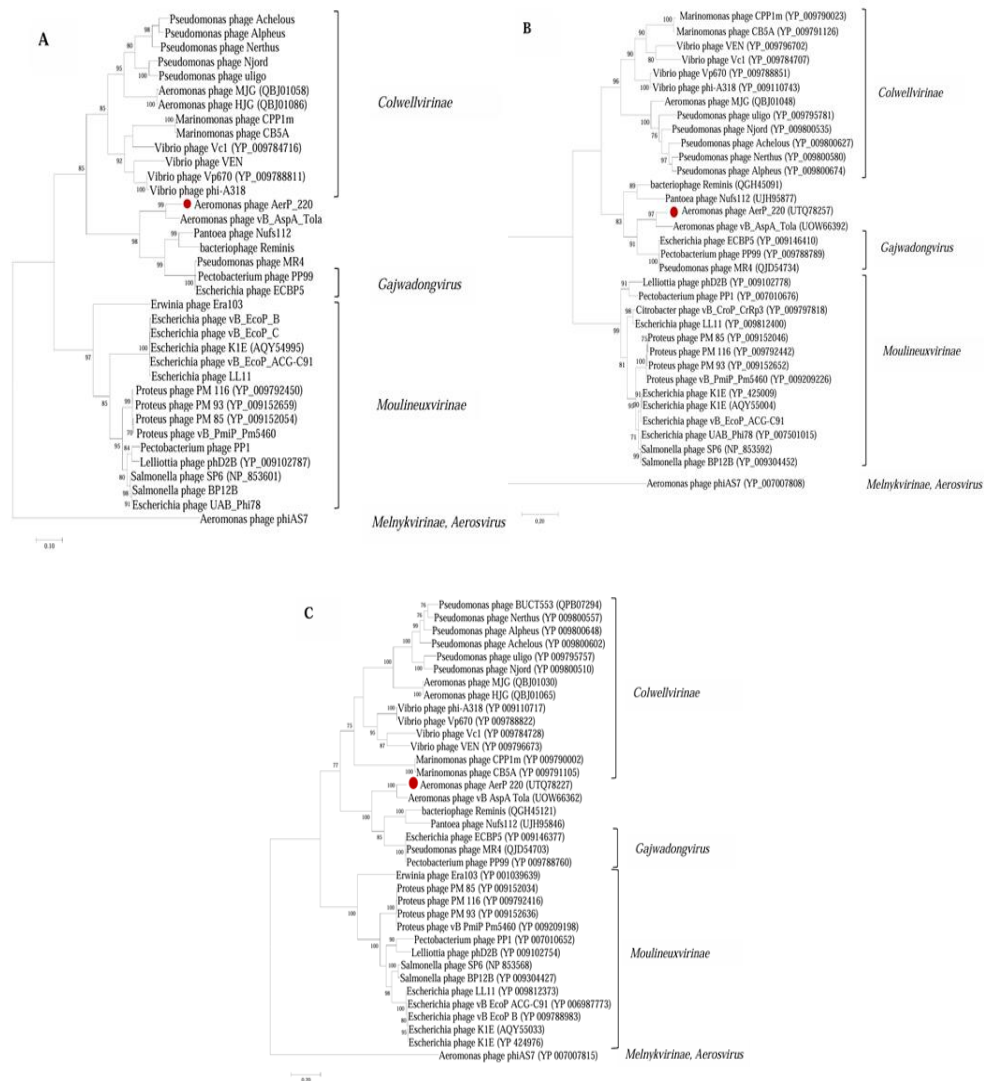


Рисунок 20. Филогенетический анализ трех консервативных белков изучаемого фага *Aeromonas AerP_220*, а также наиболее сходных белков: А) большая субъединица терминазы; В) белок капсида; С) ДНК-зависимая РНК-полимераза. Идентификаторы генного банка для белковых последовательностей приведены в круглых скобках. Для построения деревьев использовался метод максимального правдоподобия, с использованием bootstrap 1000. Статистическая поддержка выше 70% показана в узлах. Последовательности изученных белков фага *Aeromonas AerP_220* отмечены кружками. В качестве внешней группы использовали соответствующие белки фага *Aeromonas phiAS7*. *Morozova et al. 2022*

Таблица 5. Сходство геномов 46 фагов, включенных в филогенетический анализ

	Предложенное подсемейство <i>Tolavirinae</i> , n = 7	Подсемейство <i>Colwellvirinae</i> , n = 14	Подсемейство <i>Moulineuxvirinae</i> , n = 25
Предложенное подсемейство <i>Tolavirinae</i>	0.26 < S _G < 0.85	0.16 < S _G < 0.21	0.14 < S _G < 0.2

Подсемейство <i>Colwellvirinae</i>	$0.16 < S_G < 0.21$	$0.28 < S_G < 0.97$	$0.14 < S_G < 0.22$
Подсемейство <i>Moulineuxvirinae</i>	$0.14 < S_G < 0.2$	$0.14 < S_G < 0.22$	$0.3 < S_G < 0.7$

Кроме того, с помощью программного обеспечения vConTACT2 была построена сеть сходства на основе белков для фага AerP_220, а также для наиболее близких 46 фагов. Было выявлено пять кластеров; два из них содержали фаги из подсемейства *Colwellvirinae*, два кластера включали представителей подсемейства *Moulineuxvirinae*, и один кластер был образован фагами AerP_220, vB_AspA_Tola, PP99, ECBP5, MR4, Nufs112 и Reminis (рис. 21). Полученные данные подтвердили, что фаг AerP_220 и шесть вышеупомянутых фагов могут быть членами нового предполагаемого подсемейства *Tolavirinae*.

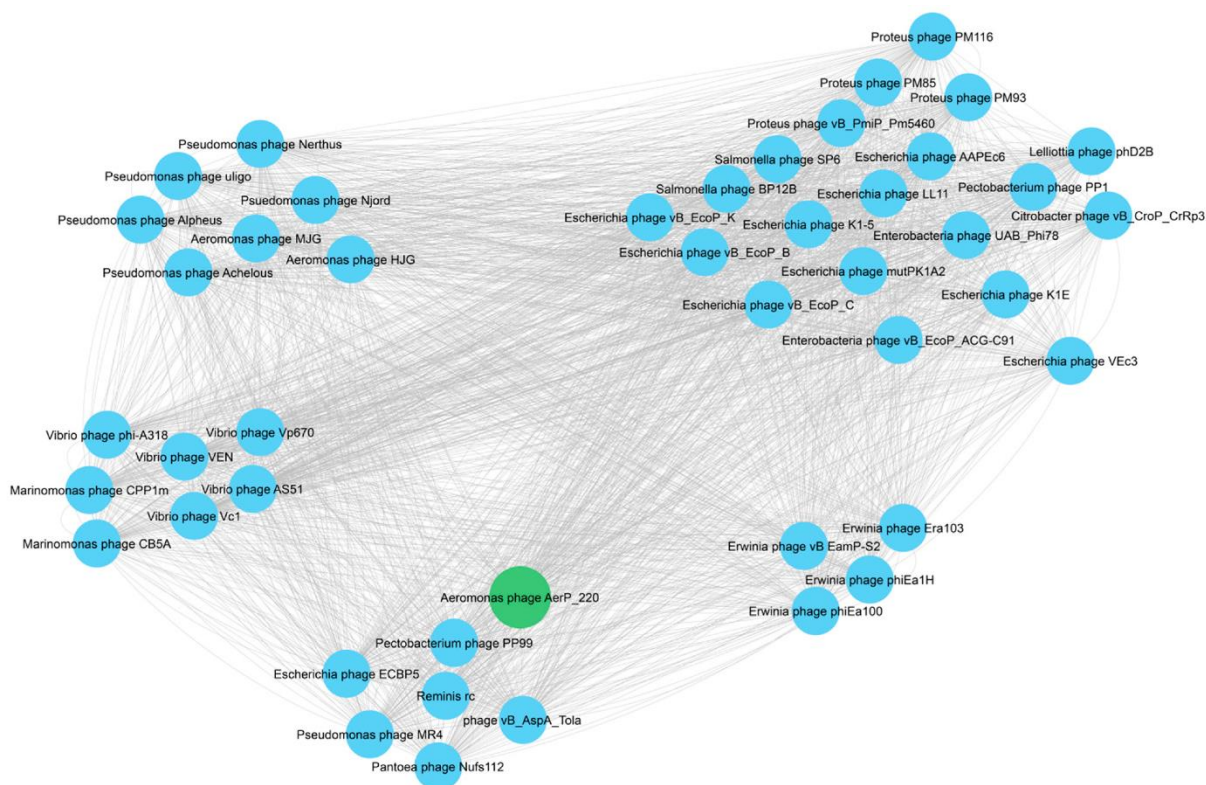


Рисунок 21. Анализ сходства фага AerP_220 с наиболее близкими к нему фагами, проведенный с использованием программы vConTACT2. Исследуемый фаг AerP_220 отмечен зелёным кружком. *Morozova et al. 2022*

Все фаги *Aeromonas*, доступные в базе данных GenBank, относятся к различным таксономическим группам отряда *Caudoviricetes*. Геномика и биология миофагов *Aeromonas* были описаны ранее в обзорах [273,274]. Недавно был описан ряд новых фагов *Aeromonas* с подовирусным морфотипом, и их

геномы появились в базе данных NCBI GenBank [270,275–279]. Чтобы оценить взаимосвязь между исследуемым фагом AerP_220 и другими фагами *Aeromonas*, был проведен анализ vConTACT2 для всех геномов фагов *Aeromonas*, депонированных в базе данных GenBank (рис. 22). Большинство доступных фагов *Aeromonas* являются миофагами. Всего было идентифицировано 16 независимых кластеров (групп фагов или отдельных фагов). Из них четыре кластера содержали фаги с морфотипом подовируса; семь и четыре кластера были образованы фагами с морфотипами миовируса и сифовируса соответственно. Кроме того, один неожиданный гетерогенный кластер состоял из двух подкластеров с миофагами и подофагами: представителей семейства *Straboviridae* (морфотип миовируса) и рода *Lahexavirus* (морфотип подовируса), отдельно стоящего рода в последнем выпуске таксономии фагов. Из 33 фагов *Aeromonas* с подовирусным морфотипом, 28 принадлежали к порядку *Autographivirales* и образовали четыре кластера (рис. 22). Два кластера состояли из представителей подсемейств *Melnykvirinae* ($n = 17$) и *Studiervirinae* ($n = 4$). Третий кластер составили фаги *Aeromonas* PS, Volek и Lolek. Еще один кластер содержал фаги *Aeromonas* HJG и MJG, которые предположительно принадлежат к подсемейству *Colwellvirinae*, и фаги AerP_220 и vB_AspA_Tola, члены предполагаемого подсемейства *Tolavirinae* (рис. 22).

Тот факт, что многие фаги *Aeromonas* образуют независимые группы, за исключением миофагов из семейства *Straboviridae* и подофагов из подсемейства *Melnykvirinae*, указывает на то, что, несмотря на заражение фагами бактерий из одного и того же рода, эти фаги демонстрируют значительное геномное разнообразие. Одной из возможных причин генетического разнообразия подовирусных фагов *Aeromonas* является узкий круг хозяев, присущий большинству из них. Эта особенность приводит к дивергенции геномов у фагов, которые инфицируют только один или два штамма бактерий за счёт накопления мутаций для приспособления к определённому хозяину. Полученные данные хорошо согласуются с предыдущими результатами глобального анализа представителей порядка *Autographivirales* [270].

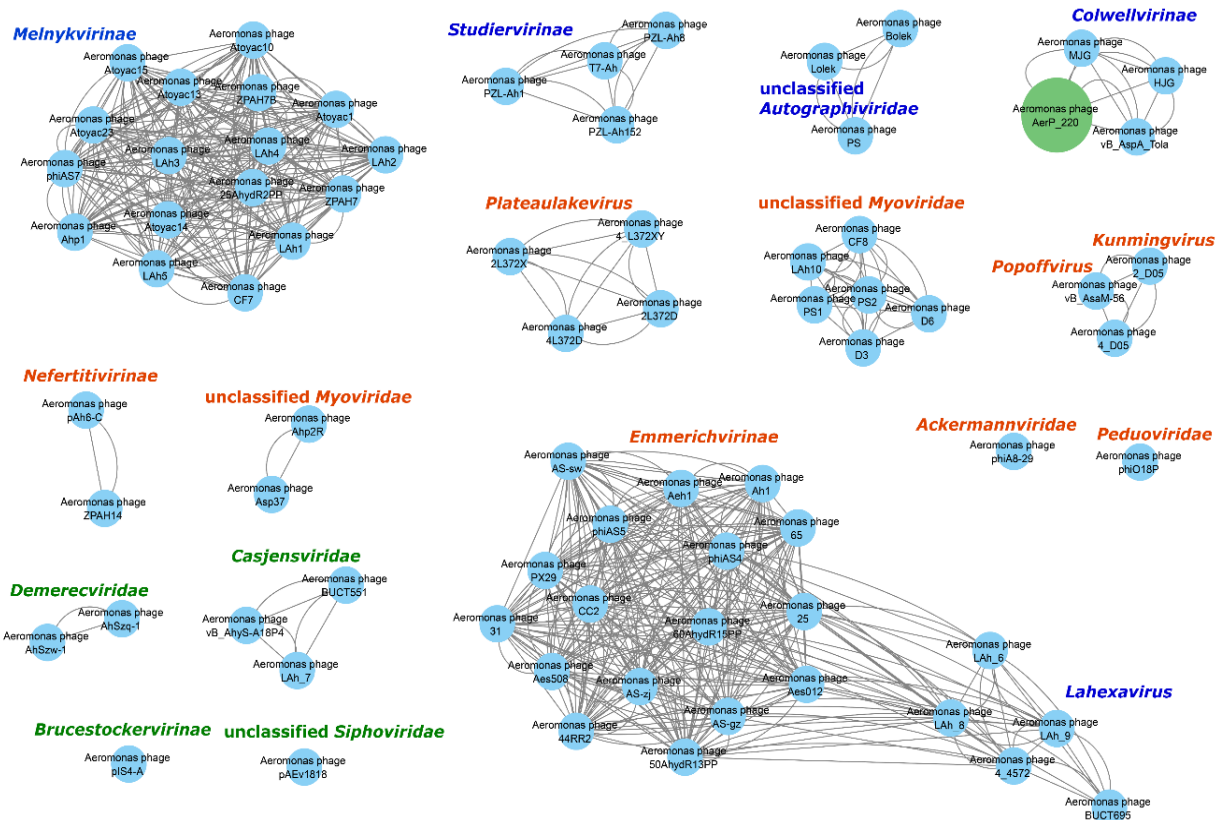


Рисунок 22. Сеть сходства фага AerP_220 с другими фагами *Aeromonas* spp., основанная на белках, доступных в базе данных GenBank (дата обращения: 15 июня 2022 г.). Для анализа использовалось программное обеспечение vConTACT2. Исследуемый фаг AerP_220 отмечен зелёным кружком. Таксономические группы фагов, подписанные надписями синего цвета, относятся к подовирусному морфотипу, отмеченные красным – к миовирусному морфотипу, а отмеченные зелёным – к сифовирусному морфотипу. *Morozova et al.* 2022

Таким образом, фаг AerP_220 является подофагом с высокой литической активностью. Анализ генома показал, что он является представителем нового рода *Yinyavirus* и нового подсемейства *Tolavirinae*.

3.1.4. Характеристика фага *S. maltophilia* StM171

Фаг StM171 был выделен из больничных сточных вод с использованием штамма-хозяина *S. maltophilia* КЭМТК 2355. Бляшки, образованные StM171 на двухслойном агаре, были прозрачными, диаметром ~0,5 мм (рис. 23А). Просвечивающая электронная микроскопия показала, что StM171 имеет удлиненный капсид (47,3 нм ± 0,1 нм × 45,7 нм ± 2 нм) и гибкий несокращающийся хвост (~170 нм), соответственно, фаг StM171 является сифовирусом (рис. 23Б).

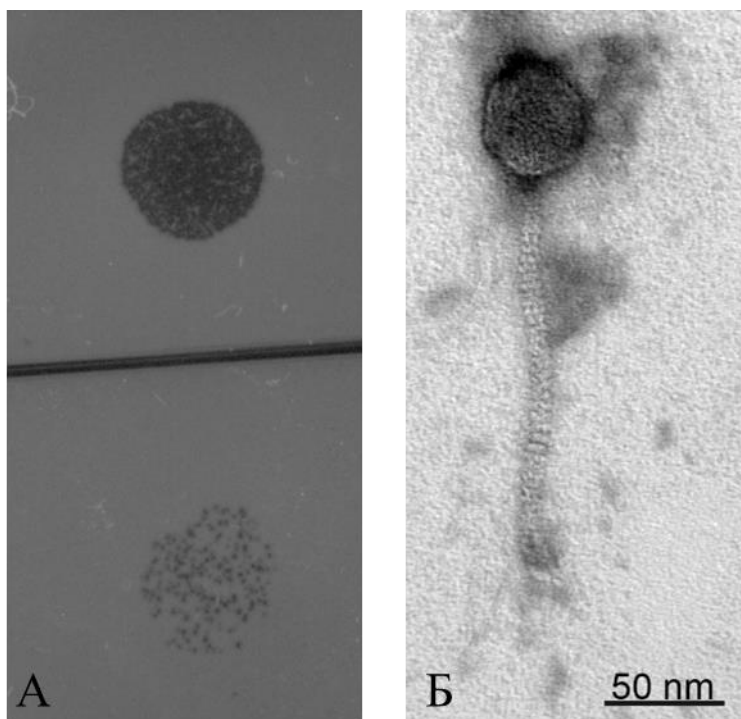


Рисунок 23. Морфологические свойства фага StM171. А: Фотография бляшек, образованных фагом StM171 на газоне штамма-хозяина *S. maltophilia* КЭМТК 2355. Б: Электронная микрофотография частицы фага StM171, негативное контрастирование 1%-ным раствором уранилацетата.

Эксперимент по кинетике лизиса клеточной культуры показал, что StM171 обладает слабой литической активностью, вызывая максимальное снижение титра клеток менее чем на порядок после длительной инкубации (рис. 24А). Средний размер выхода фагового потомства StM171 был рассчитан как отношение конечного количества высвобожденных фаговых частиц к первоначальному количеству инфицированных бактериальных клеток, и он составил приблизительно 12 БОЕ на зараженную клетку. Латентный период при заражении штамма-хозяина *S. maltophilia* КЭМТК 2355 составил ~130 мин (рис. 24Б).

Хозяинский спектр фага StM171 был протестирован на 10 штаммах *S. maltophilia* и 74 штаммах *P. aeruginosa* из КЭМТК ИХБФМ СО РАН с использованием метода двухслойного агара. Фаг StM171 образовывал прозрачные бляшки на пяти штаммах (*S. maltophilia* КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670) и не был инфекционным для протестированных штаммов *P. aeruginosa*.

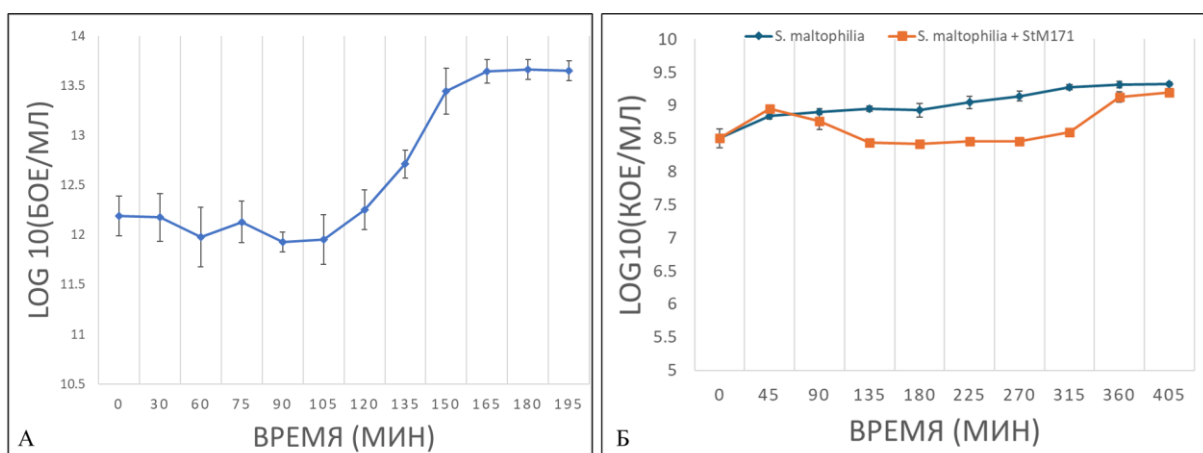


Рисунок 24. Биологические характеристики StM171 против *S. maltophilia* КЭМТК 2355. А) одноступенчатая кривая роста StM171 на штамме-хозяине *S. maltophilia* КЭМТК 2355. Б) кинетика лизиса, при которой бактериальная культура, инкубированная с фагом StM171 (*S. maltophilia* + StM171), сравнивалась с неинфицированной бактериальной культурой (*S. maltophilia*).

Геном StM171 представляет собой дсДНК, состоящую из 44512 п.н.; он содержит 59 предполагаемых ORF (рис. 25). Среди них, 35 ORF кодируют продукты с известными функциями, в то время как другие 24 ORF кодируют гипотетические белки, которые не демонстрировали гомологии с другими охарактеризованными последовательностями. Содержание GC в геноме StM171 составляет 67,32%, что близко к показателям чувствительных штаммов *S. maltophilia* (66.45%, 66.37%, 66.52%, 66.55%, и 66,3% для штаммов *S. maltophilia* КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670, соответственно).

Геном StM171 включает гены, кодирующие белки, ответственные за метаболизм, упаковку, лизис клеток и структурные белки. Гены, кодирующие ДНК- или РНК-полимеразы, не были обнаружены в геноме StM171; по-видимому, этот фаг использует полимеразы бактериального хозяина. Не было обнаружено никаких известных генов (например, интегразы или транспозазы), отвечающих за умеренный образ жизни. Геном фага StM171 был внесен в базу данных NCBI GenBank под регистрационным номером MZ611865.

Сравнительный анализ генома StM171 с геномами других фагов показал наибольшее сходство с двумя фагами, а именно с фагом *Stenotrophomonas Suso* и

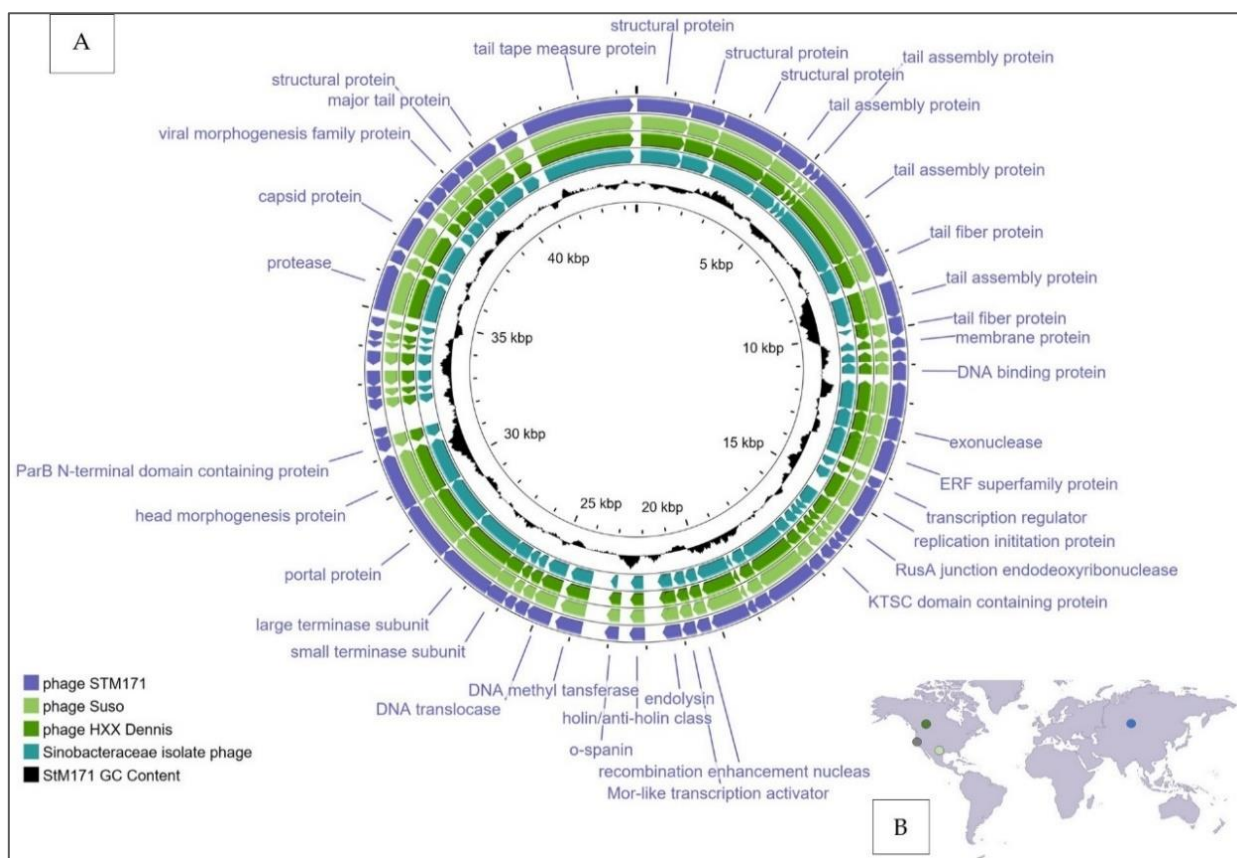


Рисунок 25. Геном фага StM171 в сравнении с геномами фагов с наибольшей нуклеотидной идентичностью - фага *Stenotrophomonas Suso* (MZ326866), фага *Xanthomonas HXX_Dennis* (ON711490) и изолята метагенома сточных вод (SSEB01000020.1); диаграмма была построена с использованием Proksee server (A). Карта, составленная с использованием Canva, на которой изображены места выделения вышеуказанных фагов: Новосибирск, Россия (StM171); Остин, США (Suso); Эдмонтон, Канада (HXX_Dennis); Калифорния, США (изоляция метагенома сточных вод) (B). *Ideed et al. 2023*

фагом *Xanthomonas HXX_Dennis* (регистрационные номера в GenBank MZ326866 и ON711490 соответственно). StM171 имеет высокий уровень нуклеотидной идентичности с фагами Suso и HXX_Dennis (95,03% и 95,47% соответственно), что делает эти три фага представителями одного вида. Примечательно, что эти три фага были изолированы в трех разных странах: США, Канада и Россия. Кроме того, собранный с помощью NGS фаговой геном в составе кишечного метагенома (регистрационный номер GenBank SSEB01000020) из Калифорнии, США, также показал NI >95% фагу StM171 (рис. 25).

Согласно анализу ViPTree, StM171 находится на отдельной ветви с фагами Suso и HXX_Dennis (рис. 26). Эта ветвь является частью клады, образованной несколькими фагами *Gordonia* spp. и *Rhodococcus* spp. из родов *Phrappuccinovirus*,

Skogvirus и *Puppervirus*, и, в свою очередь, входит большую группу фагов *Mycobacterium*, принадлежащих к подсемейству *Bclavirinae*.

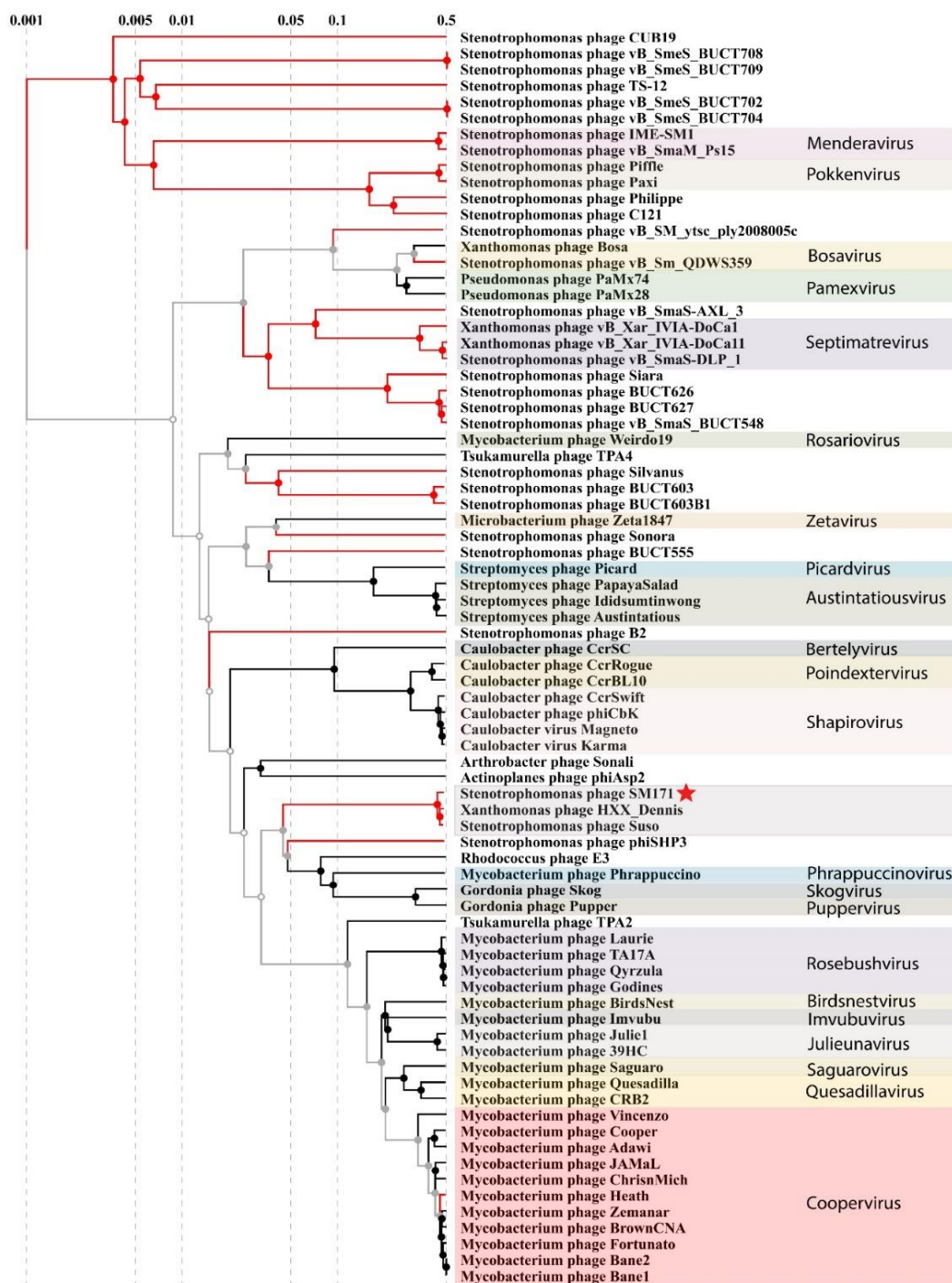


Рисунок 26. Филогенетический анализ выполнен с помощью сервера ViPTree. Красные ветви обозначают последовательности фагов, загруженные из базы данных NCBI GenBank и добавленные в анализ вручную. Изученный фог StM171 отмечен красной звездочкой. *Ideed et al. 2023*

Филогенетический анализ нескольких белков StM171 (большая субъединица терминазы, белок хвостовой рулетки, белок капсида и белок

хвостовых волокон) и ближайших аналогов из других фагов показал, что перечень фагов, обладающих белками, сходными с белками StM171, радикально отличается от фагов, которые были выявлены программой ViPTree (рис. 27). Однако белки StM171 по-прежнему образуют ветви с высокой степенью поддержки с соответствующими последовательностями из фага *Stenotrophomonas Suso* и фага *Xanthomonas HXX_Dennis*.

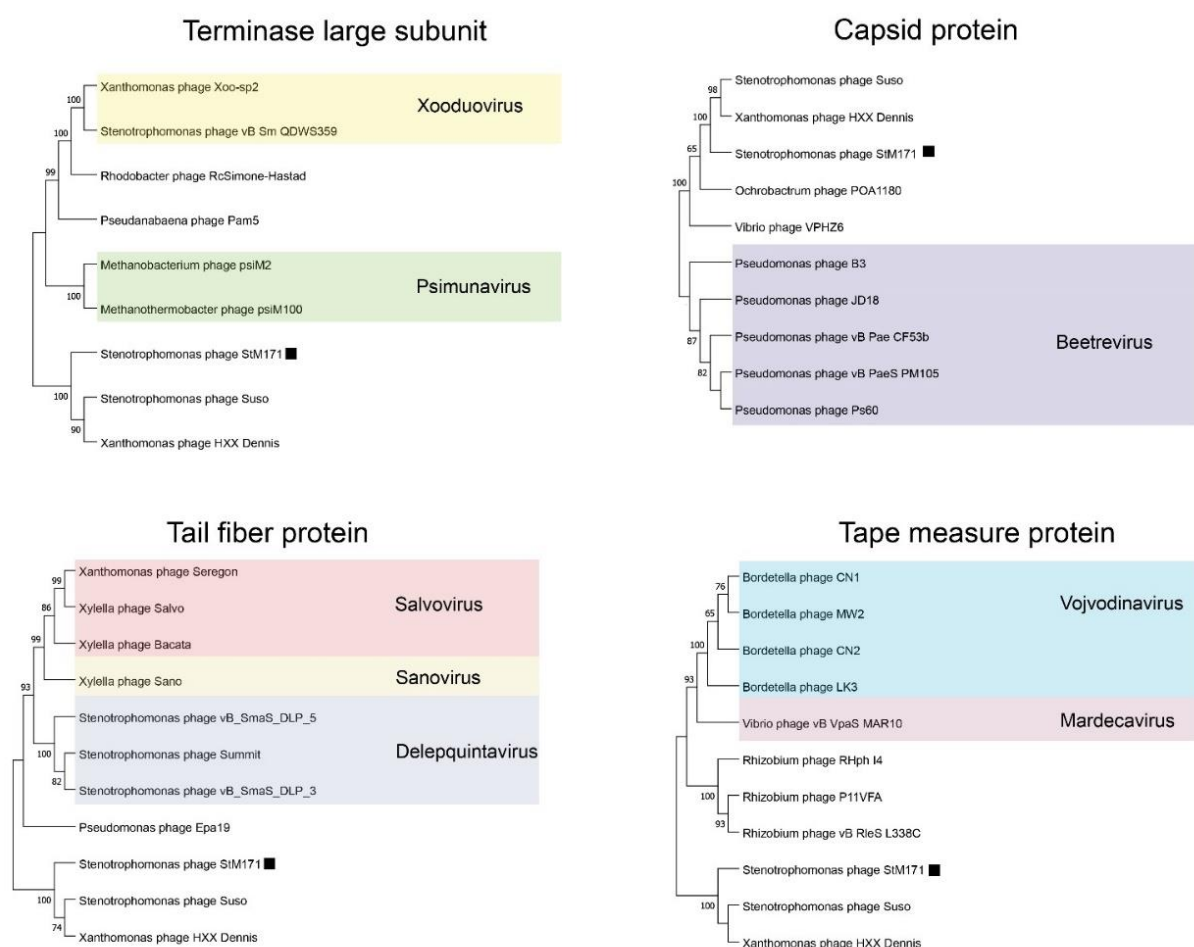


Рисунок 27. Филогенетические деревья, созданные с использованием оценки максимального правдоподобия с использованием bootstrap 1000 из выровненных последовательностей белков StM171 и близких аналогов из других фагов. Близкие последовательности были выявлены в базе данных GenBank с помощью BLASTX и выровнены с использованием алгоритма MUSCLE. Филогенетический анализ был выполнен в программе MEGA 11. Последовательности изучаемого фага StM171 на рисунках отмечены черными квадратами. *Ideed et al. 2023*

Дополнительно геном StM171 был analyzed программой VConTACT2. Визуализация созданных кластеров фагов с помощью программы Cytoscape показала, что фаг StM171 не принадлежит ни к одному известному роду, хотя и сгруппирован с фагами Suso и HXX_Dennis (рис. 28).

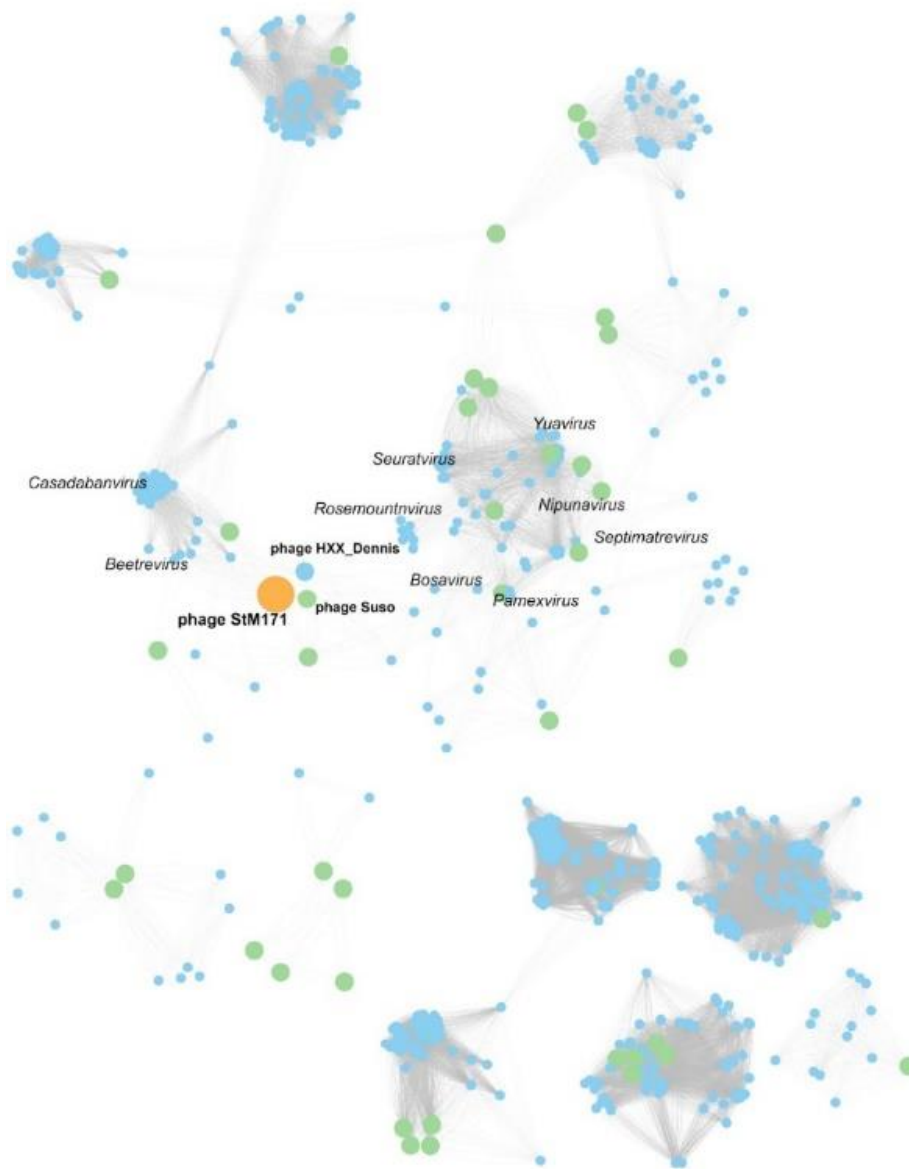


Рисунок 28. Кластерный анализ белков фага StM171 и других фагов. Визуализацию проводили с помощью программного обеспечения Cytoscape на основе расчетов VConTACT2. Узлы указывают на геномы фагов, а ребра между каждыми двумя узлами указывают на их статистически взвешенные попарные сходства. Длина ребра пропорциональна значениям сходства, оцененным с помощью гипергеометрического уравнения. Узлы окрашены следующим образом: фаг StM171 — оранжевый; фаги *Stenotrophomonas* — зеленый; другие фаги — синий. *Jdeed et al. 2023*

Фаги, показавшие наибольшее сходство, принадлежали к следующим родам: *Beetrevirus*, *Casadabanvirus*, *Rosemountvirus*, *Yuavirus*, *Pamexvirus*, *Nipunavirus*, *Seuratvirus*, *Septimatrevirus* и *Amoovirus*, которые содержат в основном фаги *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.* и в меньшей степени, *Salmonella spp.*, *Achromobacter spp.* и *E. coli*.

Таким образом согласно проведенному анализу, мы предполагаем, что StM171 принадлежит к новому виду в отряде *Caudoviricetes*, наряду с фагом *Stenotrophomonas Suso* и фагом *Xanthomonas HXX_Dennis*. Предполагаемое название этого вида – *Nordvirus*, поскольку все входящие в него фаги были обнаружены в Северном полушарии (рис. 25).

Изученные фаги демонстрировали уникальные геномные и таксономические особенности. Фаг EC151, первый фаг *Enterobacter*, обладающий полным путем синтеза preQ0 а фаг EC152 кодирует путь восстановления NAD⁺, этот путь первоначально был обнаружен в бактериях и недавно был выявлен в редких случаях в фагах [265,280,281], что изменило понимание научным сообществом метаболической зависимости фагов от бактерий. Стоит отметить, что хотя эти два фага, EC151 и EC152, демонстрируют различные механизмы противодействия бактериальным антифаговым защитным системам, возможно, что эти контрмеры влекут за собой компромиссы в приспособленности, уменьшая способность фагов к заражению в обмен на сохранение их способности заражать бактерии, однако мы не смогли найти в литературе исследований, посвященных этому конкретному компромиссу.

Хотя прямые исследования компромиссов в кодируемых фагами метаболических генах отсутствуют, исследования по уменьшению генома фагов предполагают, что наличие дополнительных генов влечет за собой издержки репликации [282]. Например, делеционные мутанты фага T7 превосходят дикий тип в богатых средах [283], что подразумевает, что несущественные гены снижают приспособленность. В соответствии с этой гипотезой, EC151 и EC152 продемонстрировали низкий выход фагового потомства, несмотря на их сложные средства контрзащиты.

Низкая литическая способность фага StM171 может быть связана с отсутствием у него ДНК- и РНК-полимераз, что обуславливает необходимость использования ферментов хозяина. Фаги, обладающие собственными метаболическими путями, демонстрируют большую адаптивность к своим бактериальным хозяевам [284], тогда как зависимые от хозяина фаги, такие как StM171, ограничены транскрипционной средой инфицированной клетки. Это может объяснить, почему StM171 достиг, казалось бы, эволюционного тупика: его

геном высококонсервативен на разных континентах, что предполагает, что большинство мутаций являются вредными. Высокая нуклеотидная идентичность (>95%) между StM171, Suso, HXX_Dennis и геномом, собранным из метагенома Калифорнии, предполагает либо очень недавнее распространение, либо сильный отбор. Тот факт, что эти фаги не имеют собственных полимераз и, следовательно, полагаются на высокоточные ферменты хозяина, может способствовать их геномной стабильности. Фаги, обладающие высокой степенью нуклеотидной идентичности и выделенные из разных источников, редко описываются в литературе. Аналогичные наблюдения за фагами *Flavobacterium* подтверждают эту гипотезу. 63 литических фага *Flavobacterium columnare*, выделенных из разных рыбоводных хозяйств Швеции и Финляндии в разные годы, показали нуклеотидную идентичность около 95%, как и в случае с нашим фагом, в аннотации геномов этих фагов не было обнаружено ДНК- или РНК-полимераз [285]. Кроме того, 16 фагов *Vibrio*, выделенных из морских бактерий с побережья Европы и Южной Америки, были очень похожи, важно отметить, что эти фаги были умеренными, кодировали собственную ДНК-зависимую РНК-полимеразу, но их нуклеотидная идентичность составляла 84-93% [286].

Получение слаболитических фагов из природных источников, распространенная ситуация, затрудняющая фаготерапию. Однако мы воспользовались этой возможностью, чтобы изучить возможность использования или усиления обнаруженных нами слаболитических фагов. Фаги могут быть богатым источником контрмеханизмов против систем защиты от фагов; фаги, такие как EC151 и EC152, теоретически могут быть использованы в качестве источников для усиления других высоколитических фагов с их путем синтеза преQ0 и путем реутилизации NAD⁺. Ранее уже проводилось конструирование фагов с использованием элементов других фагов. Например, в одном исследовании анти-Tmpn белок был обнаружен в фаге *E. coli* ΦSMS22 и клонирован в чувствительный к Tmpn фаг ΦKSS9, что позволило избежать бактериального иммунитета [287]. Эта генетическая инженерия выходила за рамки нашего исследования, и мы сосредоточились на доступных методах, которые могут быть быстро применены клиницистами в случаях, когда высоколитические фаги не обнаружены.

3.2. Влияние слаболитического StM171 на действие антибиотиков против разных штаммов *S. maltophilia*

3.2.1. Изучение совместного действия антибиотиков и фага *S. maltophilia* StM171 на бактериальные клетки

Зачастую фаги и антибиотики применяют совместно, поскольку ожидается, что два варианта селективного давления на инфекционный агент с помощью разных механизмов могут оказаться более эффективными, чем любой из них по отдельности [43]. Однако, взаимодействие между фагами и антибиотиками могут быть не только синергическими или аддитивными, но и антагонистическими. Поскольку одним из факторов вирулентности инфекционного агента является его способность формировать биопленки, в работе исследовали влияние фага StM171 и антибиотиков по отдельности и совместно на биопленкообразование.

На первом этапе была протестирована способность пяти чувствительных к фагу StM171 штаммов *S. maltophilia* (КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670) образовывать биоплёнки, и было показано, что все они способны формировать биопленки. В зависимости от места выделения эти пять штаммов были разделены на две группы: группа А была выделена из клинического образца (КЭМТК 2142) и из больничных сточных вод (КЭМТК 2355); группа В из личинок комаров *Aedes aegypti* (три остальных штамма КЭМТК 3659, 3664 и 3670)-

Затем была исследована способность StM171 ингибировать образование биопленок, сформированных фагочувствительными штаммами, без воздействия антибиотиков. Анализ результатов показал, что фаг StM171 оказывал статистически значимое влияние на биопленкообразование только у двух штаммов из пяти: у *S. maltophilia* КЭМТК 2142 он снижал образование биопленок на 17% ($p < 0,05$ в двухфакторном дисперсионном анализе), тогда как у *S. maltophilia* КЭМТК 3670, напротив, способствовал образованию биопленок на 49% ($p < 0,05$ по сравнению с контролем). На три других штамма (*S. maltophilia* КЭМТК 2355, 3659 и 3664) фаг не оказывал статистически значимого влияния (рис. 29).

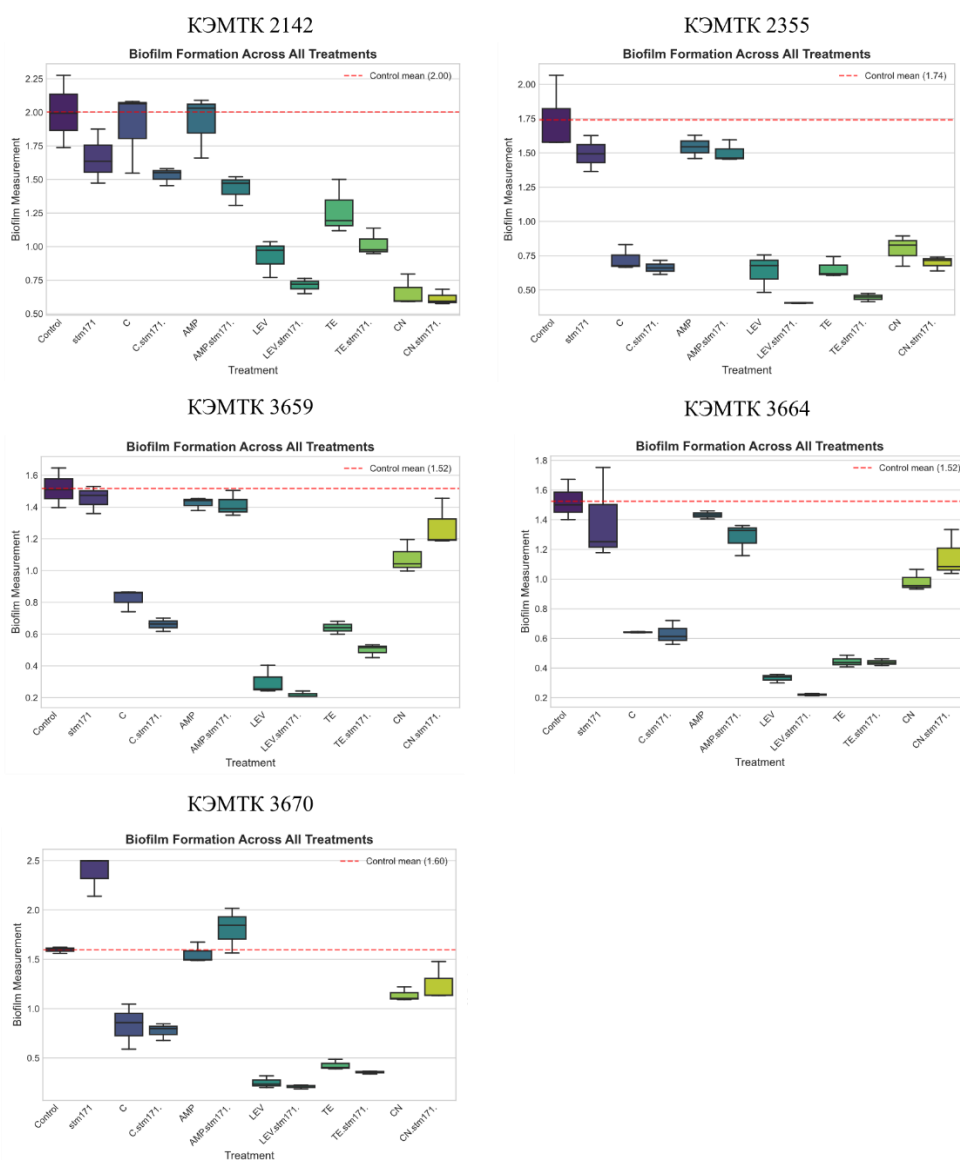


Рисунок 29. Эффекты совместного применения фага StM171 (МОИ 0,1) и различных антибиотиков на образование биопленок пятью различными штаммами *S. maltophilia*. Сокращения: Control - интактная культура клеток, C - хлорамфеникол, AMP - ампициллин, LEV - левофлоксацин, TE - тетрациклин, CN – гентамицин.

На следующем этапе проанализировали действие пяти антибиотиков (хлорамфеникол, ампициллин, левофлоксацин, тетрациклин и гентамицин) на формирование биопленок без бактериофага. Оказалось, что при использовании антибиотиков в концентрации 40% от их минимальной ингибирующей концентрации большинство антибиотиков, за исключением ампициллина, демонстрировали значительный ингибирующий эффект, однако их эффективность варьировала в зависимости от штамма *S. maltophilia*. Наиболее эффективными в снижении биопленкообразования оказались левофлоксацин,

хлорамфеникол и тетрациклин (снижение образования биопленок 50-80%, $p < 0,05$), тогда как гентамицин показал меньшую эффективность для группы Б (снижение образования биопленок $\sim 30\%$, $p < 0,05$). Надо отметить, что хлорамфеникол не снижал образование биопленок у *S. maltophilia* КЭМТК 2142.

При сочетании исследуемых антибиотиков с фагом StM171 эффект был разнонаправленным и штаммоспецифичным. В целом, статистический анализ показал, что добавление фага оказывало значимое влияние ($p < 0,05$) только для штаммов группы А (2142 и 2355), тогда как для штаммов группы В (3659, 3664, 3670) влияние фага не было статистически значимым. Однако, при анализе отдельных пар антибиотик-фаг были выявлены специфические взаимодействия: только в случае тетрациклина для штамма КЭМТК 2355 ($p=0,023$) и левофлоксацина для штамма КЭМТК 3664 ($p=0,035$) фаг StM171 статистически значимо усиливал их ингибирующее действие на образование биопленки. Интересно отметить, что в нескольких случаях наблюдалась тенденция к ослаблению действия антибиотика при добавлении фага, особенно для гентамицина в случае штаммов группы В, хотя эти различия не достигали статистической значимости (рис. 29).

Наилучшие результаты по снижению биопленкообразования были достигнуты разными комбинациями для разных штаммов: для КЭМТК 2142 - гентамицин+фаг (69% снижения), для КЭМТК 2355, 3659, 3664 и 3670 - левофлоксацин+фаг (76-86% снижения).

Таким образом, совместное применение фагов и антибиотиков против бактериальной инфекции в нашем исследовании привело к разнонаправленному и штаммоспецифичному эффекту. В большинстве исследованных нами вариантов совместное действие фагов и антибиотиков не показало статистически значимого синергизма, однако в отдельных комбинациях наблюдалось его значительное усиление. В то же время фаг может не влиять или даже ослаблять ингибирующее действие того или иного антибиотика, и это необходимо учитывать при клиническом применении фагов, проводя предварительное тестирование каждого конкретного штамма с различными комбинациями антибиотиков и фагов.

3.2.2. Изменения чувствительности к антибиотикам у клонов *S. maltophilia*, развивших резистентность к StM171

Совместное инкубирование штаммов-хозяев *S. maltophilia* с фагом StM171 привело к появлению клонов бактериальных мутантов, нечувствительных к StM171 (Bacterial-insensitive mutant, BIM). Устойчивость к фагу у этих клонов сохранялась как минимум после трёх пассажей. Этот эффект наблюдался для всех пяти штаммов-хозяев StM171, *S. maltophilia* КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670. Отсутствие ДНК фага StM171 в клетках пяти клонов BIM, соответствующих штаммам-хозяевам, проверяли методом ПЦР с использованием двух пар праймеров, специфичных к разным регионам фагового генома.

BIM были протестированы на устойчивость к 13 антибиотикам и сравнены с их фагочувствительными предками. Статистический анализ (парный t-тест) показал, что штаммы группы В, резистентные к StM171, статистически значимо ($p < 0.05$) увеличили чувствительность к пенициллиновым антибиотикам: ампициллину (диапазон прироста зоны ингибирования составлял 0.93-1.3 см), ампициллин-сульбактаму (1.17-1.43 см) и амоксициллину (0.17-0.53 см). Для цефалоспоринов также наблюдалось значимое увеличение чувствительности: к цефепиму (1.5-1.87 см) и цефтазидиму (0.87-1.6 см) (рис. 30).

Напротив, эти штаммы приобрели устойчивость к эритромицину (среднее уменьшение зоны ингибирования 0.53-0.93 см, $p < 0.05$). Штамм *S. maltophilia* КЭМТК 2142, резистентный к StM171, показал разнонаправленные изменения: увеличение устойчивости к цефтазидиму (уменьшение зоны на 0.9 см, $p = 0.004$) при одновременном повышении чувствительности к фторхинолонам (ципрофлоксацин: +1.47 см, $p = 0.007$; левофлоксацин: +0.93 см, $p = 0.005$) и тетрациклину (+0.87 см, $p = 0.001$).

Устойчивость изученных штаммов *S. maltophilia* к триметоприму/сульфаметоксазолу оставалась независимой от устойчивости к StM171 ($p > 0.05$). Чувствительность к остальным исследованным антибиотикам (кроме указанных выше) статистически значимо не изменилась (рис. 30).

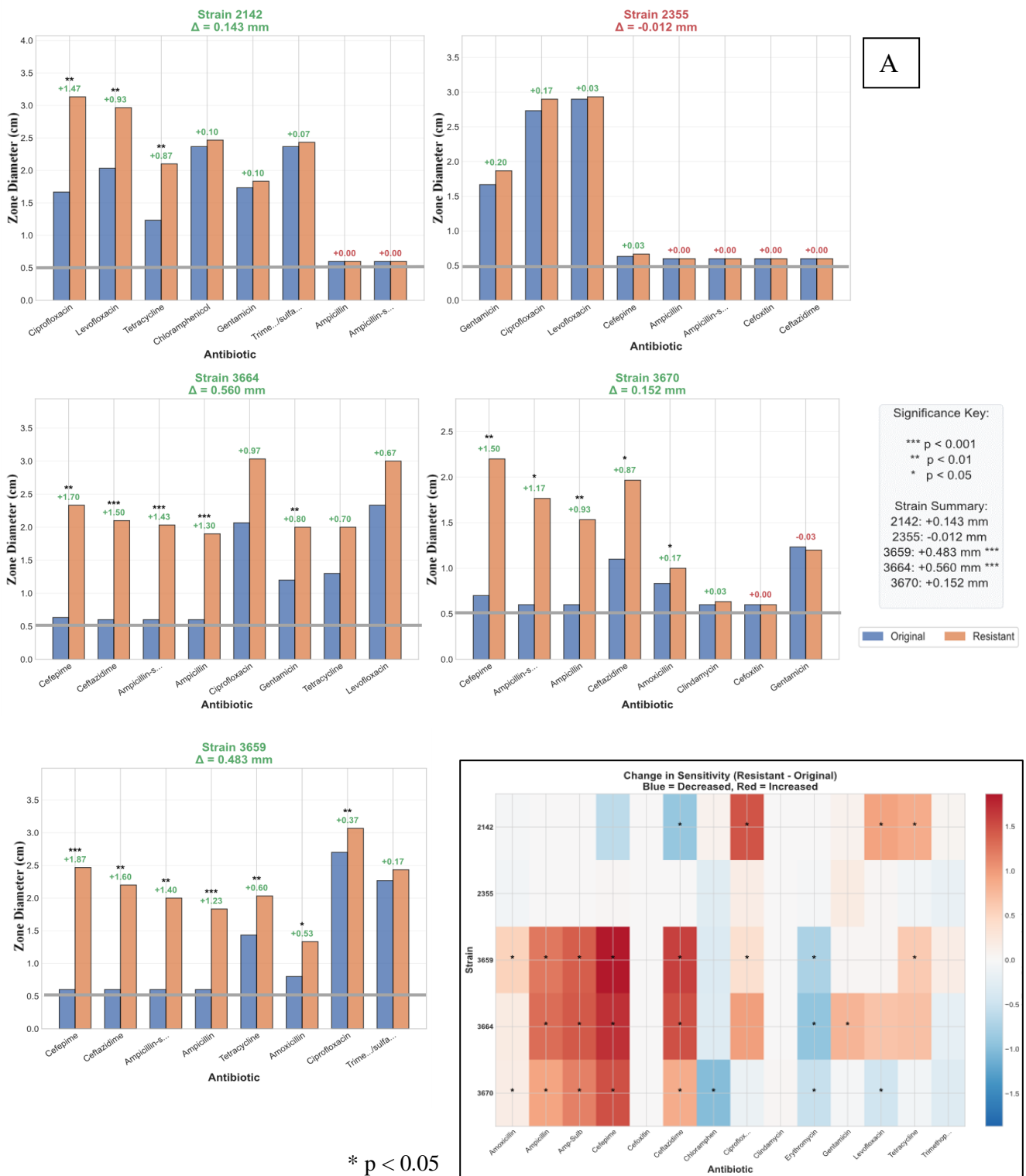


Рисунок 30. Изменение чувствительности к антибиотикам 5 штаммов *S. maltophilia*. А) Применение антибиотиков в диско-диффузионном анализе к бактериальным штаммам до и после развития у них резистентности к фагу StM171, представление наиболее значимых изменений для каждого штамма. Горизонтальная линия представляет собой пороговое значение, определяемое на основе диаметра, полученного в диско-диффузионном анализе, выше которого штамм считается чувствительным к антибиотику. Синим цветом обозначены исходные штаммы, чувствительные к фагам, красным — клоны, устойчивые к

фагам (ВІМ). Б) Тепловая карта для всех 14 протестированных антибиотиков. Синим цветом обозначено снижение чувствительности к антибиотикам после того, как штамм приобрел устойчивость к фагу, а красным — повышение чувствительности. На оси X антибиотики расположены слева направо: амоксициллин, ампициллин, ампициллин-сульбактам, цефепим, цефокситин, цефтазидим, хлорамфеникол, ципрофлоксацин, клиндамицин, эритромицин, гентамицин, левофлоксацин, тетрациклин и триметоприм/сульфаметоксазол.

Таким образом, фаг StM171 можно использовать для модуляции антибиотикорезистентности у нескольких штаммов *S. maltophilia*. В то время как фагорезистентные штаммы из группы А, выделенные из клинических источников, не приобрели чувствительность к бета-лактамам, штаммы группы В из окружающей среды приобрели чувствительность к пяти различным бета-лактамам. Одно из возможных объяснений этого расхождения заключается в том, что мутации, полученные штаммами группы В для развития устойчивости к фагу StM171, могут нарушать работу эффлюксных насосов или проницаемость мембраны и увеличивать внутриклеточные концентрации антибиотиков для преодоления устойчивости к бета-лактамам. Подобное повышение чувствительности к антибиотикам после развития резистентности к фагам было ранее задокументировано у *Acinetobacter baumannii*, эти бактерии защищают себя от бета-лактамовых антибиотиков с помощью капсульного полисахарида, который также является мишенью для фагов øFG02 и øCO01; развитие устойчивости к этим фагам привело к восстановлению чувствительности к бета-лактамовым антибиотикам [288]. Другой пример, у *P. aeruginosa*; в одном случае фаг ОМКО1 использовал порин внешней мембраны М (OprM) многолекарственных эффлюксных систем MexAB и MexXY в качестве сайта связывания рецептора, приобретая резистентность к этому фагу путем мутации этого белка, нарушила активность эффлюксного насоса и восстановила чувствительность к препаратам нескольких классов [289]. В другом случае, хотя фаг ФS12-3, нацеленный на ЛПС, воздействовал на О-антигены и не воздействовал на белки эффлюксных насосов в качестве рецепторов, развитие резистентности к фагу было возможно только при наличии крупных хромосомных делеций в области, ответственной за кодирование эффлюксных насосов [290]. Возможно, штаммы группы А сохранили стабильность своей мембраны после развития устойчивости к фагам или имели

повышенную экспрессию эффлюксных насосов из-за их клинической адаптации к антибиотикам, что не повлияло на их устойчивость к антибиотикам даже после приобретения устойчивости к фагу StM171; кроме того, O-антигены, экспрессируемые на их поверхности, могли иметь другие серотипы, чем у группы А; исследование O-антигенов у *S. maltophilia* выявило более 16 различных серотипов O-антигенов, которые различались между штаммами из окружающей среды и клиническими штаммами [291].

Различия между группами А и В также были продемонстрированы в том, как фаг StM171 изменял ингибирующее действие антибиотиков на образование биопленок. Фаг снижал эффективность гентамицина в штаммах группы В, но не в группе А, в то время как он незначительно усиливал эффект тетрациклина и левофлоксацина в одном штамме из группы А и одном штамме из группы В. Это противоречит более ранним работам о синергизме фагов и антибиотиков против образования биопленок *E. coli*, *P. aeruginosa* и *Staphylococcus* [292–294]. Например, в одном исследовании, при использовании отдельно, фаговый коктейль PP1131 убивал 2,5 log КОЭ/г *P. aeruginosa in vivo*, в то время как комбинации PP1131/ципрофлоксацин были очень синергичными, убивая >6 log КОЭ/г. Однако следует отметить, что в данном исследовании использовался коктейль фагов и концентрация ципрофлоксацина, в 2,5 раза превышающая минимальную ингибирующую концентрацию, в то время как мы использовали один фаг и 40% от минимальной ингибирующей концентрации каждого антибиотика. В совокупности эти результаты указывают на возможность применения слаболитического фага StM171 штаммоспецифическим и антибиотикоспецифическим способом, а также на возможность его введения до начала антибиотикотерапии, если пациент инфицирован одним из штаммов группы В, перед применением бета-лактамовых антибиотиков. Использование фага StM171 для ингибирования образования биопленки менее эффективно чем использование антибиотиков, и действие фагов необходимо тестировать *in vitro* перед применением, используя штамм пациента и антибиотики, которые предполагается использовать в лечении.

3.3. Коэволюция фагов с их хозяевами

Коэволюция бактерий и бактериофагов, это динамический процесс, на который влияет множество факторов, причём некоторые из них способствуют адаптации фагов к резистентности бактерий. При фаготерапии фактически запускается процесс коэволюции фагов и их хозяйских бактерий. В терапевтической практике иногда применяется стратегия предварительной адаптации фагов, чтобы подготовить их к быстрому появлению резистентных бактериальных мутантов.

Хотя коэволюция фагов и чувствительных бактерий нескольких видов была описана, адаптация фагов в присутствии эволюционно наивных хозяев представляет собой явление, которое редко исследовалось. Коэволюция *S. maltophilia* и *E. cloacae* и специфических к ним фагов остаётся малоизученной. Для количественной оценки результатов взаимодействия между фагами и бактериями мы использовали qPCR, что значительно упрощает технологию исследования.

3.3.1. Результаты оптимизации подготовки образцов с фаговой ДНК в качестве матрицы для qPCR

Воспроизводимость данных qPCR была подтверждена путем анализа одних и тех же образцов фагов (контроль #2) в 4 повторах. За исключением фага StM171, эффективность реакции составляла от 95% до 105%, а максимальное стандартное отклонение и вариация значений C_q для одних и тех же образцов в разных тестах считались приемлемыми ($\leq 0,3$) (таблица 6). Роста сигнала при амплификации в отрицательных контролях (отсутствие матричной ДНК) не наблюдалось.

Таблица 6. Воспроизводимость данных qPCR и эффективность реакции для различных фагов в нескольких прогонах

Образец	Максимальное стандартное отклонение	Стандартное отклонение C_q между прогонами	Slope	диапазон эффективности реакций (%)
EC152	0.19	± 0.15 цикла	-3.31	98.6 - 103
StenM174	0.24	± 0.10 цикла	-3.15	106.7 - 108
StM171	0.3	± 0.62 цикла	-2.92	104.6 - 134
EC151	0.1	± 0.12 цикла	-3.25	103 - 106

Титр фагов в экспериментальных образцах оценивали путем сравнения с значениями C_q серийных разведений референсных препаратов фагов (контроль #2) с известными титрами (определенными методом двойного слоя агара) в тех же постановках ПЦР (Рис 4В). Был определен предел обнаружения фагов, и мы обнаружили, что qPCR позволяет надежно выявлять соответствие сигнала титру фагов вплоть до $\sim 10^4$ БОЕ/мл, при этом чувствительность снижается ниже 10^3 БОЕ/мл.

3.3.2. Результаты адаптации фагов EC151 и EC152 к *E. cloacae* КЭМТК 2064

Для оценки успешности адаптации фагов в различных сценариях коэволюции мы рассматривали два ключевых показателя: (1) способность эволюционировавших популяций фагов инфицировать панель бактериальных клонов (адаптированных к самому фагу, к конкурирующему фагу и к коктейлю из обоих фагов); и (2) повышает ли какой-либо сценарий адаптации эффективность инфицирования по сравнению с исходным фагом.

Результаты были в значительной степени специфичными для фагов, однако выявилось несколько общих тенденций в отношении условий, которые способствовали появлению фагов-генералистов, способных инфицировать большинство, если не все, бактериальные клоны (популяции). Фаги, полученные после десяти пассажей, были неизменно более эффективны, чем фаги, полученные после пяти пассажей. Для изученных фагов *S. maltophilia* присутствие эволюционно наивного хозяина было более выгодно, чем коадаптация с конкурирующим фагом. В отличие от этого, для фагов *E. cloacae* как наивный хозяин, так и конкурирующий фаг были полезны для получения фагов-генералистов с повышенной инфекционностью.

Для фага EC151 все адаптированные фаговые популяции после десяти пассажей смогли инфицировать все бактериальные клоны в одном эксперименте, при этом сценарий С (адаптация с конкурирующим фагом EC152) показал увеличение инфекционности на 1-2 порядка (рис. 31а). В втором повторе сценарий С снова привел к появлению наиболее эффективных фагов: полученные фаги были способны инфицировать пять из семи бактериальных

популяций и тоже демонстрировали повышение инфекционности на ~1-2 порядка (рис. 31б). Сценарий В (адаптация с наивным хозяином) был следующим по успешности, дав популяцию фагов, способную инфицировать все бактериальные популяции в первом повторе и четыре из семи популяций во втором повторе, хотя повышение инфекционности на 1-2 порядка наблюдалось только во втором повторе (рис. 31б).

Фаг ЕС152 продемонстрировал наиболее выраженную генерализацию среди всех четырех фагов в двух повторях. После десяти пассажей популяции ЕС152, адаптированные в сценарии А (отсутствие неиммунизированного хозяина и конкурирующего фага), смогли инфицировать большинство бактериальных клонов в обоих повторях. Более того, популяции из сценариев В, С и D (наличие неиммунизированного хозяина, конкурирующего фага или обоих) смогли инфицировать все полученные бактериальные клоны в обоих повторях с повышенным инфекционности по сравнению с исходным фагом на 3 порядка и более (рис. 31в и 31г).

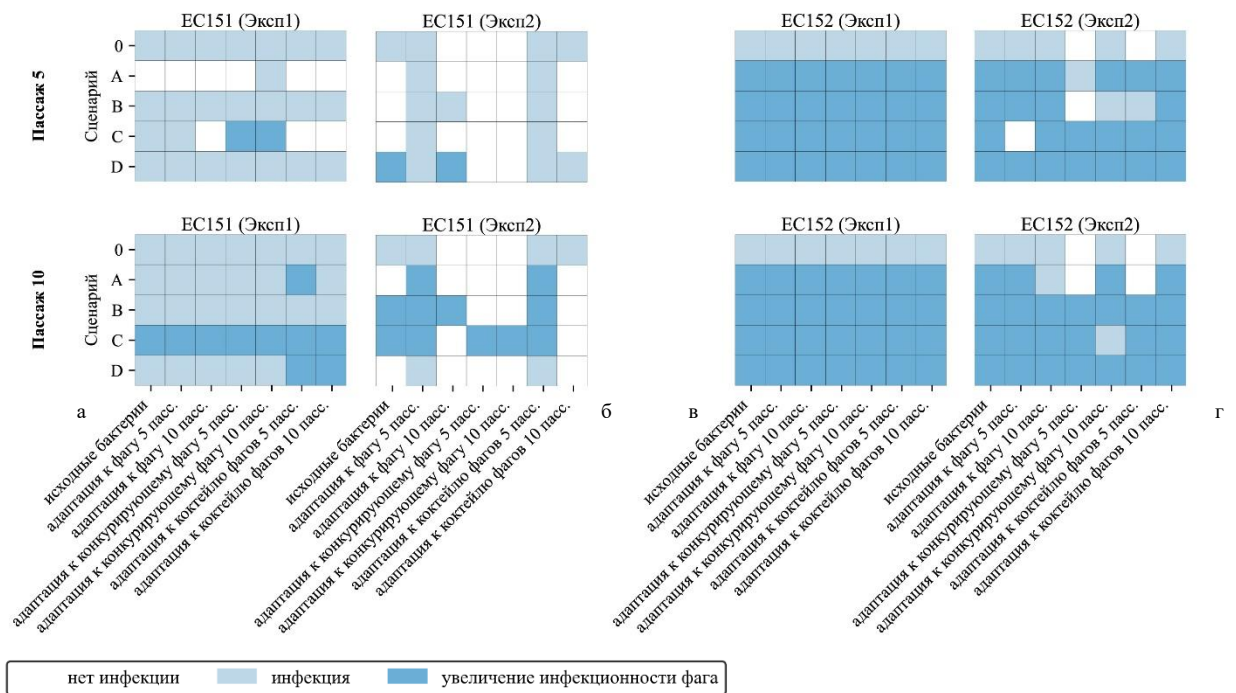


Рисунок 31. Тепловые карты эффективности инфекции для адаптированных фагов ЕС151 (1-й повтор: а, 2-й повтор: б) и ЕС152 (1-й в, 2-й г). Строка 1: фаги после 5 пассажей. Строка 2: фаги после 10 пассажей. На каждой тепловой карте исходный фаг обозначен как 0, а сценарии указаны по оси у; по оси х указаны различные бактериальные клоны (популяции). Белый цвет – отсутствие инфекции; серый цвет – эффективность инфекции приблизительно равная с

исходным фагом; синий цвет – инфекция и более высокая урожайность, чем у исходного фага на том же хозяине.

3.3.3. Результаты адаптации фагов StM171 и StenM174 к S. maltophilia КЭМТК 2355

Среди четырех изученных фагов наихудшие результаты показала адаптация фага StM171, при которой фаг полностью утратил способность инфицировать бактериальные клоны. Это было особенно заметно в сценариях, включающих конкуренцию с фагом StenM174 (С и D), где инфекционность была полностью утрачена против всех бактериальных клонов (рис. 32а и 32б). Надо отметить, что в одном из двух биологических повторов адаптация по сценариям А и В для обоих фагов привела к образованию популяций, способных инфицировать большинство полученных бактериальных клонов, включая исходную бактериальную популяцию. Также, адаптированные по отдельности фаги StM171 и StenM174 обладали повышенной на порядок инфекционностью по сравнению с исходным фагом. Однако эти моно-адаптированные фаги не смогли инфицировать ни один из клонов из адаптировавшийся к коктейлю из обоих фагов (рис. 32а).

Фаг StenM174 адаптировался несколько лучше, чем StM171, хотя устойчивость к нему все же возникала у бактериальных клонов в обоих повторах эксперимента. Тем не менее, длительная адаптация в присутствии наивного хозяина (сценарий В, 10 пассажей), приводила к образованию популяции фагов StenM174, способных инфицировать все бактериальные клоны (рис. 32в, г). Этот эффект наблюдался в обоих повторах эксперимента. Надо отметить, что пассирование клеток с фагом StM171, по-видимому, способствовало сенсбилизации клеток к фагу StenM174. Так, в первом повторе эксперимента, бактерии, пассированные только с фагом StM171 в течение пяти или десяти пассажей, становились чувствительными к адаптированным вариантам StenM174 (рис. 32в). Во втором повторе эксперимента, адаптация фага StenM174 в коктейле с StM171 как в присутствии, так и в отсутствии наивного хозяина (сценарии С и D), приводила к образованию популяций фагов, способных инфицировать все бактериальные клоны (рис. 32г). Повышение эффективности инфекционности наблюдалось только в сценарии В (в первом повторе эксперимента) и в сценарии

D (во втором повторе). При этом популяции адаптированных фагов StenM174 показали повышение эффективности инфекционности на 5 порядков (сценарий B) и 2 порядка (сценарий D) для всей панели бактерий.

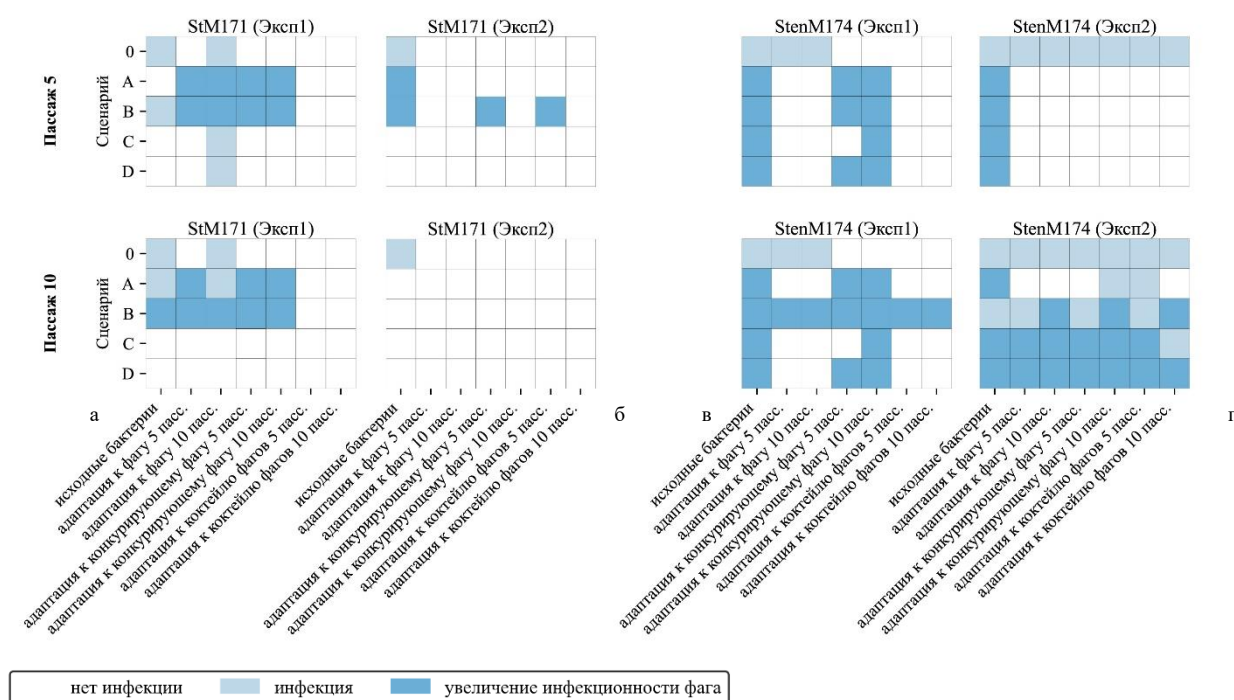


Рисунок 32. Тепловые карты эффективности инфекции для адаптированных фагов StM171 (1-й повтор: а, 2-й повтор: б) и StenM174 (1-й в, 2-й г). Строка 1: фаги после 5 пассажей. Строка 2: фаги после 10 пассажей. На каждой тепловой карте исходный фаг обозначен как 0, а сценарии указаны по оси y; по оси x указаны различные бактериальные клоны. Белый цвет – отсутствие инфекции; серый цвет – эффективность инфекции приблизительно равная с исходным фагом; синий цвет – инфекция и более высокая урожайность, чем у исходного фага на том же хозяине.

Предварительная адаптация фагов перед терапией, это часто используемый метод с различной степенью успеха, который помогает преодолеть устойчивость бактериальных клонов, возникающую после лечения [295,296]. Наша цель состояла в том, чтобы попытаться определить метод адаптации, который бы: 1) усилил способность фагов инфицировать бактерии и 2) сохранил способность фага инфицировать различные клоны, полученные от исходного хозяина, прошедшие различные эволюционные адаптации, включая адаптацию к самому фагу. Кроме того, мы хотели создать панель бактериальных клонов, которые адаптировались по-разному, чтобы проверить результаты обучения фагов, поэтому мы тестировали полученные нами фаги на бактериях, которые

адаптировались к коктейлю из двух фагов или к каждому из компонентов коктейля отдельно в течение пяти или десяти пассажей. Фаги адаптировались в четырех сценариях: (А) только фаг, (В) фаг + исходный (наивный) хозяин, (С) фаговый коктейль без наивного хозяина и (D) фаговый коктейль + наивный хозяин. Наличие эволюционно наивного (исходного) хозяина, это фактор, который показал успех в ограниченном числе исследований по расширению круга хозяев фагов [297,298]. Вторым изучаемым фактором является наличие конкурирующего фага, который является эволюционным стрессором и имеет различные последствия для эволюции фагов. Этот фактор может привести к ускорению возникновения бактериальной резистентности, а в некоторых случаях даже к рекомбинации конкурирующих фагов, создавая химерные фаги [299].

Увеличение продолжительности адаптации необходимо для отбора универсальных фагов. В литературе сообщалось, что аналогичная продолжительность адаптации, как в нашем исследовании, приводила к быстрому появлению резистентности у бактерий *P. aeruginosa* и универсальных фагов SBW25F2 из-за динамики гонки вооружений [300], в то время как более длительные периоды адаптации, исчисляемые месяцами и даже годами, смещали динамику в сторону флуктуационного отбора из-за увеличения затрат на резистентность и адаптацию [301]. Мы продемонстрировали, что эффект конкурирующего фага был специфичен для каждого фага, он приводил к неудаче адаптации StM171, смешанным результатам для StenM174 и улучшенным результатам для EC151 и EC152. Результаты адаптации EC151 согласуются с результатами, полученными при адаптации фагов в коктейлях, когда фаги, инфицировавшие в составе фаговых коктейлей *Salmonella* и *Vibrio* лучше адаптировались к бактериям, нежели при адаптации в виде монофагов [302,303]. В то время как результаты для совместной адаптации StM171 и StenM174 аналогичны результатам, полученным при адаптации SBW25F2, где бактерии быстро выработали устойчивость к фагам до того, как затраты на устойчивость для бактерий возросли [304]. Возможно, хорошие результаты для StenM174 были обусловлены сниженной способностью бактерий развивать устойчивость к нему и StM171 одновременно, аналогично тому, что сообщается для фага 2972, который инфицирует *Streptococcus thermophilus* [305].

сенсбилизация, наблюдаемая у бактерий, адаптировавшихся к StM171, может быть связана с тем, что два фага нацелены на разные рецепторы. В одном исследовании адаптация к двум фагам, нацеленным на разные рецепторы, капсульный полисахарид и ЛПС у *Klebsiella pneumoniae*, показала коллатеральную чувствительность: когда бактерии адаптировались к одному фагу путем потери капсульного полисахарида, это повышало их уязвимость к фагам, связывающим ЛПС [306].

В этих экспериментах мы продемонстрировали два практических результата для клинической практики:

во-первых, создание панели бактериальных клонов, адаптированных к различным селективным давлениям (один фаг, коктейль), обеспечивает инструмент скрининга для выявления универсальных популяций фагов с клинически значимыми характеристиками, именно тех типов мутантов, которые, вероятно, возникнут во время терапии.

во-вторых, адаптируя фаги в различных условиях, мы получили популяции, которые в совокупности инфицировали все протестированные бактериальные клоны. Коктейль из этих обученных популяций, таким образом, может преодолеть различные механизмы резистентности, которые могут возникнуть у пациента.

Контрастные результаты между EC151/EC152 (непрерывное улучшение, динамика «гонки вооружений») и StM171/StenM174 (перекрестная сенсбилизация, флуктуирующая селекция), вероятно, отражают различия в биологии фагов и механизмах защиты хозяина. EC151 и EC152 кодируют множественные системы контрзащиты (модификация *preQ0*, реутилизация *NAD⁺*), что позволяет им последовательно преодолевать бактериальную резистентность. Напротив, фаги StM171 и StenM174, не имеющие подобных систем, более восприимчивы к флуктуирующей динамике, предсказанной моделью «уничтожения победителя», где редкие генотипы бактерий избегают хищничества фагов, но становятся мишенью для других фагов, когда становятся распространенными. Перекрестная сенсбилизация между StM171 и StenM174, при которой бактерии, устойчивые к StM171, становятся более восприимчивыми к StenM174, имеет важное значение для разработки коктейлей. Если фаги используют разные рецепторы, коктейли могут не просто задерживать развитие

резистентности, но и активно направлять популяции бактерий к фенотипам, более уязвимым для одного из фагов. Этот принцип можно использовать в терапевтических целях: последовательное применение фагов (StM171 с последующим применением StenM174) может превзойти одновременное использование коктейлей.

3.4. Анализ генов устойчивости к антибиотикам и систем защиты от фагов у *S. maltophilia*

3.4.1. Общая характеристика геномов чувствительных к фагу штаммов *S. maltophilia*, найденных в Новосибирске

Геномные ДНК штаммов *S. maltophilia* групп А (КЭМТК 2142, 2355) и В (КЭМТК 3659, 3664 и 3670) были секвенированы. Их геномы имели в среднем размер 4,8 Мб и содержание GC ~66% (таблица 7). Геномы штаммов из группы А были более гетерогенными по сравнению с геномами штаммов из группы В, которые продемонстрировали высокий уровень идентичности. Геномы были внесены в базу данных NCBI GenBank с регистрационными номерами JVCSEHN0000000000, JVCSEXM0000000000, JVCSEXL0000000000, JVCSEHK0000000000, JVCSEXJ0000000000 для КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670 соответственно.

Таблица 7. Характеристика геномов штаммов *S. maltophilia*, изолированных в Новосибирске

	Штамм <i>S. maltophilia</i>	Размер генома, п.н.	Количество предполагаемых ОРТ	Опероны рРНК	тРНК	тмРНК*
1	КЭМТК 2142	4927053	4579	3	68	1
2	КЭМТК 2355	5001637	4373	3	70	1
3	КЭМТК 3659	4721471	4286	3	71	1
4	КЭМТК 3664	4778940	4293	3	70	1

5	КЭМТК 3670	4688404	4285	3	64	1
---	---------------	---------	------	---	----	---

* тмРНК – трансфер-мессенджерная РНК

3.4.2. Гены устойчивости к антибиотикам у *S. maltophilia* КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670, и гены, отвечающие за способность формировать биопленки

В каждом из пяти исследованных штаммов было обнаружено восемнадцать генов устойчивости к антибиотикам; исключением являлся ген устойчивости к аминогликозидам *aac(6')-Iz* [307], который был обнаружен только у штаммов группы А (рис. 33). Примечательно, что гены устойчивости к антибиотикам были идентичны у штаммов группы В, в то время как двенадцать из восемнадцати генов устойчивости к антибиотикам в группе А различались по нуклеотидным последовательностям.

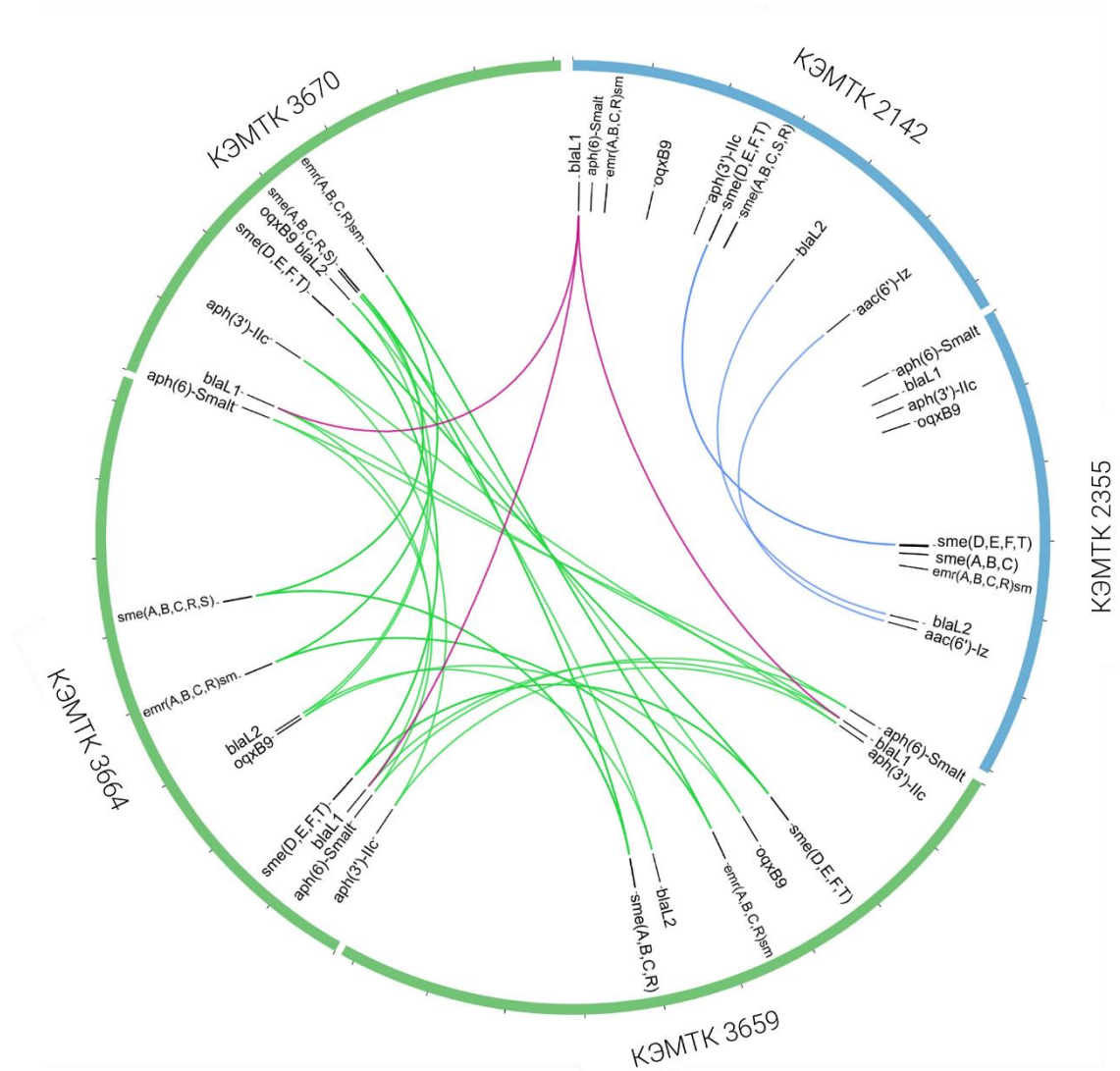


Рисунок 33. Диаграмма, показывающая гены, ответственные за устойчивость к антибиотикам, обнаруженные в геномах бактерий-хозяев StM171, со сходством более 80% с референсными генами из разных баз данных. Связи между генами соответствуют 100-процентной идентичности. Синие линии соединяют идентичные опероны в группе А, зеленые линии соединяют идентичные опероны в группе В, фиолетовые линии соединяют идентичные опероны в группах А и В. *Ideed et al. 2023*

Обнаруженные гены устойчивости к антибиотикам включали следующие: *emrRsm*, *emrCsm*, *emrAsm* и *emrBsm*, которые образуют четырехчленный оперон, регулируемый *EmrRsm*. Оперон *emrABC Rsm* кодирует насос (эффлюксную помпу), который защищает бактерии от нескольких химически не родственных антимикробных агентов, включая фторхинолоновые антибиотики, обеспечивая множественную лекарственную устойчивость [308]. Кроме того, были обнаружены два оперона, кодирующие две эффлюксные помпы *SmeABC* и *SmeDEF*. Эти системы эффлюкса кодируются генами *smeA*, *smeB*, *smeC* и *smeD*,

smeE, *smeF*, соответственно. Насос *SmeABC* обеспечивает устойчивость к аминогликозидам, бета-лактамам и фторхинолонам [309]. *SmeDEF* определяет устойчивость к хинолонам, тетрациклинам, макролидам, хлорамфениколу и новобиоцину [310]. В дополнение были выявлены гены *smeR/S* и *smeT*, кодирующие регуляторы экспрессии этих эффлюксных помп. Также были обнаружены другие гены устойчивости к антибактериальным препаратам: гены металло-бета-лактамаз *blaL1* и *blaL2*, которые ассоциированы с устойчивостью к пенициллину, цефалоспоринолу и карбапенему [311–313]; гены *aph(3')-Iic*, *aac(6)-Iz* и *aph(6)-Smalt*, которые связаны с устойчивостью к аминогликозидам [314] и ген *oqxB9*, кодирующий RND-эффлюксный насос, обеспечивающий устойчивость к некоторым антибиотикам и дезинфектантам [315] (рис. 33).

В исследованных геномах всех новосибирских штаммов *S. maltophilia* (КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670) были выявлены генетические элементы, опосредующие образование биопленок. Так, в них присутствовал кластер генов *rpf* (*rpfF*, *rpfC* и *rpfG*), которые отвечают за групповое поведение бактерий и за экспрессию факторов вирулентности, в том числе за способность образовывать биопленки. Дополнительно у всех изолятов был найден ген *smf-1*, являющийся компонентом системы адгезии и также необходимый для образования биопленок [316,317].

3.4.3. Оценка гетерогенности геномов *S. maltophilia*

Недавнее открытие широкого спектра механизмов противофаговой защиты у бактерий [82,83,84], называемого также антифаговым иммунитетом бактерий, привело к поиску и изучению антифаговых систем защиты у различных бактериальных групп. К настоящему времени был известен пангеномный анализ антифаговых систем защиты *E. coli* [101] и *P. aeruginosa* [102]. Анализ антифаговых систем защиты *S. maltophilia* до нашего исследования не проводили.

Для проведения такого анализа в базе данных NCBI GenBank был обнаружен 1961 геном штаммов *S. maltophilia* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=40324> доступ получен 25.03.24). Из них только 67 геномов имели уровень сборки “assembly level complete” и именно они были использованы для пангеномного анализа. В

результате, полногеномный анализ проводился для 72 геномов *S. maltophilia*, из которых пять геномов – это геномы штаммов, выделенных в Новосибирске (*S. maltophilia* КЭМТК 2142, 2355, 3659, 3664 и 3670). Для всех исследованных штаммов, включая новосибирские, был проведен сравнительный анализ (рис. 34).

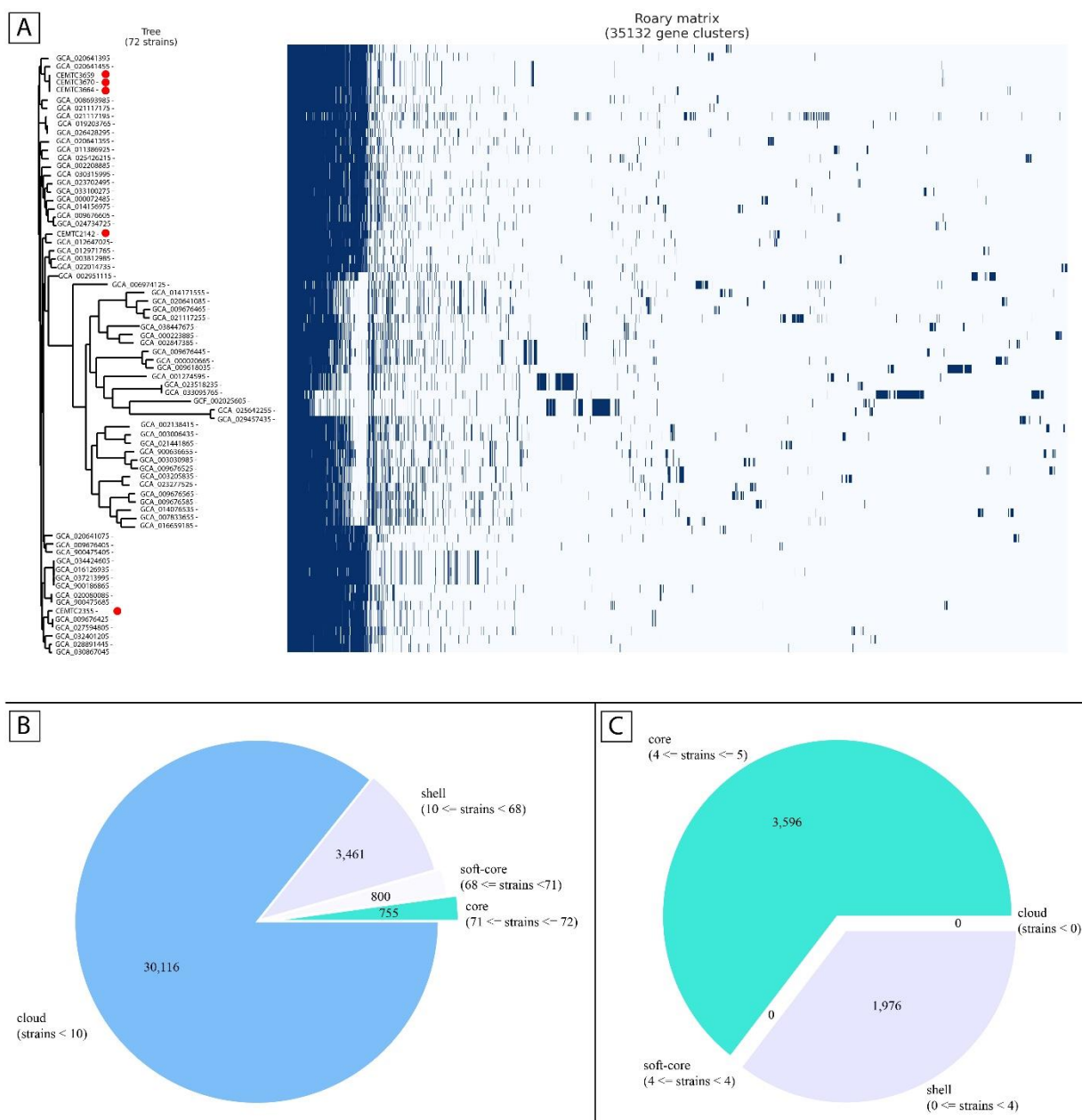


Рисунок 34. Пангеномный анализ штаммов *S. maltophilia*. (A) Матрица общих генов между 72 изученными штаммами; локальные штаммы отмечены красными кружками. (B) Распределение основных и дополнительных генов в 72 штаммах *S. maltophilia*. (C) Распределение основных и дополнительных генов в пяти штаммах *S. maltophilia* из Новосибирска. (Jdeed et al. 2024)

Пангеномный анализ этих 72 штаммов показал высокий уровень гетерогенности геномов: Основные (кóровые) гены, общие для всех штаммов

(core genes), составляли 2,1% от всех генов (рис. 34В), гены, общие для 68-71 штамма (soft core) - 2,2%, гены общие как минимум для десяти штаммов и не более чем для 67 (shell) – 10%, а гены общие не более чем для десяти штаммов (cloud), составляющих остальные 85.7% (рис. 34В).

Независимый анализ генома пяти новосибирских штаммов, как и ожидалось, выявил гораздо более высокую однородность; процент кóровых генов составил ~64% (рис. 34С). Анализ количества кóровых генов показал, что штаммы группы В были более гомологичные друг другу, чем штаммы группы А (рис. 35).

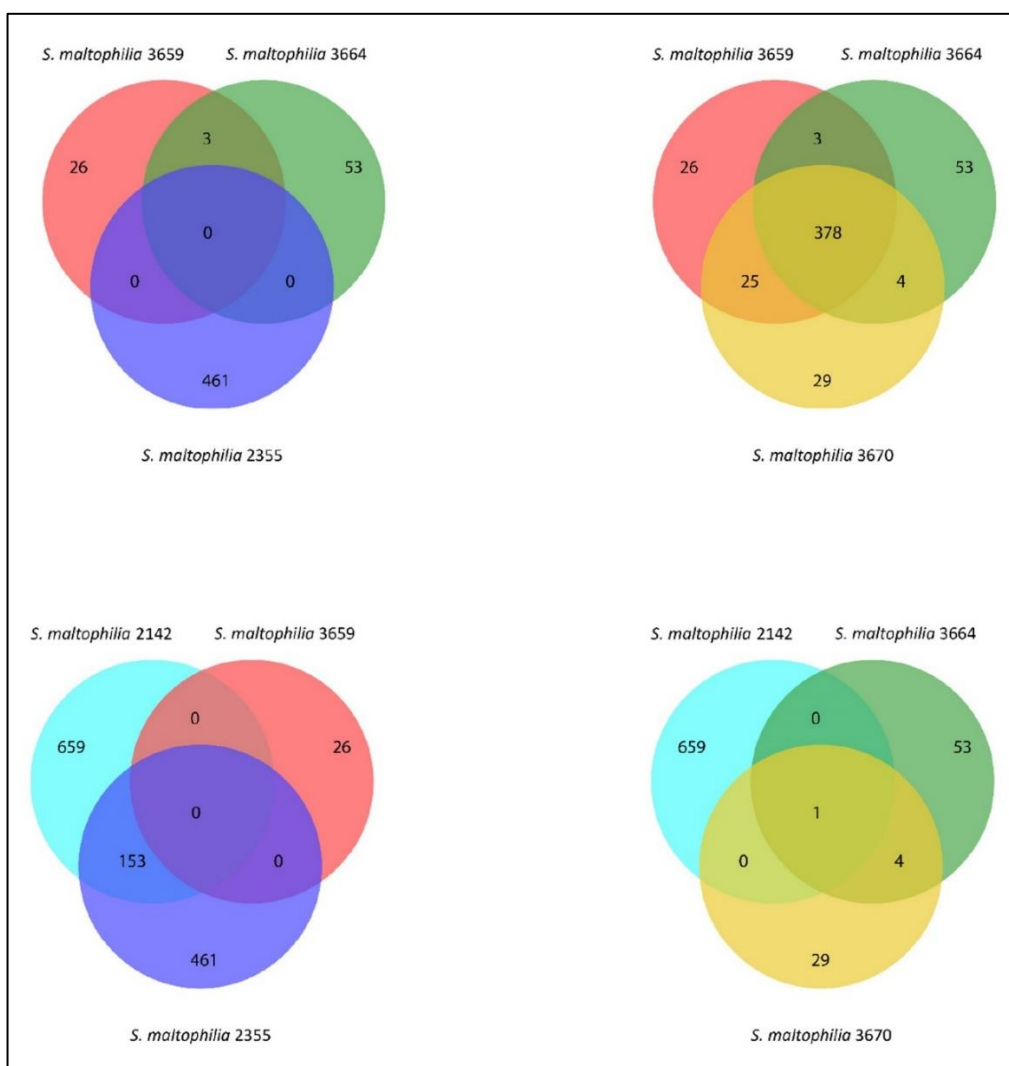


Рисунок 35. Диаграмма Венна для генов, общих для локально изолированных штаммов *S. maltophilia*, за исключением кóровых генов. *Ideed et al. 2024*

3.4.4. Системы защиты от фагов у *S. maltophilia*

У изученных геномов *S. maltophilia* был проведен поиск систем защиты от фагов, МГЭ и профагов. Всего в геномах *S. maltophilia* было обнаружено 72 системы защиты от фагов (рис. 36).

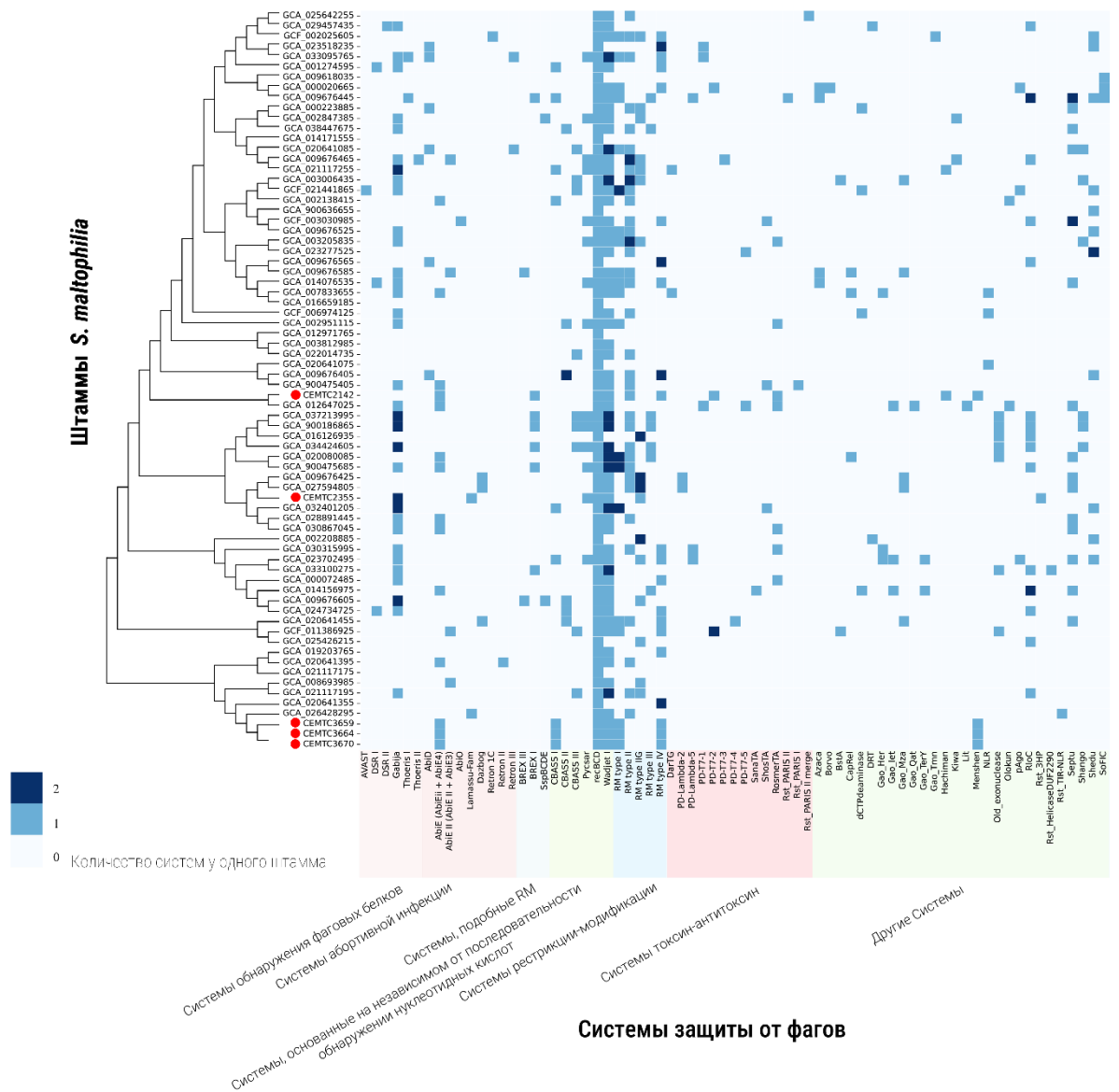


Рисунок 36. Системы защиты, обнаруженные в штаммах *S. maltophilia*. Локальные геномы отмечены красными кружками. *Jdeed et al. 2024*

Эти системы можно разделить в соответствии с их функциями: системы обнаружения фаговых белков (Avast, DSR, Gabija и Thoeris), системы abortивной инфекции (AbiE, AbiD, AbiO, Lamassu-Fam, Dazbog и Retron), системы RM, системы, подобные RM (BREX и SspBCDE), системы токсин-антитоксин (DarTG, PD-Lambda, PD-T7, SanaTA, ShosTA, RosmerTA и Rst-PARIS), системы CRISPR-Cas, системы, основанные на независимом от последовательности обнаружении нуклеотидных кислот (CBASS, Pycsar, recBCD и Wadjet) и другие системы с неизвестным механизмом антифаговой защиты. Антифаговая функция большинства обнаруженных нами систем (68/72) была ранее подтверждена

экспериментально, за исключением семейства систем Olokun, а также системы Rst_TIR-NLR, Wadjet и Azaca. [318–356]

Защитные системы различались по частоте встречаемости, часть из них была представлена в геноме одного штамма в двух копиях (рис. 36); наиболее распространенной была система RecBCD, присутствовавшая во всех изученных штаммах. Система RecBCD отвечает за репарацию ДНК и гомологичную рекомбинацию у бактерий; этот оперон также имеет антифаговую функцию, поскольку в составе этой системы присутствует нуклеаза, расщепляющая обе цепи свободного дуплекса ДНК на фрагменты ДНК [357–359]. Другой распространенной системой была Wadjet I, обнаруженная у 82% изученных штаммов *S. maltophilia*. Система Wadjet I отвечает за защиту от трансформации кольцевыми плазмидами и предполагается, что она обеспечивает частичную защиту от некоторых хвостатых фагов, препятствуя образованию кольцевых промежуточных продуктов ДНК фагов во время репликации, хотя это не доказано экспериментально [360]. Частота встречаемости этой системы у *S. maltophilia* оказалась выше, чем у других бактерий, у которых она была оценена в 6% [361]. Система Wadjet I была идентифицирована в двух вариантах; наиболее частая, вероятно, была неактивной из-за отсутствия гена *jetD*, что приводит к инактивации системы [39]. Остальные гены системы Wadjet I (*jetA*, *jetB* и *jetC*) отвечают за топологическое распознавание чужеродной ДНК [360,361], и эта неполная версия Wadjet I сохранилась в защитном островке #27 вместе с опероном RecBCD.

Другие системы защиты от фагов, которые часто встречались в штаммах *S. maltophilia*, включали RM типа II (обнаружена в 49% изученных штаммов), Gabija (45% штаммов по сравнению с 15% у бактерий в целом [362]), RM типа IV, типа I и типа IIG (обнаружены в 29%, 28% и 24% изученных штаммов, соответственно), Septu и систему abortивной инфекции AbiE 4 (обе обнаружены в 20% штаммов) (рис. 36). Распределение Gabija, Abi и всех систем RM было близко к тому, что было обнаружено в клинических штаммах *S. maltophilia*, выделенных в Китае [363] (45%, 20%, 90% соответственно). Полная система CRISPR-Cas не была обнаружена ни в одном штамме *S. maltophilia*.

3.4.5. Островки антифаговой защиты в геномах *S. maltophilia*

Для определения островков защиты, содержащих антифаговые системы, использовали ранее использованные в другими авторами параметры [364]. Согласно этим параметрам, островок антифаговой защиты был определен как локус бактериального генома, который содержит определенную систему защиты от фагов по крайней мере в двух штаммах, и фланкирован пятью коóровыми генами на 5`- и 3`-концах. Эти коóровые гены должны располагаться в том же порядке в штаммах, в которых выявлена определенная антифаговая система, и в референсном штамме *S. maltophilia* NCTC10258.

Основные фланкирующие гены в геномах исследованных штаммов были сопоставлены с референсным штаммом *S. maltophilia* NCTC10258 и таким образом было идентифицировано 27 островков защиты (рис. 37). Эти островки также содержали профаги и гены, ассоциированные с рекомбинацией, транспозицией и интеграцией.

Частота присутствия антифаговых систем различалась среди разных островков защиты (рис. 38B). Четыре из островков защиты (#4, #13, #16 и #27) содержали ~60% случаев систем защиты среди проанализированных штаммов *S. maltophilia*. Островок защиты #27 был единственным островком защиты, который нёс гены защиты от фаговой инфекции во всех изученных штаммах. Этот островок нёс гены из оперона RecBCD и системы Wadjet I, в которой отсутствовал ген *jetD*. Островок защиты #27 включал 25% всех идентифицированных случаев антифаговых систем защиты. Островок защиты #4, фланкированный генами *uceI* и *rcnR*, содержал 13% обнаруженных антифаговых систем защиты *S. maltophilia*. Этот островок включал в большинстве случаев системы RM типа II и системы антифаговой защиты Azaca, Dazbog, Gao_Mza, dCTP terminase и Menshen (рис. 39B).

Островок защиты #16, фланкированный генами *rpoE* и *metR*, содержал 12% обнаруженных систем антифаговой защиты, включая большинство выявленных систем Gabija и Руссар и половину обнаруженных систем Septu, CBASS III и систему RM типа IG. Этот островок постоянно содержал ген *ligD*, связанный с интеграцией (рис. 38C). Наконец, островок защиты #13 составлял приблизительно 9% обнаруженных систем защиты от фагов. Окруженный генами *guaA* и *pgrR*, этот островок был самым вариабельным с точки зрения обнаруженных систем антифаговой защиты (рис. 38D). Дополнительная информация о фланкирующих генах остальных островков защиты представлена в таблице 8.

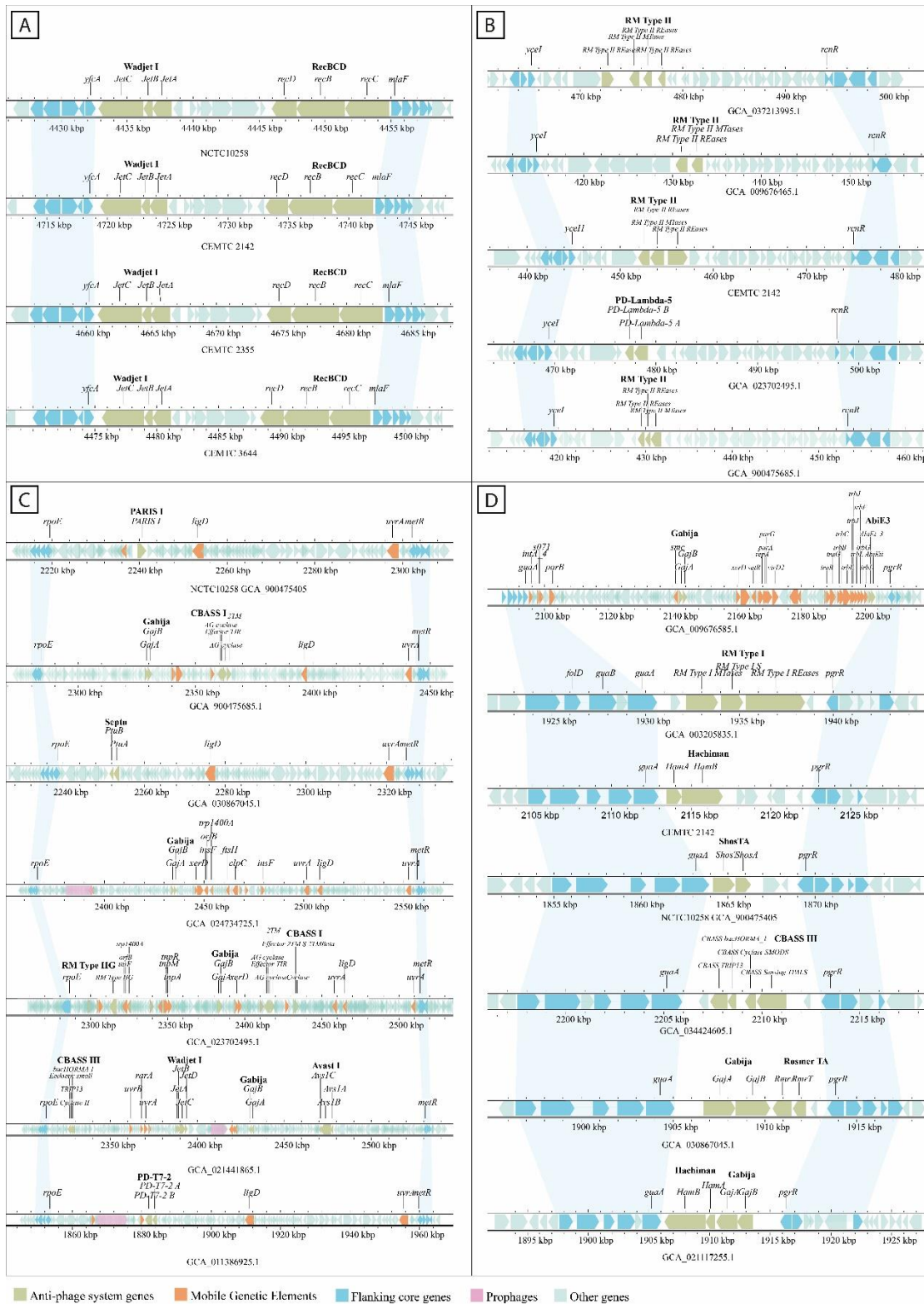


Рисунок 38. Островки защиты с самой высокой частотой присутствия антифаговых систем. (A) Островок защиты #27, занятый системами Wadjet I и RecBCD. (B) Островок защиты #4, содержащий большинство экземпляров RM типа II и других антифаговых систем. (C) Островок защиты #16, содержащий широкий спектр различных систем защиты от фагов. (D) Островок защиты #13, содержащий наиболее разнообразный набор систем защиты от фагов среди изученных штаммов *S. maltophilia*. *Ideed et al. 2024*

Таблица 8. Фланкирующие кобровые гены островков защиты *S. maltophilia*

Островок защиты	5'-фланкирующий основной ген	3'-фланкирующий основной ген
#1	<i>pdxJ</i>	<i>2OG-Fe(II) oxygenase</i>
#2	<i>hcaB</i>	<i>blaI_2</i>
#3	<i>gpsA</i>	<i>Ax21 family protein</i>
#4	<i>ycel</i>	<i>rcnR</i>
#5	<i>rsmI</i>	<i>murF</i>
#6	<i>prpC</i>	<i>DUF6165 family protein</i>
#7	<i>gdx</i>	<i>ybaB</i>
#8	<i>SseB family protein</i>	<i>yegT</i>
#9	<i>cnrH</i>	<i>cyoA</i>
#10	<i>hslR</i>	<i>glycine zipper 2TM domain-containing protein</i>
#11	<i>csrA</i>	<i>hypothetical protein WP_005412941.1</i>
#12	<i>arpC</i>	<i>hypothetical protein WP_005409230.1</i>
#13	<i>guaA</i>	<i>pgrR</i>
#14	<i>recJ</i>	<i>lysS</i>
#15	<i>metR</i>	<i>SapC family protein</i>
#16	<i>rpoE</i>	<i>metR</i>
#17	<i>serS</i>	<i>tRNA adenosine(34) deaminase Tada</i>
#18	<i>yybR</i>	<i>serS</i>
#19	<i>entS</i>	<i>dksA</i>
#20	<i>curA</i>	<i>blc</i>
#21	<i>besA</i>	<i>queC</i>
#22	<i>rimK</i>	<i>estA</i>
#23	<i>selD</i>	<i>pepP</i>
#24	<i>hypothetical protein WP_024957909.1</i>	<i>rpoD</i>
#25	<i>ubiK</i>	<i>yidA</i>
#26	<i>energy transducer TonB</i>	<i>mphP</i>
#27	<i>yfcA</i>	<i>mIaF</i>

3.4.6. Изменчивость защитных систем у *S. maltophilia*

Для того, чтобы оценить степень сходства белков в системах защиты от фагов у разных штаммов, было выполнено выравнивание аминокислотных последовательностей для каждого из белков, встреченных в исследованных штаммах. Затем была рассчитана матрица попарной идентичности для полученных выравниваний и значения процентов аминокислотной идентичности (identity) для каждого белка были усреднены для получения единого значения, которое отображает, насколько консервативен белок у всех проанализированных штаммов.

Среди наиболее часто встречающихся систем, белки систем RecBCD, AbiE 4, BREX I, Gao_MZA, Shango и белки, кодируемые генами *jetA*, *jetB* и *jetC* Wadjet I, оказались высоко консервативными (средняя аминокислотная идентичность для каждого отдельного белка составила >95%) (рис. 39). Другие часто встречающиеся системы, а именно Gabija и все типы систем RM, оказались изменчивыми; средние значения идентичности белковых последовательностей составили ~50% для белков системы Gabija и <30% для белков систем RM типов I, II, III и IV. Среди систем RM только тип RM III имел более консервативные белки среди изученных штаммов со значениями аминокислотной идентичности ~70%.

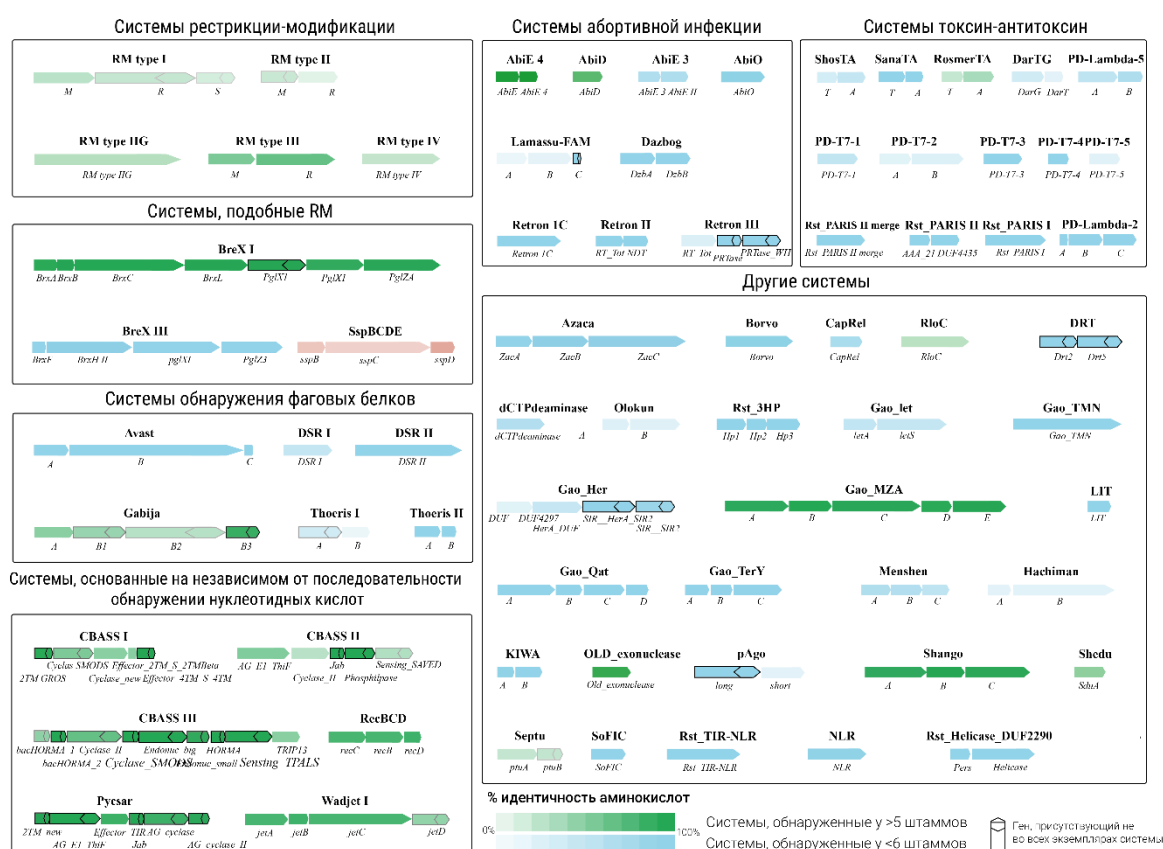


Рисунок 39. Классификация и консерватизм антифаговых систем защиты, обнаруженных у *S. maltophilia*. Синим цветом обозначены системы, присутствующие менее чем в 6 штаммов, зеленым - системы, присутствующие более чем в 5 штаммах. Гены с жирными границами относятся к генам, которые не присутствовали во всех случаях в данной системе (Jdeed et al. 2024)

3.4.7. Схема оккупации островков защиты

Для того, чтобы исследовать связь между филогенетическим родством штаммов *S. maltophilia* и присутствием сходных островков защиты, последние,

несущие соответствующие гены, были сопоставлены со штаммами на филогенетическом дереве. Для 12 из 27 островков защиты по крайней мере половина изученных штаммов с одним и тем же островком, «оккупированным» соответствующими антифаговыми системами, были филогенетически связаны. Родственные штаммы обычно имели одни и те же антифаговые системы.

Так, островок защиты #9 был занят у пяти штаммов, четыре из которых были близкородственны филогенетически и имели одни и те же системы, а именно RM тип III, Rloc и OLD_exonuclease. Пятый, неродственный штамм имел другую систему (RST геликазы) на этом острове. Аналогично, островок защиты #19 был занят системой SoFic у филогенетически связанных штаммов (GCA_009618035, GCA_000020665 и GCA_009676445) (рис. 40A), а островок защиты #20 содержал BREX I и полный вариант Wadjet I у четырех филогенетически связанных штаммов (рис. 40B).

Напротив, большинство других островков защиты были заняты теми же системами в филогенетически менее родственных штаммах, которые были выделены в основном из разных мест. Примерами являются островки защиты #6, #18 и #26, которые заняты системами BREX I, Shedu и Dsr I соответственно (рис. 41A). Примечательно, что штаммы *S. maltophilia* с похожими островками защиты #26 были выделены в США, Китае и Казахстане (GCF_001274595.1, GCA_014076535 и GCA_024734725 соответственно) (рис. 41B).

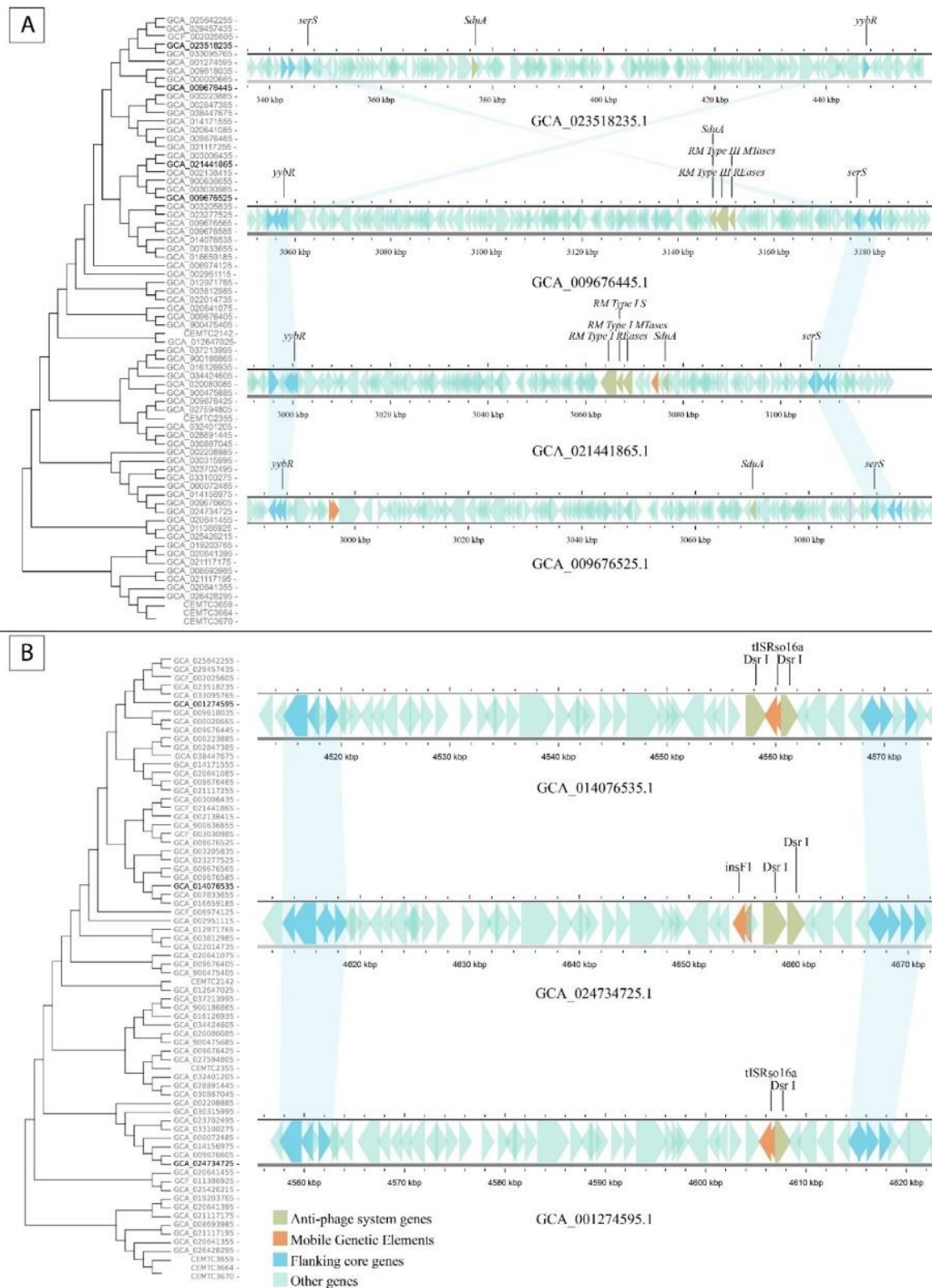


Рисунок 41. Островки защиты #18 и #26 заняты системами Shedu (A) и Dsr I (B) соответственно в таксономически неродственных штаммах (*Jdeed et al. 2024*)

Таким образом, были изучены системы защиты от фагов у *S. maltophilia*, что ранее не проводилось в больших масштабах. Понимание закономерностей распределения систем защиты у целевого вида может сделать разработку контр-

механизмов практическим подходом. Если мы обнаружим, что определенная система присутствует у большинства изученных штаммов определенного вида, и эта система консервативна и не сильно изменчива, то разработка контр-механизмов в одном из фагов, используемых в коктейле, может помочь улучшить результаты лечения. До нашего исследования подобные исследования проводились на *E. coli* и *P. aeruginosa*, где также изучались защитные острова. Было опубликовано исследование местных клинических штаммов *S. maltophilia* из Китая [101,363], которое проводилось в тот же период, что и наше исследование. Однако в исследовании китайских ученых не были изучены защитные островки, и ни одно из упомянутых исследований не затрагивало вопрос сохранения систем или связи между филогенетическими взаимоотношениями штаммов и присутствием определенных защитных систем в островках. В нашем исследовании мы обнаружили, что каждый штамм *S. maltophilia* содержал в среднем пять систем, аналогично тому, что было обнаружено для штаммов *E. coli* [101]. Мы обнаружили 500 экземпляров систем, распределенных по 72 различным системам, большинство из которых были экспериментально подтверждены как обладающие защитными функциями.

Изученные штаммы *S. maltophilia* были крайне гетерогенны, имея всего 4% общих генов, и тем не менее мы обнаружили ряд защитных систем, которые широко распространены в этих штаммах и хорошо сохранились. Эти системы могут стать ценными мишенями для разработки фагов с контрмеханизмами, как мы упоминали ранее. К ним относятся: RecBCD, AbiE 4, BREX I, в то время как другие системы, часто присутствующие в штаммах, были весьма изменчивы, возможно, из-за непрерывной адаптации к местным фагам каждого штамма. К ним относятся системы RM, Gabija и Septu.

Еще одна закономерность, которую мы заметили, несмотря на высокую гетерогенность штаммов, заключается в том, что среди 27 обнаруженных нами защитных островков четыре содержали 60% из 500 обнаруженных нами систем. Для сравнения, у *E. coli* был обнаружен 41 защитный островок, тогда как у *P. aeruginosa* их было обнаружено 11, и соотношение заполнения этих защитных островков было более равномерным [365]. Кроме того, важно отметить, что идентичные острова с одинаковой степенью заполнения можно было обнаружить

в таксономически отдаленных бактериальных штаммах *S. maltophilia*, а также в филогенетически родственных штаммах, выделенных из разных мест (Рис. 40-41). Это подтверждает предположение, что эти участки служат эффективными мишенями для повышения эффективности фаготерапии путем фокусирования на консервативных регионах, содержащих системы, даже среди отдаленно родственных штаммов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной диссертации исследовались четыре взаимосвязанные области, имеющие центральное значение для фаготерапии: 1) геномная и биологическая характеристика фагов, инфицирующих клинически значимые бактерии *E. cloacae* и *S. maltophilia*; 2) способность слаболитического фага StM171 модулировать ответ на антибиотики у *S. maltophilia*; 3) экспериментальные стратегии эволюции для поддержания и повышения инфекционности фагов; 4) разнообразие и организация систем защиты от фагов у *S. maltophilia*. В совокупности эти исследования затрагивают ключевой вопрос о возможности использования фагов, даже обладающих слабой литической активностью, в терапевтических целях.

Три из четырех изученных фагов (EC151, AerP_220 и StM171) образуют предполагаемые новые таксономические единицы: новый род (EC151), новый вид (StM171) или новый род и подсемейство (AerP_220), что подчеркивает огромное неизученное разнообразие фагов, инфицирующих патогенные бактерии. Три фага (EC151, EC152, StM171) продемонстрировали слабую литическую активность и не смогли существенно снизить количество бактериальных клеток. Только AerP_220 показал терапевтический потенциал, сочетая быстрое снижение количества бактерий с отсутствием вредных генов вирулентности или устойчивости к антибиотикам.

EC151 был первым фагом *Enterobacter*, у которого был обнаружен полный путь синтеза *preQ0*. ДНК фага демонстрировала устойчивость к рестрикционным ферментам, распознающим последовательности, содержащие гуанин (например, *KpnI* и *Acc65I*), что указывает на эффективную защиту от бактериальных ферментов посредством модификации оснований. Путь синтеза *preQ0*, редкий среди фагов, был консервативен среди родственных родов, инфицирующих *Vibrio*, *Escherichia* и *Pantoea*, что предполагает его эволюционную важность. EC152, в свою очередь, кодировал полностью функциональный путь восстановления NAD^+ , ранее известный в основном у бактерий и редко встречающийся у фагов. Это, возможно, позволило фагу производить собственный NAD^+ и противодействовать бактериальным антифаговым системам, истощающим NAD^+ , например, систему Thoeris.

Фаг StM171 обладает высококонсервативным геномом (>95% нуклеотидной идентичности с близкородственными фагами из разных стран), что указывает на строгий отбор против мутаций и возможный эволюционный тупик. Его низкая литическая активность, вероятно, обусловлена сильной зависимостью от транскрипционной и репликативной среды хозяина. Несмотря на это, StM171 продемонстрировал потенциал для модуляции устойчивости к антибиотикам у *S. maltophilia*. Эксперименты по разработке бактериальных мутантов, устойчивых к StM171, выявили штаммо- и антибиотикоспецифические эффекты: фагорезистентные мутанты некоторых клинических штаммов (группа А) не приобрели чувствительность к β -лактамам, в то время как мутанты штаммов из окружающей среды (группа В) восстановили чувствительность к пяти β -лактамам, что может быть связано с мутациями, нарушающими работу эффлюксных насосов или проницаемость мембраны.

Кроме того, в экспериментах с биопленками StM171 снижал ингибирующее действие гентамицина на штаммы группы В, но не оказывал влияния на клинические штаммы группы А, а в отдельных случаях слабо усиливал действие тетрациклина и левофлоксацина. Эти данные подтверждают, что даже слаболитические фаги могут специфически, в зависимости от штамма и антибиотика, модулировать чувствительность к антибиотикам и образование биопленок. Это показывает возможность использования слаболитических фагов для предварительной сенсibilизации бактерий перед антибиотикотерапией.

Для повышения инфекционности слаболитических фагов при сохранении способности инфицировать различные бактериальные клоны были протестированы сценарии эволюционной адаптации в течение пяти и десяти пассажей в четырех условиях: (А) только фаг, (В) фаг + наивный хозяин, (С) фаговый коктейль без наивного хозяина и (D) фаговый коктейль + наивный хозяин. Продолжительность адаптации и наличие наивных хозяев оказались важными факторами. Увеличение продолжительности до 10 пассажей способствовало отбору более универсальных популяций фагов. Адаптация фагов в присутствии наивного хозяина неизменно приводила к появлению более универсальных фагов. Конкуренция с другим фагом оказывала различное воздействие на разные фаги: она улучшала адаптацию фагов EC151 и EC152, но

препятствовала адаптации фага StM171 и приводила к неоднозначным результатам для фага StenM174.

Анализ 72 геномов *S. maltophilia* выявил в среднем около пяти антифаговых систем на штамм, что сопоставимо с *E. coli*. Было обнаружено 72 типа различных систем, включая RecBCD, Gabija, Pycsar, BREX, RM, и другие. Некоторые системы, такие как RecBCD, BREX I и Abei-4, были широко распространены и консервативны. В то же время другие (включая RM, Gabija и Septu) демонстрировали при широком распространении высокую изменчивость, отражающую непрерывную адаптацию к местному давлению фагов.

Кроме того, четыре из 27 защитных островков содержали 60% всех обнаруженных антифаговых систем. Идентичные островки со схожими паттернами заполнения были обнаружены в таксономически отдаленных штаммах из разных мест, что позволяет предположить, что эти консервативные регионы являются эффективными мишенями для улучшения результатов фаготерапии. Все это подчеркивает, что сосредоточение внимания на консервативных регионах с плотными кластерами защитных систем может быть многообещающей стратегией для рационального проектирования фагов-кандидатов и для поиска новых защитных систем.

В целом, данная диссертация демонстрирует, что даже слаболитические фаги могут обладать терапевтическим потенциалом как за счет модуляции устойчивости к антибиотикам и антибиоплёночной активности, так и за счет их эволюционной адаптации. Обнаруженные системы контрзащиты (preQ0 и система восстановления NAD+) и идентифицированные защитные острова у *S. maltophilia* представляют собой мишени для разработки более универсальных фаговых коктейлей. Важными направлениями будущей работы являются клонирование этих систем в других фагах, и экспериментальная проверка биоинформатически предсказанных систем защиты, что позволит перейти от описательного к рациональному проектированию фаговых препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Исследование характеристик фагов *Enterobacter cloacae* EC151 и EC152, *Aeromonas popoffii* AerP_220 и *Stenotrophomonas maltophilia* StM171 показало, что:
 - фаги EC151 и StM171 имеют сифовирусную морфологию, фаг EC152 является миовирусом, а фаг AerP_220 – подовирусом;
 - фаг AerP_220 был единственным фагом, который обладал высокой литической активностью;
 - все фаги обладали узким спектром хозяйской специфичности.
2. Фаг StM171 подавлял образование биопленок у трех штаммов *S. maltophilia* и усиливал у одного штамма; фаг способствовал восстановлению чувствительности к бета-лактамам и увеличению резистентности к эритромицину у новосибирских штаммов группы В.
3. Анализ полногеномных последовательностей фагов EC151, EC152, AerP_220 и StM171 показал, что:
 - геном фага EC151 содержит 58 ORF, включая полный кластер генов модификации 7-деазагуанина, что вероятно защищает его от бактериальных эндонуклеаз; фаг EC151 является представителем нового рода;
 - геном фага EC152 содержит 286 ORF и кодирует полный путь восстановления NAD⁺, а также метилтрансферазу и RII локус, которые вероятно защищают его от бактериальных антифаговых систем; фаг EC152 входит в род *Seunavirus*;
 - геном фага AerP_220 включает 59 ORF; фаг является представителем нового рода *Yinyavirus* и нового подсемейства *Tolavirinae*;
 - геном фага StM171 включает 59 ORF и не содержит генов ДНК- и РНК-полимераз; фаг StM171 является представителем нового вида *Nordvirus*.
4. Изучение коэволюции фагов EC151, EC152, StM171 и StenM174 с их хозяевами показало, что для фагов *E. cloacae* присутствие эволюционно наивных хозяев и/или конкурирующего фага обеспечило специфичность ко всем адаптационным вариантам бактерий и увеличение инфекционности,

тогда как для фагов *S. maltophilia* присутствие только наивного хозяина было более эффективным.

5. Пангеномный анализ *S. maltophilia* выявил 72 системы антифаговой защиты, различающиеся по встречаемости, уровню изменчивости и способу действия; наиболее распространенными являлись системы Wadjet I и RecBCD. Всего обнаружено 27 островков защиты, четыре из которых (№4, №13, №16 и №27) содержали 60% всех случаев антифаговых систем.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БОЕ/мл	бляшкообразующие единицы в миллилитре
дсДНК	Двухцепочечная ДНК
КОЕ/мл	Колониеобразующие единицы в миллилитре
КЭМТК	Коллекции Экстремофильных Микроорганизмов и Типовых Культур
ИКБФМ СО РАН	
ЛПС	Липополисахарид
МГЭ	Мобильные генетические элементы
МИК	Минимальная ингибирующая концентрация
Об/мин	Оборотов в минуту
оцДНК	Одноцепочечная ДНК
т.п.н.	Тысячи пар нуклеотидов
УФ	Ультрафиолет
ANI	Average nucleotide identity
ARD	Arms race dynamics, Динамика гонки вооружений
VIM	Bacterial StM171-insensitive mutant (VIM), бактериальные мутанты, нечувствительные к StM171
CPS	Capsular polysaccharide, Капсульные полисахариды
FSD	Fluctuating selection dynamics, Флуктуирующая динамика отбора
ICTV	Международный комитет по таксономии вирусов
LB	Luria–Bertani medium, бульон Лурия-Бертани
MOI	Multiplicity of infection, множественность инфекций
OD	Optical density, оптическая плотность
ORF	Open reading frames, открытые рамки считывания
PAM	Protospacer adjacent motif, смежные мотивы протоспейсера
PEG	Polyethylene glycol, полиэтиленгликол
qPCR	Quantities polymerase chain reaction, Количественный ПЦР
RM	Restriction modification systems, системы рестрикционной модификации у бактерий
SSR	Simple sequence repeats, простые повторения последовательностей
TA	Toxin-antitoxin systems, системы токсин-антитоксин у бактерий

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huff, W.E.; Huff, G.R.; Rath, N.C.; Balog, J.M.; Donoghue, A.M. Therapeutic Efficacy of Bacteriophage and Baytril (Enrofloxacin) Individually and in Combination to Treat Colibacillosis in Broilers¹. *Poultry Science* **2004**, *83*, 1944–1947, doi:10.1093/ps/83.12.1944.
2. Hassan, A.Y.; Lin, J.T.; Ricker, N.; Anany, H. The Age of Phage: Friend or Foe in the New Dawn of Therapeutic and Biocontrol Applications? *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 199, doi:10.3390/ph14030199.
3. Furfaro, L.L.; Payne, M.S.; Chang, B.J. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 376, doi:10.3389/fcimb.2018.00376.
4. Egado, J.E.; Costa, A.R.; Aparicio-Maldonado, C.; Haas, P.-J.; Brouns, S.J.J. Mechanisms and Clinical Importance of Bacteriophage Resistance. *FEMS Microbiology Reviews* **2022**, *46*, fuab048, doi:10.1093/femsre/fuab048.
5. Habusha, M.; Tzipilevich, E.; Fiyaksel, O.; Ben-Yehuda, S. A Mutant Bacteriophage Evolved to Infect Resistant Bacteria Gained a Broader Host Range. *Molecular Microbiology* **2019**, *111*, 1463–1475, doi:10.1111/mmi.14231.
6. Niault, T.; Van Houte, S.; Westra, E.; Swarts, D.C. Evolution and Ecology of Anti-Defence Systems in Phages and Plasmids. *Current Biology* **2025**, *35*, R32–R44, doi:10.1016/j.cub.2024.11.033.
7. Zhang, S.; Chu, M.; Sun, X. The Arms Race in Bacteria-Phage Interaction: Deciphering Bacteria Defense and Phage Anti-Defense Mechanisms through Metagenomics. *Front. Microbiol.* **2025**, *16*, 1687307, doi:10.3389/fmicb.2025.1687307.
8. Pieter-Jan, C.; Rob, L. Introduction to Bacteriophage Biology and Diversity. In *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens*; Sabour, P.M., Griffiths, M.W., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2014; pp. 11–29 ISBN 978-1-68367-126-8.
9. Ackermann, H.-W. Bacteriophage Observations and Evolution. *Research in Microbiology* **2003**, *154*, 245–251, doi:10.1016/S0923-2508(03)00067-6.
10. Comeau, A.M.; Hatfull, G.F.; Krisch, H.M.; Lindell, D.; Mann, N.H.; Prangishvili, D. Exploring the Prokaryotic Virosphere. *Res Microbiol* **2008**, *159*, 306–313, doi:10.1016/j.resmic.2008.05.001.
11. Engelkirk, P.G.; Duben-Engelkirk, J.L.; Burton, G.R.W. *Burton's Microbiology for the Health Sciences*; 9th ed.; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2011; ISBN 978-1-60547-673-5.
12. Callanan, J.; Stockdale, S.; Shkoporov, A.; Draper, L.; Ross, R.; Hill, C. RNA Phage Biology in a Metagenomic Era. *Viruses* **2018**, *10*, 386, doi:10.3390/v10070386.
13. Al-Shayeb, B.; Sachdeva, R.; Chen, L.-X.; Ward, F.; Munk, P.; Devoto, A.; Castelle, C.J.; Olm, M.R.; Bouma-Gregson, K.; Amano, Y.; et al. Clades of Huge Phages from across Earth's Ecosystems. *Nature* **2020**, *578*, 425–431, doi:10.1038/s41586-020-2007-4.
14. Turner, D.; Shkoporov, A.N.; Lood, C.; Millard, A.D.; Dutilh, B.E.; Alfenas-Zerbini, P.; Van Zyl, L.J.; Aziz, R.K.; Oksanen, H.M.; Poranen, M.M.; et al. Abolishment of Morphology-Based Taxa and Change to Binomial Species

- Names: 2022 Taxonomy Update of the ICTV Bacterial Viruses Subcommittee. *Arch Virol* **2023**, *168*, 74, doi:10.1007/s00705-022-05694-2.
15. Morozova, V.; Babkin, I.; Kozlova, Y.; Tikunov, A.; Ushakova, T.; Bardasheva, A.; Fedorets, V.; Zhirakovskaya, E.; Tikunova, N. Isolation, Characterization and Genomic Analysis of a Novel Jumbo Phage, AerS_266, That Infects *Aeromonas Salmonicida*. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2649, doi:10.3390/microorganisms11112649.
 16. Morozova, V.; Bokovaya, O.; Kozlova, Yu.; Kurilshikov, A.; Babkin, I.; Tupikin, A.; Bondar, A.; Ryabchikova, E.; Brayanskaya, A.; Peltek, S.; et al. A Novel Thermophilic *Aeribacillus* Bacteriophage AP45 Isolated from the Valley of Geysers, Kamchatka: Genome Analysis Suggests the Existence of a New Genus within the Siphoviridae Family. *Extremophiles* **2019**, *23*, 599–612, doi:10.1007/s00792-019-01119-2.
 17. Morozova, V.V.; Yakubovskij, V.I.; Baykov, I.K.; Kozlova, Y.N.; Tikunov, A.Yu.; Babkin, I.V.; Bardasheva, A.V.; Zhirakovskaya, E.V.; Tikunova, N.V. StenM_174: A Novel Podophage That Infects a Wide Range of *Stenotrophomonas* Spp. and Suggests a New Subfamily in the Family Autographiviridae. *Viruses* **2023**, *16*, 18, doi:10.3390/v16010018.
 18. Hatfull, G.F.; Hendrix, R.W. Bacteriophages and Their Genomes. *Current Opinion in Virology* **2011**, *1*, 298–303, doi:10.1016/j.coviro.2011.06.009.
 19. Hatfull, G.F. Bacteriophage Genomics. *Current Opinion in Microbiology* **2008**, *11*, 447–453, doi:10.1016/j.mib.2008.09.004.
 20. Pope, W.H.; Jacobs-Sera, D.; Russell, D.A.; Peebles, C.L.; Al-Atrache, Z.; Alcoser, T.A.; Alexander, L.M.; Alfano, M.B.; Alford, S.T.; Amy, N.E.; et al. Expanding the Diversity of Mycobacteriophages: Insights into Genome Architecture and Evolution. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e16329, doi:10.1371/journal.pone.0016329.
 21. Kwan, T.; Liu, J.; Dubow, M.; Gros, P.; Pelletier, J. Comparative Genomic Analysis of 18 *Pseudomonas Aeruginosa* Bacteriophages. *J Bacteriol* **2006**, *188*, 1184–1187, doi:10.1128/JB.188.3.1184-1187.2006.
 22. Kwan, T.; Liu, J.; DuBow, M.; Gros, P.; Pelletier, J. The Complete Genomes and Proteomes of 27 *Staphylococcus Aureus* Bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 5174–5179, doi:10.1073/pnas.0501140102.
 23. Botstein, D. A THEORY OF MODULAR EVOLUTION FOR BACTERIOPHAGES. *Ann NY Acad Sci* **1980**, *354*, 484–491, doi:10.1111/j.1749-6632.1980.tb27987.x.
 24. *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*; Harper, D.R., Abedon, S.T., Burrowes, B.H., McConville, M.L., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2021; ISBN 978-3-319-41985-5.
 25. Comeau, A.M.; Bertrand, C.; Letarov, A.; Tétart, F.; Krisch, H.M. Modular Architecture of the T4 Phage Superfamily: A Conserved Core Genome and a Plastic Periphery. *Virology* **2007**, *362*, 384–396, doi:10.1016/j.viro.2006.12.031.
 26. Swenson, K.M.; Guertin, P.; Deschênes, H.; Bergeron, A. Reconstructing the Modular Recombination History of *Staphylococcus Aureus* Phages. *BMC Bioinformatics* **2013**, *14*, S17, doi:10.1186/1471-2105-14-S15-S17.
 27. Pedulla, M.L.; Ford, M.E.; Houtz, J.M.; Karthikeyan, T.; Wadsworth, C.; Lewis, J.A.; Jacobs-Sera, D.; Falbo, J.; Gross, J.; Pannunzio, N.R.; et al. Origins of

- Highly Mosaic Mycobacteriophage Genomes. *Cell* **2003**, *113*, 171–182, doi:10.1016/S0092-8674(03)00233-2.
28. De Paepe, M.; Hutinet, G.; Son, O.; Amarir-Bouhram, J.; Schbath, S.; Petit, M.-A. Temperate Phages Acquire DNA from Defective Prophages by Relaxed Homologous Recombination: The Role of Rad52-Like Recombinases. *PLoS Genet* **2014**, *10*, e1004181, doi:10.1371/journal.pgen.1004181.
 29. Hendrix, R.W. Bacteriophages: Evolution of the Majority. *Theoretical Population Biology* **2002**, *61*, 471–480, doi:10.1006/tpbi.2002.1590.
 30. Drulis-Kawa, Z.; Majkowska-Skrobek, G.; Maciejewska, B.; Delattre, A.-S.; Lavigne, R. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. *CPPS* **2012**, *13*, 699–722, doi:10.2174/138920312804871193.
 31. Romero-Calle, D.; Guimarães Benevides, R.; Góes-Neto, A.; Billington, C. Bacteriophages as Alternatives to Antibiotics in Clinical Care. *Antibiotics* **2019**, *8*, 138, doi:10.3390/antibiotics8030138.
 32. Abubakar, S. Novel Uses of Bacteriophages in the Treatment of Human Infections and Antibiotic Resistance. *AJBIO* **2016**, *4*, 34, doi:10.11648/j.ajbio.20160403.13.
 33. Ranquet, C.; Toussaint, A.; de Jong, H.; Maenhaut-Michel, G.; Geiselmann, J. Control of Bacteriophage Mu Lysogenic Repression. *Journal of Molecular Biology* **2005**, *353*, 186–195, doi:10.1016/j.jmb.2005.08.015.
 34. Kim, E.J.; Lee, D.; Moon, S.H.; Lee, C.H.; Kim, D.W. CTX Prophages in *Vibrio Cholerae* O1 Strains. *J Microbiol Biotechnol* **2014**, *24*, 725–731, doi:10.4014/jmb.1403.03063.
 35. McCabe, B.C.; Pawlowski, D.R.; Koudelka, G.B. The Bacteriophage 434 Repressor Dimer Preferentially Undergoes Autoproteolysis by an Intramolecular Mechanism. *J Bacteriol* **2005**, *187*, 5624–5630, doi:10.1128/JB.187.16.5624-5630.2005.
 36. Tom, E.F.; Molineux, I.J.; Paff, M.L.; Bull, J.J. Experimental Evolution of UV Resistance in a Phage. *PeerJ* **2018**, *6*, e5190, doi:10.7717/peerj.5190.
 37. Turner, D.; Kropinski, A.M.; Adriaenssens, E.M. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses* **2021**, *13*, 506, doi:10.3390/v13030506.
 38. Nishimura, Y.; Yoshida, T.; Kuronishi, M.; Uehara, H.; Ogata, H.; Goto, S. ViPTree: The Viral Proteomic Tree Server. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 2379–2380, doi:10.1093/bioinformatics/btx157.
 39. Bin Jang, H.; Bolduc, B.; Zablocki, O.; Kuhn, J.H.; Roux, S.; Adriaenssens, E.M.; Brister, J.R.; Kropinski, A.M.; Krupovic, M.; Lavigne, R.; et al. Taxonomic Assignment of Uncultivated Prokaryotic Virus Genomes Is Enabled by Gene-Sharing Networks. *Nat Biotechnol* **2019**, *37*, 632–639, doi:10.1038/s41587-019-0100-8.
 40. Chanishvili, N. Chapter 1 - Phage Therapy—History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. In *Advances in Virus Research*; Łobocka, M., Szybalski, W., Eds.; Bacteriophages, Part B; Academic Press, 2012; Vol. 83, pp. 3–40.
 41. Kutateladze, M.; Adamia, R. Bacteriophages as Potential New Therapeutics to Replace or Supplement Antibiotics. *Trends in Biotechnology* **2010**, *28*, 591–595, doi:10.1016/j.tibtech.2010.08.001.

42. Endersen, L.; O'Mahony, J.; Hill, C.; Ross, R.P.; McAuliffe, O.; Coffey, A. Phage Therapy in the Food Industry. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2014**, *5*, 327–349, doi:10.1146/annurev-food-030713-092415.
43. Torres-Barceló, C.; Hochberg, M.E. Evolutionary Rationale for Phages as Complements of Antibiotics. *Trends in Microbiology* **2016**, *24*, 249–256, doi:10.1016/j.tim.2015.12.011.
44. Carlton, R.M.; Noordman, W.H.; Biswas, B.; de Meester, E.D.; Loessner, M.J. Bacteriophage P100 for Control of *Listeria Monocytogenes* in Foods: Genome Sequence, Bioinformatic Analyses, Oral Toxicity Study, and Application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2005**, *43*, 301–312, doi:10.1016/j.yrtph.2005.08.005.
45. Oliveira, M.; Abadias, M.; Colás-Medà, P.; Usall, J.; Viñas, I. Biopreservative Methods to Control the Growth of Foodborne Pathogens on Fresh-Cut Lettuce. *International Journal of Food Microbiology* **2015**, *214*, 4–11, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.015.
46. Pires, D.P.; Melo, L.D.R. In Vitro Activity of Bacteriophages Against Planktonic and Biofilm Populations Assessed by Flow Cytometry. In *Bacteriophage Therapy*; Azeredo, J., Sillankorva, S., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 1693, pp. 33–41 ISBN 978-1-4939-7394-1.
47. Young, R.; Gill, J.J. Phage Therapy Redux—What Is to Be Done? *Science* **2015**, *350*, 1163–1164, doi:10.1126/science.aad6791.
48. Nobrega, F.L.; Costa, A.R.; Kluskens, L.D.; Azeredo, J. Revisiting Phage Therapy: New Applications for Old Resources. *Trends in Microbiology* **2015**, *23*, 185–191, doi:10.1016/j.tim.2015.01.006.
49. Wright, A.; Hawkins, C. h.; Änggård, E. e.; Harper, D. r. A Controlled Clinical Trial of a Therapeutic Bacteriophage Preparation in Chronic Otitis Due to Antibiotic-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*; a Preliminary Report of Efficacy. *Clinical Otolaryngology* **2009**, *34*, 349–357, doi:10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x.
50. Kingwell, K. Bacteriophage Therapies Re-Enter Clinical Trials. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14*, 515–516, doi:10.1038/nrd4695.
51. Crain, C.M.; Kroeker, K.; Halpern, B.S. Interactive and Cumulative Effects of Multiple Human Stressors in Marine Systems. *Ecology Letters* **2008**, *11*, 1304–1315, doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x.
52. Lebeis, S.L.; Kalman, D. Aligning Antimicrobial Drug Discovery with Complex and Redundant Host-Pathogen Interactions. *Cell Host & Microbe* **2009**, *5*, 114–122, doi:10.1016/j.chom.2009.01.008.
53. Verma, V.; Harjai, K.; Chhibber, S. Restricting Ciprofloxacin-Induced Resistant Variant Formation in Biofilm of *Klebsiella Pneumoniae* B5055 by Complementary Bacteriophage Treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2009**, *64*, 1212–1218, doi:10.1093/jac/dkp360.
54. Chhibber, S.; Kaur, T.; Kaur, S. Co-Therapy Using Lytic Bacteriophage and Linezolid: Effective Treatment in Eliminating Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) from Diabetic Foot Infections. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e56022, doi:10.1371/journal.pone.0056022.

55. Pollitt, E.J.G.; West, S.A.; Crusz, S.A.; Burton-Chellew, M.N.; Diggle, S.P. Cooperation, Quorum Sensing, and Evolution of Virulence in *Staphylococcus Aureus*. *Infect Immun* **2014**, *82*, 1045–1051, doi:10.1128/IAI.01216-13.
56. Jousset, A.; Rochat, L.; Péchy-Tarr, M.; Keel, C.; Scheu, S.; Bonkowski, M. Predators Promote Defence of Rhizosphere Bacterial Populations by Selective Feeding on Non-Toxic Cheaters. *ISME J* **2009**, *3*, 666–674, doi:10.1038/ismej.2009.26.
57. Diard, M.; Sellin, M.E.; Dolowschiak, T.; Arnoldini, M.; Ackermann, M.; Hardt, W.-D. Antibiotic Treatment Selects for Cooperative Virulence of *Salmonella Typhimurium*. *Current Biology* **2014**, *24*, 2000–2005, doi:10.1016/j.cub.2014.07.028.
58. Letellier, L. Main Features on Tailed Phage, Host Recognition and DNA Uptake. *Front Biosci* **2004**, *9*, 1228, doi:10.2741/1333.
59. Roux, D.; Danilchanka, O.; Guillard, T.; Cattoir, V.; Aschard, H.; Fu, Y.; Angoulvant, F.; Messika, J.; Ricard, J.-D.; Mekalanos, J.J.; et al. Fitness Cost of Antibiotic Susceptibility during Bacterial Infection. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, doi:10.1126/scitranslmed.aab1621.
60. Fernández-Cuenca, F.; Smani, Y.; Gómez-Sánchez, M.C.; Docobo-Pérez, F.; Caballero-Moyano, F.J.; Domínguez-Herrera, J.; Pascual, A.; Pachón, J. Attenuated Virulence of a Slow-Growing Pandrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Is Associated with Decreased Expression of Genes Encoding the Porins CarO and OprD-Like. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2011**, *38*, 548–549, doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.08.002.
61. Laanto, E.; Bamford, J.K.H.; Laakso, J.; Sundberg, L.-R. Phage-Driven Loss of Virulence in a Fish Pathogenic Bacterium. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e53157, doi:10.1371/journal.pone.0053157.
62. Evans, T.J.; Trauner, A.; Komitopoulou, E.; Salmond, G.P.C. Exploitation of a New Flagellatropic Phage of *Erwinia* for Positive Selection of Bacterial Mutants Attenuated in Plant Virulence: Towards Phage Therapy. *Journal of Applied Microbiology* **2010**, *108*, 676–685, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04462.x.
63. Seed, K.D.; Yen, M.; Shapiro, B.J.; Hilaire, I.J.; Charles, R.C.; Teng, J.E.; Ivers, L.C.; Boncy, J.; Harris, J.B.; Camilli, A. Evolutionary Consequences of Intra-Patient Phage Predation on Microbial Populations. *eLife* **2014**, *3*, e03497, doi:10.7554/eLife.03497.
64. Beceiro, A.; Tomás, M.; Bou, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: A Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clin Microbiol Rev* **2013**, *26*, 185–230, doi:10.1128/CMR.00059-12.
65. Chan, B.K.; Siström, M.; Wertz, J.E.; Kortright, K.E.; Narayan, D.; Turner, P.E. Phage Selection Restores Antibiotic Sensitivity in MDR *Pseudomonas Aeruginosa*. *Sci Rep* **2016**, *6*, 26717, doi:10.1038/srep26717.
66. Xuan, G.; Lin, H.; Kong, J.; Wang, J. Phage Resistance Evolution Induces the Sensitivity of Specific Antibiotics in *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *Microbiol Spectr* **2022**, *10*, e0135622, doi:10.1128/spectrum.01356-22.
67. Gurney, J.; Pradier, L.; Griffin, J.S.; Gougat-Barbera, C.; Chan, B.K.; Turner, P.E.; Kaltz, O.; Hochberg, M.E. Phage Steering of Antibiotic-Resistance Evolution in the Bacterial Pathogen, *Pseudomonas Aeruginosa*. *Evolution, Medicine, and Public Health* **2020**, *2020*, 148–157, doi:10.1093/emph/eoaa026.

68. Koderi Valappil, S.; Shetty, P.; Deim, Z.; Urbán, E.; Patai, R.; Polgár, T.; Schneider, G.; Kovács, T.; Rákhely, G. Survival Comes at a Cost: A Coevolution of Phage and Its Host Leads to Phage Resistance and Antibiotic Sensitivity of *Pseudomonas Aeruginosa* Multidrug Resistant Strains. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fmicb.2021.783722.
69. McGee, L.W.; Barhoush, Y.; Shima, R.; Hennessy, M. Phage-Resistant Mutations Impact Bacteria Susceptibility to Future Phage Infections and Antibiotic Response. *Ecology and Evolution* **2023**, *13*, e9712, doi:10.1002/ece3.9712.
70. Burmeister, A.R.; Fortier, A.; Roush, C.; Lessing, A.J.; Bender, R.G.; Barahman, R.; Grant, R.; Chan, B.K.; Turner, P.E. Pleiotropy Complicates a Trade-off between Phage Resistance and Antibiotic Resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117*, 11207–11216, doi:10.1073/pnas.1919888117.
71. Drummond, A.J.; Pybus, O.G.; Rambaut, A.; Forsberg, R.; Rodrigo, A.G. Measurably Evolving Populations. *Trends in Ecology & Evolution* **2003**, *18*, 481–488, doi:10.1016/S0169-5347(03)00216-7.
72. Sanjuán, R.; Nebot, M.R.; Chirico, N.; Mansky, L.M.; Belshaw, R. Viral Mutation Rates. *J Virol* **2010**, *84*, 9733–9748, doi:10.1128/JVI.00694-10.
73. Cuevas, J.M.; Duffy, S.; Sanjuán, R. Point Mutation Rate of Bacteriophage Φ X174. *Genetics* **2009**, *183*, 747–749, doi:10.1534/genetics.109.106005.
74. Kupczok, A.; Neve, H.; Huang, K.D.; Hoepfner, M.P.; Heller, K.J.; Franz, C.M.A.P.; Dagan, T. Rates of Mutation and Recombination in Siphoviridae Phage Genome Evolution over Three Decades. *Molecular Biology and Evolution* **2018**, *35*, 1147–1159, doi:10.1093/molbev/msy027.
75. Kupczok, A.; Dagan, T. Rates of Molecular Evolution in a Marine *Synechococcus* Phage Lineage. *Viruses* **2019**, *11*, 720, doi:10.3390/v11080720.
76. Minot, S.; Bryson, A.; Chehoud, C.; Wu, G.D.; Lewis, J.D.; Bushman, F.D. Rapid Evolution of the Human Gut Virome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 12450–12455, doi:10.1073/pnas.1300833110.
77. Sanjuán, R.; Moya, A.; Elena, S.F. The Distribution of Fitness Effects Caused by Single-Nucleotide Substitutions in an RNA Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 8396–8401, doi:10.1073/pnas.0400146101.
78. Carrasco, P.; De La Iglesia, F.; Elena, S.F. Distribution of Fitness and Virulence Effects Caused by Single-Nucleotide Substitutions in *Tobacco Etch Virus*. *J Virol* **2007**, *81*, 12979–12984, doi:10.1128/JVI.00524-07.
79. Ridley, M. *Evolution*; 1. Aufl.; Blackwell Scientific Publ: Boston, 1993; ISBN 978-0-632-03481-9.
80. Drulis-Kawa, Z.; Majkowska-Skrobek, G.; Maciejewska, B. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. *Curr Med Chem* **2015**, *22*, 1757–1773, doi:10.2174/0929867322666150209152851.
81. Pfeifer, E.; Rocha, E.P.C. Phage-Plasmids Promote Recombination and Emergence of Phages and Plasmids. *Nat Commun* **2024**, *15*, 1545, doi:10.1038/s41467-024-45757-3.
82. Flores, C.O.; Meyer, J.R.; Valverde, S.; Farr, L.; Weitz, J.S. Statistical Structure of Host–Phage Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, doi:10.1073/pnas.1101595108.
83. Roux, S.; Hawley, A.K.; Torres Beltran, M.; Scofield, M.; Schwientek, P.; Stepanauskas, R.; Woyke, T.; Hallam, S.J.; Sullivan, M.B. Ecology and Evolution

- of Viruses Infecting Uncultivated SUP05 Bacteria as Revealed by Single-Cell- and Meta-Genomics. *eLife* **2014**, 3, e03125, doi:10.7554/eLife.03125.
84. Díaz-Muñoz, S.L. Viral Coinfection Is Shaped by Host Ecology and Virus–Virus Interactions across Diverse Microbial Taxa and Environments. *Virus Evolution* **2017**, 3, doi:10.1093/ve/vex011.
 85. Shcherbakov, V.P.; Plugina, L.A.; Nesheva, M.A. Genetic Recombination in Bacteriophage T4: Single-Burst Analysis of Cosegregants and Evidence in Favor of a Splice/Patch Coupling Model. *Genetics* **1992**, 131, 769–781, doi:10.1093/genetics/131.4.769.
 86. Martinsohn, J.T.; Radman, M.; Petit, M.-A. The λ Red Proteins Promote Efficient Recombination between Diverged Sequences: Implications for Bacteriophage Genome Mosaicism. *PLoS Genet* **2008**, 4, e1000065, doi:10.1371/journal.pgen.1000065.
 87. Szczepańska, A.K. Bacteriophage-Encoded Functions Engaged in Initiation of Homologous Recombination Events. *Critical Reviews in Microbiology* **2009**, 35, 197–220, doi:10.1080/10408410902983129.
 88. Hendrix, R.W.; Smith, M.C.; Burns, R.N.; Ford, M.E.; Hatfull, G.F. Evolutionary Relationships among Diverse Bacteriophages and Prophages: All the World’s a Phage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, 2192–2197, doi:10.1073/pnas.96.5.2192.
 89. Georjon, H.; Bernheim, A. The Highly Diverse Antiphage Defence Systems of Bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2023**, 21, 686–700, doi:10.1038/s41579-023-00934-x.
 90. Koskella, B.; Lin, D.M.; Buckling, A.; Thompson, J.N. The Costs of Evolving Resistance in Heterogeneous Parasite Environments. *Proc Biol Sci* **2012**, 279, 1896–1903, doi:10.1098/rspb.2011.2259.
 91. van Houte, S.; Buckling, A.; Westra, E.R. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **2016**, 80, 745–763, doi:10.1128/MMBR.00011-16.
 92. Ernits, K.; Saha, C.K.; Brodiazhenko, T.; Chouhan, B.; Shenoy, A.; Buttress, J.A.; Duque-Pedraza, J.J.; Bojar, V.; Nakamoto, J.A.; Kurata, T.; et al. The Structural Basis of Hyperpromiscuity in a Core Combinatorial Network of Type II Toxin-Antitoxin and Related Phage Defense Systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2023**, 120, e2305393120, doi:10.1073/pnas.2305393120.
 93. Erni, B.; Zanolari, B.; Kocher, H.P. The Mannose Permease of Escherichia Coli Consists of Three Different Proteins. Amino Acid Sequence and Function in Sugar Transport, Sugar Phosphorylation, and Penetration of Phage Lambda DNA. *J Biol Chem* **1987**, 262, 5238–5247.
 94. Facilitation of Bacteriophage Lambda DNA Injection by Inner Membrane Proteins of the Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System (PTS)-Web of Science Core Collection Available online: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000168494500005?SID=EUW1ED0DDCRhbL5I5Ea93FD4Ka7f6> (accessed on 23 August 2024).
 95. Gupta, A.; Peng, S.; Leung, C.Y.; Borin, J.M.; Medina, S.J.; Weitz, J.S.; Meyer, J.R. Leapfrog Dynamics in Phage-Bacteria Coevolution Revealed by Joint

- Analysis of Cross-Infection Phenotypes and Whole Genome Sequencing. *Ecology Letters* **2022**, *25*, 876–888, doi:10.1111/ele.13965.
96. Murtazaliev, K.; Mu, A.; Petrovskaya, A.; Finn, R.D. The Growing Repertoire of Phage Anti-Defence Systems. *Trends in Microbiology* **2024**, S0966842X24001367, doi:10.1016/j.tim.2024.05.005.
 97. Tesson, F.; Hervé, A.; Mordret, E.; Touchon, M.; d’Humières, C.; Cury, J.; Bernheim, A. Systematic and Quantitative View of the Antiviral Arsenal of Prokaryotes. *Nat Commun* **2022**, *13*, 2561, doi:10.1038/s41467-022-30269-9.
 98. Gerner-Smidt, P.; Bruun, B.; Arpi, M.; Schmidt, J. Diversity of Nosocomial *Xanthomonas Maltophilia* (*Stenotrophomonas Maltophilia*) as Determined by Ribotyping. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1995**, *14*, 137–140, doi:10.1007/BF02111874.
 99. Moore, E.R.B.; Krüger, A.S.; Hauben, L.; Seal, S.E.; Baere, R.; Wachter, R.; Timmis, K.N.; Swings, J. 16S rRNA Gene Sequence Analyses and Inter- and Intrageneric Relationships of *Xanthomonas* Species and *Stenotrophomonas Maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters* **2006**, *151*, 145–153, doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12563.x.
 100. Berg, G.; Roskot, N.; Smalla, K. Genotypic and Phenotypic Relationships between Clinical and Environmental Isolates of *Stenotrophomonas Maltophilia*. *J Clin Microbiol* **1999**, *37*, 3594–3600, doi:10.1128/JCM.37.11.3594-3600.1999.
 101. Hochhauser, D.; Millman, A.; Sorek, R. The Defense Island Repertoire of the *Escherichia Coli* Pan-Genome. *PLoS Genet* **2023**, *19*, e1010694, doi:10.1371/journal.pgen.1010694.
 102. Johnson, M.C.; Laderman, E.; Huiting, E.; Zhang, C.; Davidson, A.; Bondy-Denomy, J. Core Defense Hotspots within *Pseudomonas Aeruginosa* Are a Consistent and Rich Source of Anti-Phage Defense Systems. *Nucleic Acids Research* **2023**, *51*, 4995–5005, doi:10.1093/nar/gkad317.
 103. Laanto, E.; Mäkelä, K.; Hoikkala, V.; Ravantti, J.J.; Sundberg, L.-R. Adapting a Phage to Combat Phage Resistance. *Antibiotics (Basel)* **2020**, *9*, 291, doi:10.3390/antibiotics9060291.
 104. Guegler, C.K.; Teodoro, G.I.C.; Srikant, S.; Chetlapalli, K.; Doering, C.R.; Ghose, D.A.; Laub, M.T. A Phage-Encoded RNA-Binding Protein Inhibits the Antiviral Activity of a Toxin-Antitoxin System. *Nucleic Acids Res* **2024**, *52*, 1298–1312, doi:10.1093/nar/gkad1207.
 105. Hibstu, Z.; Belew, H.; Akelew, Y.; Mengist, H.M. Phage Therapy: A Different Approach to Fight Bacterial Infections. *Biologics* **2022**, *16*, 173–186, doi:10.2147/BTT.S381237.
 106. Brockhurst, M.A.; Chapman, T.; King, K.C.; Mank, J.E.; Paterson, S.; Hurst, G.D.D. Running with the Red Queen: The Role of Biotic Conflicts in Evolution. *Proc. R. Soc. B.* **2014**, *281*, 20141382, doi:10.1098/rspb.2014.1382.
 107. Lenski, R.E.; Levin, B.R. Constraints on the Coevolution of Bacteria and Virulent Phage: A Model, Some Experiments, and Predictions for Natural Communities. *The American Naturalist* **1985**, *125*, 585–602.
 108. Wright, R.C.T.; Friman, V.-P.; Smith, M.C.M.; Brockhurst, M.A. Cross-Resistance Is Modular in Bacteria–Phage Interactions. *PLoS Biol* **2018**, *16*, e2006057, doi:10.1371/journal.pbio.2006057.

109. Bergelson, J.; Kreitman, M.; Stahl, E.A.; Tian, D. Evolutionary Dynamics of Plant R -Genes. *Science* **2001**, *292*, 2281–2285, doi:10.1126/science.1061337.
110. Zhao, Y.; Shu, M.; Zhang, L.; Zhong, C.; Liao, N.; Wu, G. Phage-Driven Coevolution Reveals Trade-off between Antibiotic and Phage Resistance in *Salmonella Anatum*. *ISME Communications* **2024**, *4*, doi:10.1093/ismeco/ycae039.
111. Borin, J.M.; Lee, J.J.; Lucia-Sanz, A.; Gerbino, K.R.; Weitz, J.S.; Meyer, J.R. Rapid Bacteria-Phage Coevolution Drives the Emergence of Multiscale Networks. *Science* **2023**, *382*, 674–678, doi:10.1126/science.adi5536.
112. Schenk, H.; Schulenburg, H.; Traulsen, A. How Long Do Red Queen Dynamics Survive under Genetic Drift? A Comparative Analysis of Evolutionary and Eco-Evolutionary Models. *BMC Evol Biol* **2020**, *20*, 8, doi:10.1186/s12862-019-1562-5.
113. Gómez, P.; Buckling, A. Bacteria-Phage Antagonistic Coevolution in Soil. *Science* **2011**, *332*, 106–109, doi:10.1126/science.1198767.
114. Marantos, A.; Mitarai, N.; Sneppen, K. From Kill the Winner to Eliminate the Winner in Open Phage-Bacteria Systems. *PLoS Comput Biol* **2022**, *18*, e1010400, doi:10.1371/journal.pcbi.1010400.
115. Thingstad, T.F. Elements of a Theory for the Mechanisms Controlling Abundance, Diversity, and Biogeochemical Role of Lytic Bacterial Viruses in Aquatic Systems. *Limnology & Oceanography* **2000**, *45*, 1320–1328, doi:10.4319/lo.2000.45.6.1320.
116. Silveira, C.B.; Rohwer, F.L. Piggyback-the-Winner in Host-Associated Microbial Communities. *npj Biofilms Microbiomes* **2016**, *2*, 1–5, doi:10.1038/npjbiofilms.2016.10.
117. Guerin, E.; Hill, C. Shining Light on Human Gut Bacteriophages. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10*, 481, doi:10.3389/fcimb.2020.00481.
118. Mills, S.; Shanahan, F.; Stanton, C.; Hill, C.; Coffey, A.; Ross, R.P. Movers and Shakers. *Gut Microbes* **2013**, *4*, 4–16, doi:10.4161/gmic.22371.
119. De Paepe, M.; Leclerc, M.; Tinsley, C.R.; Petit, M.-A. Bacteriophages: An Underestimated Role in Human and Animal Health? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, doi:10.3389/fcimb.2014.00039.
120. Brockhurst, M.A.; Morgan, A.D.; Fenton, A.; Buckling, A. Experimental Coevolution with Bacteria and Phage. *Infection, Genetics and Evolution* **2007**, *7*, 547–552, doi:10.1016/j.meegid.2007.01.005.
121. Hall, A.R.; Scanlan, P.D.; Morgan, A.D.; Buckling, A. Host-Parasite Coevolutionary Arms Races Give Way to Fluctuating Selection: Bacteria-Phage Coevolutionary Dynamics. *Ecology Letters* **2011**, *14*, 635–642, doi:10.1111/j.1461-0248.2011.01624.x.
122. Koskella, B. Phage-Mediated Selection on Microbiota of a Long-Lived Host. *Current Biology* **2013**, *23*, 1256–1260, doi:10.1016/j.cub.2013.05.038.
123. Rendueles, O.; De Sousa, J.A.; Rocha, E.P. Competition between Lysogenic and Sensitive Bacteria Is Determined by the Fitness Costs of the Different Emerging Phage-Resistance Strategies. *eLife* **2023**, *12*, e83479, doi:10.7554/eLife.83479.
124. Betts, A.; Kaltz, O.; Hochberg, M.E. Contrasted Coevolutionary Dynamics between a Bacterial Pathogen and Its Bacteriophages. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 11109–11114, doi:10.1073/pnas.1406763111.
125. Bono, L.M.; Gensel, C.L.; Pfennig, D.W.; Burch, C.L. Competition and the Origins of Novelty: Experimental Evolution of Niche-Width Expansion in a Virus. *Biology Letters* **2013**, *9*, 20120616, doi:10.1098/rsbl.2012.0616.
 126. Buckling, A.; Rainey, P.B.. Antagonistic Coevolution between a Bacterium and a Bacteriophage. *Proc. R. Soc. Lond. B* **2002**, *269*, 931–936, doi:10.1098/rspb.2001.1945.
 127. Buckling, A.; Wei, Y.; Massey, R.C.; Brockhurst, M.A.; Hochberg, M.E. Antagonistic Coevolution with Parasites Increases the Cost of Host Deleterious Mutations. *Proc. R. Soc. B.* **2006**, *273*, 45–49, doi:10.1098/rspb.2005.3279.
 128. Kortright, K.E.; Chan, B.K.; Evans, B.R.; Turner, P.E. Arms Race and Fluctuating Selection Dynamics in *Pseudomonas Aeruginosa* Bacteria Coevolving with Phage OMKO1. *J of Evolutionary Biology* **2022**, *35*, 1475–1487, doi:10.1111/jeb.14095.
 129. Gurney, J.; Aldakak, L.; Betts, A.; Gougat-Barbera, C.; Poisot, T.; Kaltz, O.; Hochberg, M.E. Network Structure and Local Adaptation in Co-Evolving Bacteria–Phage Interactions. *Molecular Ecology* **2017**, *26*, 1764–1777, doi:10.1111/mec.14008.
 130. Betts, A.; Gray, C.; Zelek, M.; MacLean, R.C.; King, K.C. High Parasite Diversity Accelerates Host Adaptation and Diversification. *Science* **2018**, *360*, 907–911, doi:10.1126/science.aam9974.
 131. Rabiey, M.; Grace, E.R.; Pawlos, P.; Bihi, M.; Ahmed, H.; Hampson, G.E.; Al Riyami, A.; Alharbi, L.; Sanchez-Lucas, R.; Korotania, N.; et al. Coevolutionary Analysis of *Pseudomonas Syringae* –Phage Interactions to Help with Rational Design of Phage Treatments. *Microbial Biotechnology* **2024**, *17*, e14489, doi:10.1111/1751-7915.14489.
 132. Paez-Espino, D.; Sharon, I.; Morovic, W.; Stahl, B.; Thomas, B.C.; Barrangou, R.; Banfield, J.F. CRISPR Immunity Drives Rapid Phage Genome Evolution in *Streptococcus Thermophilus*. *mBio* **2015**, *6*, e00262-15, doi:10.1128/mBio.00262-15.
 133. Johnson, C.N.; Palacios Araya, D.; Schink, V.; Islam, M.; Mangalea, M.R.; Decurtis, E.K.; Ngo, T.C.; Palmer, K.L.; Duerkop, B.A. Genetically Distant Bacteriophages Select for Unique Genomic Changes in *Enterococcus Faecalis*. *MicrobiologyOpen* **2022**, *11*, e1273, doi:10.1002/mbo3.1273.
 134. Castledine, M.; Sierocinski, P.; Inglis, M.; Kay, S.; Hayward, A.; Buckling, A.; Padfield, D. Greater Phage Genotypic Diversity Constrains Arms-Race Coevolution. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 834406, doi:10.3389/fcimb.2022.834406.
 135. Holguín, A.V.; Cárdenas, P.; Prada-Peñaranda, C.; Rabelo Leite, L.; Buitrago, C.; Clavijo, V.; Oliveira, G.; Leekitcharoenphon, P.; Møller Aarestrup, F.; Vives, M.J. Host Resistance, Genomics and Population Dynamics in a *Salmonella* Enteritidis and Phage System. *Viruses* **2019**, *11*, 188, doi:10.3390/v11020188.
 136. Sant, D.G.; Woods, L.C.; Barr, J.J.; McDonald, M.J. Host Diversity Slows Bacteriophage Adaptation by Selecting Generalists over Specialists. *Nat Ecol Evol* **2021**, *5*, 350–359, doi:10.1038/s41559-020-01364-1.

137. Blazanin, M.; Turner, P.E. Community Context Matters for Bacteria-Phage Ecology and Evolution. *The ISME Journal* **2021**, *15*, 3119–3128, doi:10.1038/s41396-021-01012-x.
138. Mumford, R.; Friman, V. Bacterial Competition and Quorum-sensing Signalling Shape the Eco-evolutionary Outcomes of Model *in Vitro* Phage Therapy. *Evolutionary Applications* **2017**, *10*, 161–169, doi:10.1111/eva.12435.
139. Johnke, J.; Baron, M.; de Leeuw, M.; Kushmaro, A.; Jurkevitch, E.; Harms, H.; Chatzinotas, A. A Generalist Protist Predator Enables Coexistence in Multitrophic Predator-Prey Systems Containing a Phage and the Bacterial Predator *Bdellovibrio*. *Front. Ecol. Evol.* **2017**, *5*, doi:10.3389/fevo.2017.00124.
140. Alseth, E.O.; Pursey, E.; Luján, A.M.; McLeod, I.; Rollie, C.; Westra, E.R. Bacterial Biodiversity Drives the Evolution of CRISPR-Based Phage Resistance. *Nature* **2019**, *574*, 549–552, doi:10.1038/s41586-019-1662-9.
141. Paterson, S.; Vogwill, T.; Buckling, A.; Benmayor, R.; Spiers, A.J.; Thomson, N.R.; Quail, M.; Smith, F.; Walker, D.; Libberton, B.; et al. Antagonistic Coevolution Accelerates Molecular Evolution. *Nature* **2010**, *464*, 275–278, doi:10.1038/nature08798.
142. Zhang, Q.; Chu, X.; Buckling, A. Overcoming the Growth–Infectivity Trade-off in a Bacteriophage Slows Bacterial Resistance Evolution. *Evolutionary Applications* **2021**, *14*, 2055–2063, doi:10.1111/eva.13260.
143. Debray, R.; De Luna, N.; Koskella, B. Historical Contingency Drives Compensatory Evolution and Rare Reversal of Phage Resistance. *Molecular Biology and Evolution* **2022**, *39*, msac182, doi:10.1093/molbev/msac182.
144. Avrani, S.; Lindell, D. Convergent Evolution toward an Improved Growth Rate and a Reduced Resistance Range in *Prochlorococcus* Strains Resistant to Phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112*, E2191–E2200, doi:10.1073/pnas.1420347112.
145. Meyer, J.R.; Agrawal, A.A.; Quick, R.T.; Dobias, D.T.; Schneider, D.; Lenski, R.E. Parallel Changes in Host Resistance to Viral Infection during 45,000 Generations of Relaxed Selection. *Evolution* **2010**, *64*, 3024–3034, doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01049.x.
146. Lopez Pascua, L.; Hall, A.R.; Best, A.; Morgan, A.D.; Boots, M.; Buckling, A. Higher Resources Decrease Fluctuating Selection during Host–Parasite Coevolution. *Ecology Letters* **2014**, *17*, 1380–1388, doi:10.1111/ele.12337.
147. Barron-Montenegro, R.; Rivera, D.; Serrano, M.J.; García, R.; Álvarez, D.M.; Benavides, J.; Arredondo, F.; Álvarez, F.P.; Bastías, R.; Ruiz, S.; et al. Long-Term Interactions of *Salmonella* Enteritidis With a Lytic Phage for 21 Days in High Nutrients Media. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 897171, doi:10.3389/fcimb.2022.897171.
148. Mizoguchi, K.; Morita, M.; Fischer, C.R.; Yoichi, M.; Tanji, Y.; Unno, H. Coevolution of Bacteriophage PP01 and *Escherichia Coli* O157:H7 in Continuous Culture. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, 170–176, doi:10.1128/AEM.69.1.170-176.2003.
149. Wright, R.C.T.; Brockhurst, M.A.; Harrison, E. Ecological Conditions Determine Extinction Risk in Co-Evolving Bacteria-Phage Populations. *BMC Evol Biol* **2016**, *16*, 227, doi:10.1186/s12862-016-0808-8.

150. Gómez, P.; Ashby, B.; Buckling, A. Population Mixing Promotes Arms Race Host–Parasite Coevolution. *Proc. R. Soc. B.* **2015**, *282*, 20142297, doi:10.1098/rspb.2014.2297.
151. Castledine, M.; Padfield, D.; Sierocinski, P.; Soria Pascual, J.; Hughes, A.; Mäkinen, L.; Friman, V.-P.; Pirnay, J.-P.; Merabishvili, M.; De Vos, D.; et al. Parallel Evolution of *Pseudomonas Aeruginosa* Phage Resistance and Virulence Loss in Response to Phage Treatment in Vivo and in Vitro. *eLife* **2022**, *11*, e73679, doi:10.7554/eLife.73679.
152. Schwartz, D.A.; Shoemaker, W.R.; Măgălie, A.; Weitz, J.S.; Lennon, J.T. Bacteria-Phage Coevolution with a Seed Bank. *The ISME Journal* **2023**, *17*, 1315–1325, doi:10.1038/s41396-023-01449-2.
153. Shaer Tamar, E.; Kishony, R. Multistep Diversification in Spatiotemporal Bacterial-Phage Coevolution. *Nat Commun* **2022**, *13*, doi:10.1038/s41467-022-35351-w.
154. Turkington, C.J.R.; Morozov, A.; Clokie, M.R.J.; Bayliss, C.D. Phage-Resistant Phase-Variant Sub-Populations Mediate Herd Immunity Against Bacteriophage Invasion of Bacterial Meta-Populations. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1473, doi:10.3389/fmicb.2019.01473.
155. Sandhu, S.K.; Bayliss, C.D.; Morozov, A.Yu. How Does Feedback from Phage Infections Influence the Evolution of Phase Variation in *Campylobacter*? *PLoS Comput Biol* **2021**, *17*, e1009067, doi:10.1371/journal.pcbi.1009067.
156. Sørensen, M.C.H.; Van Alphen, L.B.; Fodor, C.; Crowley, S.M.; Christensen, B.B.; Szymanski, C.M.; Brøndsted, L. Phase Variable Expression of Capsular Polysaccharide Modifications Allows *Campylobacter Jejuni* to Avoid Bacteriophage Infection in Chickens. *Front. Cell. Inf. Microbio.* **2012**, *2*, doi:10.3389/fcimb.2012.00011.
157. Porter, N.T.; Hryckowian, A.J.; Merrill, B.D.; Fuentes, J.J.; Gardner, J.O.; Glowacki, R.W.P.; Singh, S.; Crawford, R.D.; Snitkin, E.S.; Sonnenburg, J.L.; et al. Phase-Variable Capsular Polysaccharides and Lipoproteins Modify Bacteriophage Susceptibility in *Bacteroides Thetaiotaomicron*. *Nat Microbiol* **2020**, *5*, 1170–1181, doi:10.1038/s41564-020-0746-5.
158. Tao, P.; Wu, X.; Rao, V. Unexpected Evolutionary Benefit to Phages Imparted by Bacterial CRISPR-Cas9. *Sci Adv* **2018**, *4*, eaar4134, doi:10.1126/sciadv.aar4134.
159. Levin, B.R.; Moineau, S.; Bushman, M.; Barrangou, R. The Population and Evolutionary Dynamics of Phage and Bacteria with CRISPR–Mediated Immunity. *PLoS Genet* **2013**, *9*, e1003312, doi:10.1371/journal.pgen.1003312.
160. Guerrero, L.D.; Pérez, M.V.; Orellana, E.; Piuri, M.; Quiroga, C.; Erijman, L. Long-Run Bacteria-Phage Coexistence Dynamics under Natural Habitat Conditions in an Environmental Biotechnology System. *The ISME Journal* **2021**, *15*, 636–648, doi:10.1038/s41396-020-00802-z.
161. Harrison, E.; Truman, J.; Wright, R.; Spiers, A.J.; Paterson, S.; Brockhurst, M.A. Plasmid Carriage Can Limit Bacteria–Phage Coevolution. *Biol. Lett.* **2015**, *11*, 20150361, doi:10.1098/rsbl.2015.0361.
162. LeGault, K.N.; Hays, S.G.; Angermeyer, A.; McKitterick, A.C.; Johura, F.-T.; Sultana, M.; Ahmed, T.; Alam, M.; Seed, K.D. Temporal Shifts in Antibiotic Resistance Elements Govern Phage-Pathogen Conflicts. *Science* **2021**, *373*, eabg2166, doi:10.1126/science.abg2166.

163. Weitz, J.S.; Poisot, T.; Meyer, J.R.; Flores, C.O.; Valverde, S.; Sullivan, M.B.; Hochberg, M.E. Phage-Bacteria Infection Networks. *Trends Microbiol* **2013**, *21*, 82–91, doi:10.1016/j.tim.2012.11.003.
164. Doud, M.B.; Gupta, A.; Li, V.; Medina, S.J.; De La Fuente, C.A.; Meyer, J.R. Competition-Driven Eco-Evolutionary Feedback Reshapes Bacteriophage Lambda's Fitness Landscape and Enables Speciation. *Nat Commun* **2024**, *15*, 863, doi:10.1038/s41467-024-45008-5.
165. Maddamsetti, R.; Johnson, D.T.; Spielman, S.J.; Petrie, K.L.; Marks, D.S.; Meyer, J.R. Gain-of-Function Experiments with Bacteriophage Lambda Uncover Residues under Diversifying Selection in Nature. *Evolution* **2018**, *72*, 2234–2243, doi:10.1111/evo.13586.
166. Meyer, J.R.; Dobias, D.T.; Medina, S.J.; Servilio, L.; Gupta, A.; Lenski, R.E. Ecological Speciation of Bacteriophage Lambda in Allopatry and Sympatry. *Science* **2016**, *354*, 1301–1304, doi:10.1126/science.aai8446.
167. Borin, J.M.; Avrani, S.; Barrick, J.E.; Petrie, K.L.; Meyer, J.R. Coevolutionary Phage Training Leads to Greater Bacterial Suppression and Delays the Evolution of Phage Resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2021**, *118*, doi:10.1073/pnas.2104592118.
168. Perry, E.B.; Barrick, J.E.; Bohannan, B.J.M. The Molecular and Genetic Basis of Repeatable Coevolution between *Escherichia Coli* and Bacteriophage T3 in a Laboratory Microcosm. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130639, doi:10.1371/journal.pone.0130639.
169. Scanlan, P.D.; Hall, A.R.; Burlinson, P.; Preston, G.; Buckling, A. No Effect of Host-Parasite Co-Evolution on Host Range Expansion. *J Evol Biol* **2013**, *26*, 205–209, doi:10.1111/jeb.12021.
170. Marston, M.F.; Pierciey, F.J.; Shepard, A.; Gearin, G.; Qi, J.; Yandava, C.; Schuster, S.C.; Henn, M.R.; Martiny, J.B.H. Rapid Diversification of Coevolving Marine *Synechococcus* and a Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 4544–4549, doi:10.1073/pnas.1120310109.
171. Birkholz, N.; Jackson, S.A.; Fagerlund, R.D.; Fineran, P.C. A Mobile Restriction–Modification System Provides Phage Defence and Resolves an Epigenetic Conflict with an Antagonistic Endonuclease. *Nucleic Acids Research* **2022**, *50*, 3348–3361, doi:Rapid%20diversification%20of%20coevolving%20marine%20Synechococcus%20and%20a%20virus.
172. Wang, M.; Wei, J.; Jiang, L.; Jiang, L.; Zhang, J.; He, X.; Ren, Y.; Wang, Z.; Sun, Y.; Wang, Z. Coevolutionary Phage Training and Joint Application Delays the Emergence of Phage Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Virus Evolution* **2023**, *9*, vead067, doi:10.1093/ve/vead067.
173. Borin, J.M.; Lee, J.J.; Gerbino, K.R.; Meyer, J.R. Comparison of Bacterial Suppression by Phage Cocktails, Dual-receptor Generalists, and Coevolutionarily Trained Phages. *Evolutionary Applications* **2023**, *16*, 152–162, doi:10.1111/eva.13518.
174. De Sordi, L.; Lourenço, M.; Debarbieux, L. “I Will Survive”: A Tale of Bacteriophage-Bacteria Coevolution in the Gut. *Gut Microbes* **2019**, *10*, 92–99, doi:10.1080/19490976.2018.1474322.

175. Scanlan, P.D.; Buckling, A. Co-Evolution with Lytic Phage Selects for the Muroid Phenotype of *Pseudomonas Fluorescens* SBW25. *The ISME Journal* **2012**, *6*, 1148–1158, doi:10.1038/ismej.2011.174.
176. Hormaeche, E.; Edwards, P.R. A Proposed Genus *Enterobacter*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* **1960**, *10*, 71–74, doi:10.1099/0096266X-10-2-71.
177. Davin-Regli, A.; Lavigne, J.-P.; Pagès, J.-M. *Enterobacter* Spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Reviews* **2019**, *32*, e00002-19, /cmr/32/4/CMR.00002-19.atom, doi:10.1128/CMR.00002-19.
178. Mezzatesta, M.L.; Gona, F.; Stefani, S. *Enterobacter Cloacae* Complex: Clinical Impact and Emerging Antibiotic Resistance. *Future Microbiol* **2012**, *7*, 887–902, doi:10.2217/fmb.12.61.
179. Davin-Regli, A.; Pagès, J.-M. *Enterobacter Aerogenes* and *Enterobacter Cloacae*; Versatile Bacterial Pathogens Confronting Antibiotic Treatment. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fmicb.2015.00392.
180. Fata, F.; Chittivelu, S.; Tessler, S.; Kupfer, Y. Gas Gangrene of the Arm Due to *Enterobacter Cloacae* in a Neutropenic Patient: *Southern Medical Journal* **1996**, *89*, 1095–1096, doi:10.1097/00007611-199611000-00014.
181. Brooke, J.S. *Stenotrophomonas Maltophilia*: An Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clin Microbiol Rev* **2012**, *25*, 2–41, doi:10.1128/CMR.00019-11.
182. Yu, Z.-L.; Wang, R.-B. Revised Taxonomic Classification of the *Stenotrophomonas* Genomes, Providing New Insights into the Genus *Stenotrophomonas*. *Front. Microbiol.* **2024**, *15*, 1488674, doi:10.3389/fmicb.2024.1488674.
183. Palleroni, N.J.; Bradbury, J.F. *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas Maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1993**, *43*, 606–609, doi:10.1099/00207713-43-3-606.
184. Brooke, J.S. Advances in the Microbiology of *Stenotrophomonas Maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* **2021**, *34*, e00030-19, doi:10.1128/CMR.00030-19.
185. HUGH, R.; LEIFSON, E. A Description of the Type Strain of *Pseudomonas Maltophilia*1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **1963**, *13*, 133–138, doi:10.1099/0096266X-13-3-133.
186. Hoefel, D.; Monis, P.T.; Grooby, W.L.; Andrews, S.; Saint, C.P. Profiling Bacterial Survival through a Water Treatment Process and Subsequent Distribution System. *J Appl Microbiol* **2005**, *99*, 175–186, doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02573.x.
187. Jeon, Y.D.; Jeong, W.Y.; Kim, M.H.; Jung, I.Y.; Ahn, M.Y.; Ann, H.W.; Ahn, J.Y.; Han, S.H.; Choi, J.Y.; Song, Y.G.; et al. Risk Factors for Mortality in Patients with *Stenotrophomonas Maltophilia* Bacteremia. *Medicine (Baltimore)* **2016**, *95*, e4375, doi:10.1097/MD.00000000000004375.
188. Harris, N.B.; Rogers, D.G. Septicemia Associated with *Stenotrophomonas Maltophilia* in a West African Dwarf Crocodile (*Osteolaemus Tetraspis* Subsp. *Tetraspis*). *J Vet Diagn Invest* **2001**, *13*, 255–258, doi:10.1177/104063870101300313.

189. Berg, G.; Eberl, L.; Hartmann, A. The Rhizosphere as a Reservoir for Opportunistic Human Pathogenic Bacteria. *Environ Microbiol* **2005**, *7*, 1673–1685, doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x.
190. Berg, G. Plant-Microbe Interactions Promoting Plant Growth and Health: Perspectives for Controlled Use of Microorganisms in Agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* **2009**, *84*, 11–18, doi:10.1007/s00253-009-2092-7.
191. Brooke, J.S. New Strategies against *Stenotrophomonas Maltophilia*: A Serious Worldwide Intrinsically Drug-Resistant Opportunistic Pathogen. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2014**, *12*, 1–4, doi:10.1586/14787210.2014.864553.
192. Pompilio, A.; Crocetta, V.; Confalone, P.; Nicoletti, M.; Petrucca, A.; Guarnieri, S.; Fiscarelli, E.; Savini, V.; Piccolomini, R.; Di Bonaventura, G. Adhesion to and Biofilm Formation on IB3-1 Bronchial Cells by *Stenotrophomonas Maltophilia* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *BMC Microbiology* **2010**, *10*, 102, doi:10.1186/1471-2180-10-102.
193. Ochoa-Sánchez, L.E.; Vinuesa, P. Evolutionary Genetic Analysis Uncovers Multiple Species with Distinct Habitat Preferences and Antibiotic Resistance Phenotypes in the *Stenotrophomonas Maltophilia* Complex. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1548, doi:10.3389/fmicb.2017.01548.
194. Looney, W.J.; Narita, M.; Mühlemann, K. *Stenotrophomonas Maltophilia*: An Emerging Opportunist Human Pathogen. *The Lancet Infectious Diseases* **2009**, *9*, 312–323, doi:10.1016/S1473-3099(09)70083-0.
195. Sánchez, M.B. Antibiotic Resistance in the Opportunistic Pathogen *Stenotrophomonas Maltophilia*. *Front Microbiol* **2015**, *6*, 658, doi:10.3389/fmicb.2015.00658.
196. Li, X.-Z.; Li, J. Antimicrobial Resistance in *Stenotrophomonas Maltophilia*: Mechanisms and Clinical Implications. In *Antimicrobial Drug Resistance*; Mayers, D.L., Sobel, J.D., Ouellette, M., Kaye, K.S., Marchaim, D., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp. 937–958 ISBN 978-3-319-47264-5.
197. Treçarichi, E.M.; Tumbarello, M. Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Bacteria in Febrile Neutropenic Patients with Cancer: Current Epidemiology and Clinical Impact. *Current Opinion in Infectious Diseases* **2014**, *27*, 200–210, doi:10.1097/QCO.0000000000000038.
198. Jang, T.N.; Wang, F.D.; Wang, L.S.; Liu, C.Y.; Liu, I.M. *Xanthomonas Maltophilia* Bacteremia: An Analysis of 32 Cases. *J Formos Med Assoc* **1992**, *91*, 1170–1176.
199. Victor, M.A.; Arpi, M.; Bruun, B.; Jønsson, V.; Hansen, M.M. *Xanthomonas Maltophilia* Bacteremia in Immunocompromised Hematological Patients. *Scand J Infect Dis* **1994**, *26*, 163–170, doi:10.3109/00365549409011780.
200. WHO | World Health Organization Available online: https://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/ (accessed on 7 March 2021).
201. G, H.; P, K.; M, A.; I, K.; A, L.; R, C.; J, L.-H.; M, V.; P, J.; K, K. *Aeromonas Popoffii* Sp. Nov., a Mesophilic Bacterium Isolated from Drinking Water Production Plants and Reservoirs. *International journal of systematic bacteriology* **1997**, *47*, doi:10.1099/00207713-47-4-1165.

202. A, F.-B.; Mj, F. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* **2020**, *8*, doi:10.3390/microorganisms8010129.
203. Hoel, S.; Vadstein, O.; Jakobsen, A. The Significance of Mesophilic *Aeromonas* Spp. in Minimally Processed Ready-to-Eat Seafood. *Microorganisms* **2019**, *7*, 91, doi:10.3390/microorganisms7030091.
204. Soler, L.; Figueras, M.J.; Chacón, M.R.; Vila, J.; Marco, F.; Martinez-Murcia, A.J.; Guarro, J. Potential Virulence and Antimicrobial Susceptibility of *Aeromonas Popoffii* Recovered from Freshwater and Seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2002**, *32*, 243–247, doi:10.1111/j.1574-695X.2002.tb00560.x.
205. Sinclair, H.A.; Heney, C.; Sidjabat, H.E.; George, N.M.; Bergh, H.; Anuj, S.N.; Nimmo, G.R.; Paterson, D.L. Genotypic and Phenotypic Identification of *Aeromonas* Species and CphA-Mediated Carbapenem Resistance in Queensland, Australia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2016**, *85*, 98–101, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.005.
206. Rosso, F.; Cedano, J.A.; Parra-Lara, L.G.; Sanz, A.M.; Toala, A.; Velez, J.F.; Hormaza, M.P.; Moncada, P.A.; Correa, A. Emerging Carbapenem-Resistant *Aeromonas* Spp. Infections in Cali, Colombia. *Braz J Infect Dis* **2019**, *23*, 336–342, doi:10.1016/j.bjid.2019.08.005.
207. Patel, K.M.; Svestka, M.; Sinkin, J.; Ruff, P. Ciprofloxacin-Resistant *Aeromonas Hydrophila* Infection Following Leech Therapy: A Case Report and Review of the Literature. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* **2013**, *66*, e20–e22, doi:10.1016/j.bjps.2012.10.002.
208. Fauzi, N.N.F.N.M.; Hamdan, R.H.; Mohamed, M.; Ismail, A.; Zin, A.A.M.; Mohamad, N.F.A. Prevalence, Antibiotic Susceptibility, and Presence of Drug Resistance Genes in *Aeromonas* Spp. Isolated from Freshwater Fish in Kelantan and Terengganu States, Malaysia. *Vet World* **2021**, 2064–2072, doi:10.14202/vetworld.2021.2064-2072.
209. Richards, C.R.; Clark, M.E.; Bowen, D.K.; Uratake, D.; Ayubi, F.; Katras, T.; Kellicut, D.C. Necrotizing Soft Tissue Infection Following a Peripheral Bypass. *Annals of Vascular Surgery* **2015**, *29*, 843.e17–843.e22, doi:10.1016/j.avsg.2014.12.036.
210. Monaghan, S.F.; Anjaria, D.; Mohr, A.; Livingston, D.H. Necrotizing Fasciitis and Sepsis Caused by *Aeromonas Hydrophila* after Crush Injury of the Lower Extremity. *Surgical Infections* **2008**, *9*, 459–467, doi:10.1089/sur.2007.028.
211. Ji, P.; Jg, S. *Aeromonas* Spp. Clinical Microbiology and Disease. *The Journal of Infection* **2011**, *62*, doi:10.1016/j.jinf.2010.12.003.
212. B, V.; B, S.; E, C.; Ji, M.; P, P.; I, W.; L, L.; M, H. Medicinal Leech Therapy and *Aeromonas* Spp. Infection. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **2016**, *35*, doi:10.1007/s10096-016-2629-5.
213. Vincent, A.T.; Fernández-Bravo, A.; Sanchis, M.; Mayayo, E.; Figueras, M.J.; Charette, S.J. Investigation of the Virulence and Genomics of *Aeromonas Salmonicida* Strains Isolated from Human Patients. *Infection, Genetics and Evolution* **2019**, *68*, 1–9, doi:10.1016/j.meegid.2018.11.019.
214. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing

- Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899, doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
215. Jäckel, C.; Hertwig, S.; Scholz, H.C.; Nöckler, K.; Reetz, J.; Hammerl, J.A. Prevalence, Host Range, and Comparative Genomic Analysis of Temperate *Ochrobactrum* Phages. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1207, doi:10.3389/fmicb.2017.01207.
 216. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online] Available online: <https://github.com/s-andrews/FastQC> (accessed on 25 April 2023).
 217. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120, doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
 218. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* **2012**, *19*, 455–477, doi:10.1089/cmb.2012.0021.
 219. Mikheenko, A.; Prjibelski, A.; Saveliev, V.; Antipov, D.; Gurevich, A. Versatile Genome Assembly Evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i142–i150, doi:10.1093/bioinformatics/bty266.
 220. Alonge, M.; Lebeigle, L.; Kirsche, M.; Jenike, K.; Ou, S.; Aganezov, S.; Wang, X.; Lippman, Z.B.; Schatz, M.C.; Soyk, S. Automated Assembly Scaffolding Using RagTag Elevates a New Tomato System for High-Throughput Genome Editing. *Genome Biol* **2022**, *23*, 258, doi:10.1186/s13059-022-02823-7.
 221. Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069, doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
 222. Starikova, E.V.; Tikhonova, P.O.; Prianichnikov, N.A.; Rands, C.M.; Zdobnov, E.M.; Ilina, E.N.; Govorun, V.M. Phigaro: High-Throughput Prophage Sequence Annotation. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 3882–3884, doi:10.1093/bioinformatics/btaa250.
 223. Couvin, D.; Bernheim, A.; Toffano-Nioche, C.; Touchon, M.; Michalik, J.; Néron, B.; Rocha, E.P.C.; Vergnaud, G.; Gautheret, D.; Pourcel, C. CRISPRCasFinder, an Update of CRISPRFinder, Includes a Portable Version, Enhanced Performance and Integrates Search for Cas Proteins. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, W246–W251, doi:10.1093/nar/gky425.
 224. Petit, R.A.; Read, T.D. Bactopia: A Flexible Pipeline for Complete Analysis of Bacterial Genomes. *mSystems* **2020**, *5*, e00190-20, doi:10.1128/mSystems.00190-20.
 225. Feldgarden, M.; Brover, V.; Haft, D.H.; Prasad, A.B.; Slotta, D.J.; Tolstoy, I.; Tyson, G.H.; Zhao, S.; Hsu, C.-H.; McDermott, P.F.; et al. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2019**, *63*, e00483-19, doi:10.1128/AAC.00483-19.
 226. Seemann, T. ABRicate 2023.
 227. Gupta, S.K.; Padmanabhan, B.R.; Diene, S.M.; Lopez-Rojas, R.; Kempf, M.; Landraud, L.; Rolain, J.-M. ARG-ANNOT, a New Bioinformatic Tool To

- Discover Antibiotic Resistance Genes in Bacterial Genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, *58*, 212–220, doi:10.1128/AAC.01310-13.
228. Alcock, B.P.; Raphenya, A.R.; Lau, T.T.Y.; Tsang, K.K.; Bouchard, M.; Edalatmand, A.; Huynh, W.; Nguyen, A.-L.V.; Cheng, A.A.; Liu, S.; et al. CARD 2020: Antibiotic Resistance Surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48*, D517–D525, doi:10.1093/nar/gkz935.
 229. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M.; Larsen, M.V. Identification of Acquired Antimicrobial Resistance Genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2012**, *67*, 2640–2644, doi:10.1093/jac/dks261.
 230. Chen, L.; Zheng, D.; Liu, B.; Yang, J.; Jin, Q. VFDB 2016: Hierarchical and Refined Dataset for Big Data Analysis—10 Years On. *Nucleic Acids Research* **2016**, *44*, D694–D697, doi:10.1093/nar/gkv1239.
 231. Doster, E.; Lakin, S.M.; Dean, C.J.; Wolfe, C.; Young, J.G.; Boucher, C.; Belk, K.E.; Noyes, N.R.; Morley, P.S. MEGARes 2.0: A Database for Classification of Antimicrobial Drug, Biocide and Metal Resistance Determinants in Metagenomic Sequence Data. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48*, D561–D569, doi:10.1093/nar/gkz1010.
 232. Krzywinski, M.I.; Schein, J.E.; Birol, I.; Connors, J.; Gascoyne, R.; Horsman, D.; Jones, S.J.; Marra, M.A. Circos: An Information Aesthetic for Comparative Genomics. *Genome Res.* **2009**, doi:10.1101/gr.092759.109.
 233. The Galaxy Community The Galaxy Platform for Accessible, Reproducible and Collaborative Biomedical Analyses: 2022 Update. *Nucleic Acids Research* **2022**, *50*, W345–W351, doi:10.1093/nar/gkac247.
 234. Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.G.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A.; Parkhill, J. Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan Genome Analysis. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3691–3693, doi:10.1093/bioinformatics/btv421.
 235. Madeira, F.; Pearce, M.; Tivey, A.R.N.; Basutkar, P.; Lee, J.; Edbali, O.; Madhusoodanan, N.; Kolesnikov, A.; Lopez, R. Search and Sequence Analysis Tools Services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res* **2022**, *50*, W276–W279, doi:10.1093/nar/gkac240.
 236. Morozova, V.; Fofanov, M.; Tikunova, N.; Babkin, I.; Morozov, V.V.; Tikunov, A. First crAss-Like Phage Genome Encoding the Diversity-Generating Retroelement (DGR). *Viruses* **2020**, *12*, 573, doi:10.3390/v12050573.
 237. Kutter, E. Phage Host Range and Efficiency of Plating. In *Bacteriophages*; Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; Vol. 501, pp. 141–149 ISBN 978-1-58829-682-5.
 238. Kropinski, A.M. Measurement of the Rate of Attachment of Bacteriophage to Cells. In *Bacteriophages*; Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2009; Vol. 501, pp. 151–155 ISBN 978-1-58829-682-5.
 239. Pajunen, M.; Kiljunen, S.; Skurnik, M. Bacteriophage ϕ YeO3-12, Specific for *Yersinia Enterocolitica* Serotype O:3, Is Related to Coliphages T3 and T7. *J Bacteriol* **2000**, *182*, 5114–5120, doi:10.1128/JB.182.18.5114-5120.2000.

240. Heo, Y.-J.; Lee, Y.-R.; Jung, H.-H.; Lee, J.; Ko, G.; Cho, Y.-H. Antibacterial Efficacy of Phages against *Pseudomonas Aeruginosa* Infections in Mice and *Drosophila Melanogaster*. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53*, 2469–2474, doi:10.1128/AAC.01646-08.
241. Panteleev, V.; Kulbachinskiy, A.; Gelfenbein, D. Evaluating Phage Lytic Activity: From Plaque Assays to Single-Cell Technologies. *Front. Microbiol.* **2025**, *16*, 1659093, doi:10.3389/fmicb.2025.1659093.
242. Khan Mirzaei, M.; Nilsson, A.S. Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0118557, doi:10.1371/journal.pone.0118557.
243. Holtappels, D.; Alfenas-Zerbini, P.; Koskella, B. Drivers and Consequences of Bacteriophage Host Range. *FEMS Microbiology Reviews* **2023**, *47*, fuad038, doi:10.1093/femsre/fuad038.
244. Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E.M.; Kubal, M.; et al. The RAST Server: Rapid Annotations Using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 75, doi:10.1186/1471-2164-9-75.
245. Chan, P.P.; Lowe, T.M. tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences. *Methods Mol Biol* **2019**, *1962*, 1–14, doi:10.1007/978-1-4939-9173-0_1.
246. Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction. *Nat Protoc* **2010**, *5*, 725–738, doi:10.1038/nprot.2010.5.
247. Zimmermann, L.; Stephens, A.; Nam, S.-Z.; Rau, D.; Kübler, J.; Lozajic, M.; Gabler, F.; Söding, J.; Lupas, A.N.; Alva, V. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at Its Core. *Journal of Molecular Biology* **2018**, *430*, 2237–2243, doi:10.1016/j.jmb.2017.12.007.
248. GC Content Calculator | VectorBuilder Available online: <https://en.vectorbuilder.com/tool/gc-content-calculator.html> (accessed on 2 May 2023).
249. Stothard, P.; Grant, J.R.; Van Domselaar, G. Visualizing and Comparing Circular Genomes Using the CGView Family of Tools. *Brief Bioinform* **2019**, *20*, 1576–1582, doi:10.1093/bib/bbx081.
250. Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D. MAFFT Online Service: Multiple Sequence Alignment, Interactive Sequence Choice and Visualization. *Briefings in Bioinformatics* **2019**, *20*, 1160–1166, doi:10.1093/bib/bbx108.
251. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **2016**, *33*, 1870–1874, doi:10.1093/molbev/msw054.
252. Thomas A. Hall BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **1999**, *41*, 95–98.
253. Proksee - Genome Analysis Available online: <https://proksee.ca/> (accessed on 23 April 2023).
254. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for

- Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* **2003**, *13*, 2498–2504, doi:10.1101/gr.1239303.
255. Kot, W.; Olsen, N.S.; Nielsen, T.K.; Hutinet, G.; de Crécy-Lagard, V.; Cui, L.; Dedon, P.C.; Carstens, A.B.; Moineau, S.; Swairjo, M.A.; et al. Detection of preQ0 Deazaguanine Modifications in Bacteriophage CAjan DNA Using Nanopore Sequencing Reveals Same Hypermodification at Two Distinct DNA Motifs. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48*, 10383–10396, doi:10.1093/nar/gkaa735.
256. Hutinet, G.; Kot, W.; Cui, L.; Hillebrand, R.; Balamkundu, S.; Gnanakalai, S.; Neelakandan, R.; Carstens, A.B.; Fa Lui, C.; Tremblay, D.; et al. 7-Deazaguanine Modifications Protect Phage DNA from Host Restriction Systems. *Nat Commun* **2019**, *10*, 5442, doi:10.1038/s41467-019-13384-y.
257. Rodionov, D.A.; Hebbeln, P.; Eudes, A.; Ter Beek, J.; Rodionova, I.A.; Erkens, G.B.; Slotboom, D.J.; Gelfand, M.S.; Osterman, A.L.; Hanson, A.D.; et al. A Novel Class of Modular Transporters for Vitamins in Prokaryotes. *J Bacteriol* **2009**, *191*, 42–51, doi:10.1128/JB.01208-08.
258. Yuan, Y.; Zallot, R.; Grove, T.L.; Payan, D.J.; Martin-Verstraete, I.; Šepić, S.; Balamkundu, S.; Neelakandan, R.; Gadi, V.K.; Liu, C.-F.; et al. Discovery of Novel Bacterial Queuine Salvage Enzymes and Pathways in Human Pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116*, 19126–19135, doi:10.1073/pnas.1909604116.
259. Carstens, A.B.; Kot, W.; Lametsch, R.; Neve, H.; Hansen, L.H. Characterisation of a Novel Enterobacteria Phage, CAjan, Isolated from Rat Faeces. *Arch Virol* **2016**, *161*, 2219–2226, doi:10.1007/s00705-016-2901-0.
260. Flores, V.; Sepúlveda-Robles, O.; Cazares, A.; Kameyama, L.; Guarneros, G. Comparative Genomic Analysis of Pseudomonas Aeruginosa Phage PaMx25 Reveals a Novel Siphovirus Group Related to Phages Infecting Hosts of Different Taxonomic Classes. *Arch Virol* **2017**, *162*, 2345–2355, doi:10.1007/s00705-017-3366-5.
261. Doan, D.P.; Lessor, L.E.; Hernandez, A.C.; Kutty Everett, G.F. Complete Genome Sequence of Enterotoxigenic Escherichia Coli Siphophage Seurat. *Genome Announc* **2015**, *3*, e00044-15, doi:10.1128/genomeA.00044-15.
262. Kulikov, E.; Golomidova, A.; Letarova, M.; Kostryukova, E.; Zelenin, A.; Prokhorov, N.; Letarov, A. Genomic Sequencing and Biological Characteristics of a Novel Escherichia Coli Bacteriophage 9g, a Putative Representative of a New Siphoviridae Genus. *Viruses* **2014**, *6*, 5077–5092, doi:10.3390/v6125077.
263. Šimoliūnas, E.; Šimoliūnienė, M.; Kaliniene, L.; Zajančauskaitė, A.; Skapas, M.; Meškys, R.; Kaupinis, A.; Valius, M.; Truncaitė, L. Pantoea Bacteriophage vB_PagS_Vid5: A Low-Temperature Siphovirus That Harbors a Cluster of Genes Involved in the Biosynthesis of Archaeosine. *Viruses* **2018**, *10*, 583, doi:10.3390/v10110583.
264. Baker, T.A. Bacteriophage Mu: A Transposing Phage That Integrates like Retroviruses. *Seminars in Virology* **1995**, *6*, 53–63, doi:10.1016/S1044-5773(05)80009-5.
265. Carabias, A.; Montoya, G. NAD Reloaded: Hacking Bacterial Defenses. *Cell Chemical Biology* **2024**, *31*, 1872–1873, doi:10.1016/j.chembiol.2024.10.012.

266. Lee, J.Y.; Li, Z.; Miller, E.S. Vibrio Phage KVP40 Encodes a Functional NAD⁺ Salvage Pathway. *J Bacteriol* **2017**, *199*, doi:10.1128/JB.00855-16.
267. Li, C.; Liu, K.; Gu, C.; Li, M.; Zhou, P.; Chen, L.; Sun, S.; Li, X.; Wang, L.; Ni, W.; et al. Gastrointestinal Jumbo Phages Possess Independent Synthesis and Utilization Systems of NAD⁺. *Microbiome* **2024**, *12*, 268, doi:10.1186/s40168-024-01984-w.
268. Ennis, H.L.; Kievitt, K.D. Association of the *r* IIA Protein with the Bacterial Membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1973**, *70*, 1468–1472, doi:10.1073/pnas.70.5.1468.
269. Singer, B.S.; Gold, L.; Shinedling, S.T.; Colkitt, M.; Hunter, L.R.; Pribnow, D.; Nelson, M.A. Analysis in Vivo of Translational Mutants of the rIIB Cistron of Bacteriophage T4. *Journal of Molecular Biology* **1981**, *149*, 405–432, doi:10.1016/0022-2836(81)90479-4.
270. Bujak, K.; Decewicz, P.; Kitowicz, M.; Radlinska, M. Characterization of Three Novel Virulent Aeromonas Phages Provides Insights into the Diversity of the Autographiviridae Family. *Viruses* **2022**, *14*, 1016, doi:10.3390/v14051016.
271. Cao, Y.; Li, S.; Wang, D.; Zhao, J.; Xu, L.; Liu, H.; Lu, T.; Mou, Z. Genomic Characterization of a Novel Virulent Phage Infecting the Aeromonas Hydrophila Isolated from Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss). *Virus Research* **2019**, *273*, 197764, doi:10.1016/j.virusres.2019.197764.
272. Turner, D.; Kropinski, A.M.; Adriaenssens, E.M. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses* **2021**, *13*, 506, doi:10.3390/v13030506.
273. Hosseini, N.; Paquet, V.E.; Chehreghani, M.; Moineau, S.; Charette, S.J. Phage Cocktail Development against Aeromonas Salmonicida Subsp. Salmonicida Strains Is Compromised by a Prophage. *Viruses* **2021**, *13*, 2241, doi:10.3390/v13112241.
274. Anand, T.; Bera, B.Ch.; Virmani, N.; Vaid, R.K.; Vashisth, M.; Tripathi, B.N. Isolation and Characterization of a Novel, T7-like Phage against Aeromonas Veronii. *Virus Genes* **2018**, *54*, 160–164, doi:10.1007/s11262-017-1517-0.
275. Leduc, G.R.; Paquet, V.E.; Vincent, A.T.; Charette, S.J. Characterization of Bacteriophage T7-Ah Reveals Its Lytic Activity against a Subset of Both Mesophilic and Psychrophilic Aeromonas Salmonicida Strains. *Arch Virol* **2021**, *166*, 521–533, doi:10.1007/s00705-020-04923-w.
276. Cao, Y.; Li, S.; Wang, D.; Zhao, J.; Xu, L.; Liu, H.; Lu, T.; Mou, Z. Genomic Characterization of a Novel Virulent Phage Infecting the Aeromonas Hydrophila Isolated from Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss). *Virus Research* **2019**, *273*, 197764, doi:10.1016/j.virusres.2019.197764.
277. Islam, M.S.; Raz, A.; Liu, Y.; Elbassiony, K.R.A.; Dong, X.; Zhou, P.; Zhou, Y.; Li, J. Complete Genome Sequence of Aeromonas Phage ZPAH7 with Halo Zones, Isolated in China. *Microbiol Resour Announc* **2019**, *8*, e01678-18, doi:10.1128/MRA.01678-18.
278. Wang, J.-B.; Lin, N.-T.; Tseng, Y.-H.; Weng, S.-F. Genomic Characterization of the Novel Aeromonas Hydrophila Phage Ahp1 Suggests the Derivation of a New Subgroup from phiKMV-Like Family. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162060, doi:10.1371/journal.pone.0162060.

279. Wang, J.-B.; Yu, M.-S.; Tseng, T.-T.; Lin, L.-C. Molecular Characterization of Ahp2, a Lytic Bacteriophage of *Aeromonas Hydrophila*. *Viruses* **2021**, *13*, 477, doi:10.3390/v13030477.
280. Lee, J.Y.; Li, Z.; Miller, E.S. Vibrio Phage KVP40 Encodes a Functional NAD⁺ Salvage Pathway. *J Bacteriol* **2017**, *199*, doi:10.1128/JB.00855-16.
281. Bullen, N.P.; Whiteley, A.T. Phages Gain the Upper Hand in the Metabolic Arms Race for NAD⁺. *Mol Cell* **2024**, *84*, 4480–4482, doi:10.1016/j.molcel.2024.11.017.
282. Mahmoudabadi, G.; Milo, R.; Phillips, R. Energetic Cost of Building a Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114*, doi:10.1073/pnas.1701670114.
283. Yin, J. Evolution of Bacteriophage T7 in a Growing Plaque. *J Bacteriol* **1993**, *175*, 1272–1277, doi:10.1128/jb.175.5.1272-1277.1993.
284. Huang, D.; Xia, R.; Chen, C.; Liao, J.; Chen, L.; Wang, D.; Alvarez, P.J.J.; Yu, P. Adaptive Strategies and Ecological Roles of Phages in Habitats under Physicochemical Stress. *Trends in Microbiology* **2024**, *32*, 902–916, doi:10.1016/j.tim.2024.02.002.
285. Runtuvuori-Salmela, A.; Kuntu, H.M.T.; Laanto, E.; Almeida, G.M.F.; Mäkelä, K.; Middelboe, M.; Sundberg, L.-R. Prevalence of Genetically Similar Flavobacterium Columnare Phages across Aquaculture Environments Reveals a Strong Potential for Pathogen Control. *Environmental Microbiology* **2022**, *24*, 2404–2420, doi:10.1111/1462-2920.15901.
286. Kalatzis, P.G.; Rørbo, N.; Castillo, D.; Mauritzen, J.J.; Jørgensen, J.; Kokkari, C.; Zhang, F.; Katharios, P.; Middelboe, M. Stumbling across the Same Phage: Comparative Genomics of Widespread Temperate Phages Infecting the Fish Pathogen *Vibrio Anguillarum*. *Viruses* **2017**, *9*, 122, doi:10.3390/v9050122.
287. Yamashita, W.; Chihara, K.; Azam, A.H.; Kondo, K.; Ojima, S.; Tamura, A.; Imanaka, M.; Nobrega, F.L.; Takahashi, Y.; Watashi, K.; et al. Phage Engineering to Overcome Bacterial Tmn Immunity in Dhillonvirus. *Commun Biol* **2025**, *8*, 290, doi:10.1038/s42003-025-07730-8.
288. Gordillo Altamirano, F.; Forsyth, J.H.; Patwa, R.; Kostoulias, X.; Trim, M.; Subedi, D.; Archer, S.K.; Morris, F.C.; Oliveira, C.; Kielty, L.; et al. Bacteriophage-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Are Resensitized to Antimicrobials. *Nat Microbiol* **2021**, *6*, 157–161, doi:10.1038/s41564-020-00830-7.
289. Chan, B.K.; Sistrom, M.; Wertz, J.E.; Kortright, K.E.; Narayan, D.; Turner, P.E. Phage Selection Restores Antibiotic Sensitivity in MDR *Pseudomonas Aeruginosa*. *Sci Rep* **2016**, *6*, 26717, doi:10.1038/srep26717.
290. Nakamura, K.; Fujiki, J.; Nakamura, T.; Furusawa, T.; Gondaira, S.; Usui, M.; Higuchi, H.; Tamura, Y.; Iwano, H. Fluctuating Bacteriophage-Induced galU Deficiency Region Is Involved in Trade-off Effects on the Phage and Fluoroquinolone Sensitivity in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Virus Research* **2021**, *306*, 198596, doi:10.1016/j.virusres.2021.198596.
291. Steinmann, J.; Mamat, U.; Abda, E.M.; Kirchhoff, L.; Streit, W.R.; Schaible, U.E.; Niemann, S.; Kohl, T.A. Analysis of Phylogenetic Variation of *Stenotrophomonas Maltophilia* Reveals Human-Specific Branches. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 806, doi:10.3389/fmicb.2018.00806.

292. Pei, R.; Lamas-Samanamud, G.R. Inhibition of Biofilm Formation by T7 Bacteriophages Producing Quorum-Quenching Enzymes. *Appl Environ Microbiol* **2014**, *80*, 5340–5348, doi:10.1128/AEM.01434-14.
293. Tian, F.; Li, J.; Nazir, A.; Tong, Y. Bacteriophage – A Promising Alternative Measure for Bacterial Biofilm Control. *IDR* **2021**, *Volume 14*, 205–217, doi:10.2147/IDR.S290093.
294. Oechslin, F.; Piccardi, P.; Mancini, S.; Gabard, J.; Moreillon, P.; Entenza, J.M.; Resch, G.; Que, Y.-A. Synergistic Interaction between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *INFDIS* **2016**, jiw632, doi:10.1093/infdis/jiw632.
295. Friman, V.; Soanes-Brown, D.; Sierocinski, P.; Molin, S.; Johansen, H.K.; Merabishvili, M.; Pirnay, J.; De Vos, D.; Buckling, A. Pre-adapting Parasitic Phages to a Pathogen Leads to Increased Pathogen Clearance and Lowered Resistance Evolution with *Pseudomonas Aeruginosa* Cystic Fibrosis Bacterial Isolates. *J of Evolutionary Biology* **2016**, *29*, 188–198, doi:10.1111/jeb.12774.
296. Ngiam, L.; Weynberg, K.; Guo, J. Evolutionary and Co-Evolutionary Phage Training Approaches Enhance Bacterial Suppression and Delay the Emergence of Phage Resistance. *ISME Communications* **2024**, *4*, ycae082, doi:10.1093/ismeco/ycae082.
297. Sant, D.G.; Woods, L.C.; Barr, J.J.; McDonald, M.J. Host Diversity Slows Bacteriophage Adaptation by Selecting Generalists over Specialists. *Nat Ecol Evol* **2021**, *5*, 350–359, doi:10.1038/s41559-020-01364-1.
298. Zhang, Q.; Chu, X.; Buckling, A. Overcoming the Growth–Infectivity Trade-off in a Bacteriophage Slows Bacterial Resistance Evolution. *Evolutionary Applications* **2021**, *14*, 2055–2063, doi:10.1111/eva.13260.
299. Betts, A.; Gray, C.; Zelek, M.; MacLean, R.C.; King, K.C. High Parasite Diversity Accelerates Host Adaptation and Diversification. *Science* **2018**, *360*, 907–911, doi:10.1126/science.aam9974.
300. Brockhurst, M.A.; Morgan, A.D.; Fenton, A.; Buckling, A. Experimental Coevolution with Bacteria and Phage. *Infection, Genetics and Evolution* **2007**, *7*, 547–552, doi:10.1016/j.meegid.2007.01.005.
301. Hall, A.R.; Scanlan, P.D.; Morgan, A.D.; Buckling, A. Host-Parasite Coevolutionary Arms Races Give Way to Fluctuating Selection: Bacteria-Phage Coevolutionary Dynamics. *Ecology Letters* **2011**, *14*, 635–642, doi:10.1111/j.1461-0248.2011.01624.x.
302. Holguín, A.V.; Cárdenas, P.; Prada-Peñaranda, C.; Rabelo Leite, L.; Buitrago, C.; Clavijo, V.; Oliveira, G.; Leekitcharoenphon, P.; Møller Aarestrup, F.; Vives, M.J. Host Resistance, Genomics and Population Dynamics in a Salmonella Enteritidis and Phage System. *Viruses* **2019**, *11*, 188, doi:10.3390/v11020188.
303. Morgan, A.D.; Buckling, A. Relative Number of Generations of Hosts and Parasites Does Not Influence Parasite Local Adaptation in Coevolving Populations of Bacteria and Phages. *Journal of Evolutionary Biology* **2006**, *19*, 1956–1963, doi:10.1111/j.1420-9101.2006.01148.x.
304. Castledine, M.; Sierocinski, P.; Inglis, M.; Kay, S.; Hayward, A.; Buckling, A.; Padfield, D. Greater Phage Genotypic Diversity Constrains Arms-Race Coevolution. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 834406, doi:10.3389/fcimb.2022.834406.

305. Paez-Espino, D.; Sharon, I.; Morovic, W.; Stahl, B.; Thomas, B.C.; Barrangou, R.; Banfield, J.F. CRISPR Immunity Drives Rapid Phage Genome Evolution in *Streptococcus Thermophilus*. *mBio* **2015**, *6*, e00262-15, doi:10.1128/mBio.00262-15.
306. Mu, Y.; Song, Y.; Tian, X.; Ding, Z.; Yao, S.; Li, Y.; Wang, C.; Wei, D.; Vollmer, W.; Zhang, G.; et al. Leveraging Collateral Sensitivity to Counteract the Evolution of Bacteriophage Resistance in Bacteria. *mLife* **2025**, *4*, 143–154, doi:10.1002/mlf2.70003.
307. Li, X.-Z. Role of the Acetyltransferase AAC(6')-Iz Modifying Enzyme in Aminoglycoside Resistance in *Stenotrophomonas Maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2003**, *51*, 803–811, doi:10.1093/jac/dkg148.
308. Lomovskaya, O.; Lewis, K.; Matin, A. EmrR Is a Negative Regulator of the Escherichia Coli Multidrug Resistance Pump EmrAB. *J Bacteriol* **1995**, *177*, 2328–2334, doi:10.1128/jb.177.9.2328-2334.1995.
309. Li, X.-Z.; Zhang, L.; Poole, K. SmeC, an Outer Membrane Multidrug Efflux Protein of *Stenotrophomonas Maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, *46*, 333–343, doi:10.1128/AAC.46.2.333-343.2002.
310. Zhang, L.; Li, X.-Z.; Poole, K. SmeDEF Multidrug Efflux Pump Contributes to Intrinsic Multidrug Resistance in *Stenotrophomonas Maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45*, 3497–3503, doi:10.1128/AAC.45.12.3497-3503.2001.
311. Materon, I.C.; Queenan, A.M.; Koehler, T.M.; Bush, K.; Palzkill, T. Biochemical Characterization of β -Lactamases Bla1 and Bla2 from *Bacillus Anthracis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, *47*, 2040–2042, doi:10.1128/AAC.47.6.2040-2042.2003.
312. Kim, S.-K.; Demuth, M.; Schlesinger, S.R.; Kim, S.J.; Urbanczyk, J.; Shaw, R.W.; Shin, H. Inhibition of *Bacillus Anthracis* Metallo- β -Lactamase by Compounds with Hydroxamic Acid Functionality. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, *31*, 132–137, doi:10.1080/14756366.2016.1222580.
313. Chen, Y.; Succi, J.; Tenover, F.C.; Koehler, T.M. β -Lactamase Genes of the Penicillin-Susceptible *Bacillus Anthracis* Sterne Strain. *J Bacteriol* **2003**, *185*, 823–830, doi:10.1128/JB.185.3.823-830.2003.
314. Okazaki, A.; Avison, M.B. Aph(3')-IIc, an Aminoglycoside Resistance Determinant from *Stenotrophomonas Maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51*, 359–360, doi:10.1128/AAC.00795-06.
315. Kim, H.B.; Wang, M.; Park, C.H.; Kim, E.-C.; Jacoby, G.A.; Hooper, D.C. *oqxAB* Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53*, 3582–3584, doi:10.1128/AAC.01574-08.
316. Torres, P.S.; Malamud, F.; Rigano, L.A.; Russo, D.M.; Marano, M.R.; Castagnaro, A.P.; Zorreguieta, A.; Bouarab, K.; Dow, J.M.; Vojnov, A.A. Controlled Synthesis of the DSF Cell–Cell Signal Is Required for Biofilm Formation and Virulence in *Xanthomonas Campestris*. *Environmental Microbiology* **2007**, *9*, 2101–2109, doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01332.x.
317. Azimi, A.; Aslanimehr, M.; Yaseri, M.; Shadkam, M.; Douraghi, M. Distribution of Smf-1, rmlA, spgM and rpfF Genes among *Stenotrophomonas Maltophilia*

- Isolates in Relation to Biofilm-Forming Capacity. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **2020**, *23*, 321–326, doi:10.1016/j.jgar.2020.10.011.
318. Enikeeva, F.N.; Severinov, K.V.; Gelfand, M.S. Restriction–Modification Systems and Bacteriophage Invasion: Who Wins? *Journal of Theoretical Biology* **2010**, *266*, 550–559, doi:10.1016/j.jtbi.2010.07.006.
 319. Muralidharan, A.; Costa, A.R.; Fierlier, D.; Van Den Berg, D.F.; Van Den Bossche, H.; Zoumaro-Djayoon, A.D.; Rodríguez-Molina, A.; Pabst, M.; Pacesa, M.; Correia, B.E.; et al. Molecular Basis for Anti-Jumbo Phage Immunity by AVAST Type 5. *Molecular Cell* **2026**, *86*, 740-756.e9, doi:10.1016/j.molcel.2026.01.004.
 320. Huang, J.; Zhu, K.; Gao, Y.; Ye, F.; Li, Z.; Ge, Y.; Liu, S.; Yang, J.; Gao, A. Molecular Basis of Bacterial DSR2 Anti-Phage Defense and Viral Immune Evasion. *Nat Commun* **2024**, *15*, 3954, doi:10.1038/s41467-024-48291-4.
 321. Antine, S.P.; Johnson, A.G.; Mooney, S.E.; Leavitt, A.; Mayer, M.L.; Yirmiya, E.; Amitai, G.; Sorek, R.; Kranzusch, P.J. Structural Basis of Gabija Anti-Phage Defence and Viral Immune Evasion. *Nature* **2024**, *625*, 360–365, doi:10.1038/s41586-023-06855-2.
 322. Ka, D.; Oh, H.; Park, E.; Kim, J.-H.; Bae, E. Structural and Functional Evidence of Bacterial Antiphage Protection by Thoeris Defense System via NAD⁺ Degradation. *Nat Commun* **2020**, *11*, 2816, doi:10.1038/s41467-020-16703-w.
 323. Doron, S.; Melamed, S.; Ofir, G.; Leavitt, A.; Lopatina, A.; Keren, M.; Amitai, G.; Sorek, R. Systematic Discovery of Antiphage Defense Systems in the Microbial Pangenome. *Science* **2018**, *359*, eaar4120, doi:10.1126/science.aar4120.
 324. Drobiazko, A.; Adams, M.C.; Skutel, M.; Potekhina, K.; Kotovskaya, O.; Trofimova, A.; Matlashov, M.; Yatselenko, D.; Maxwell, K.L.; Blower, T.R.; et al. Molecular Basis of Foreign DNA Recognition by BREX Anti-Phage Immunity System. *Nat Commun* **2025**, *16*, 1825, doi:10.1038/s41467-025-57006-2.
 325. Yi, W.; Zhu, N.; Peng, Z.; Chu, X.; Sun, H.; Song, L.; Guo, Z.; Pain, A.; Luo, Z.; Guan, Q. In Silico Characterization of Defense System Hotspots in *Acinetobacter* Spp. *Commun Biol* **2025**, *8*, 39, doi:10.1038/s42003-025-07459-4.
 326. Hobbs, S.J.; Wein, T.; Lu, A.; Morehouse, B.R.; Schnabel, J.; Leavitt, A.; Yirmiya, E.; Sorek, R.; Kranzusch, P.J. Phage Anti-CBASS and Anti-Pycsar Nucleases Subvert Bacterial Immunity. *Nature* **2022**, *605*, 522–526, doi:10.1038/s41586-022-04716-y.
 327. Wilkinson, M.; Wilkinson, O.J.; Feyerherm, C.; Fletcher, E.E.; Wigley, D.B.; Dillingham, M.S. Structures of RecBCD in Complex with Phage-Encoded Inhibitor Proteins Reveal Distinctive Strategies for Evasion of a Bacterial Immunity Hub. *eLife* **2022**, *11*, e83409, doi:10.7554/eLife.83409.
 328. Hobbs, S.J.; Wein, T.; Lu, A.; Morehouse, B.R.; Schnabel, J.; Leavitt, A.; Yirmiya, E.; Sorek, R.; Kranzusch, P.J. Phage Anti-CBASS and Anti-Pycsar Nucleases Subvert Bacterial Immunity. *Nature* **2022**, *605*, 522–526, doi:10.1038/s41586-022-04716-y.
 329. Dy, R.L.; Przybilski, R.; Semeijn, K.; Salmond, G.P.C.; Fineran, P.C. A Widespread Bacteriophage Abortive Infection System Functions through a Type IV Toxin–Antitoxin Mechanism. *Nucleic Acids Research* **2014**, *42*, 4590–4605, doi:10.1093/nar/gkt1419.

330. Haudiquet, M.; Chakravarti, A.; Zhang, Z.; Ramirez, J.L.; Herrero Del Valle, A.; Olinares, P.D.B.; Lavenir, R.; Ahmed, M.A.; De La Cruz, M.J.; Chait, B.T.; et al. Structural Basis for Lamassu-Based Antiviral Immunity and Its Evolution from DNA Repair Machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2025**, *122*, e2519643122, doi:10.1073/pnas.2519643122.
331. Stokar-Avihail, A.; Fedorenko, T.; Hör, J.; Garb, J.; Leavitt, A.; Millman, A.; Shulman, G.; Wojtania, N.; Melamed, S.; Amitai, G.; et al. Discovery of Phage Determinants That Confer Sensitivity to Bacterial Immune Systems. *Cell* **2023**, *186*, 1863-1876.e16, doi:10.1016/j.cell.2023.02.029.
332. Ishikawa, J.; Yoneyama, K.; Azam, A.H.; Nagao, A.; Mitsuda, Y.; Nakazaki, R.; Chihara, K.; Hiraizumi, M.; Yamashita, K.; Suzuki, T.; et al. Structural Mechanism of the Retron-Eco7 Anti-Phage Defense System. *Nat Commun* **2025**, *16*, 10821, doi:10.1038/s41467-025-66589-9.
333. Yang, R.; He, L.; Wu, Z.; Wang, R.; Guo, H.; Yuan, R.; Su, H.; Chen, G.; Li, F. The Molecular Mechanisms of the ShosTA System in Mediating Anti-Phage Defense. *Nucleic Acids Research* **2026**, *54*, gkag197, doi:10.1093/nar/gkag197.
334. Sberro, H.; Leavitt, A.; Kiro, R.; Koh, E.; Peleg, Y.; Qimron, U.; Sorek, R. Discovery of Functional Toxin/Antitoxin Systems in Bacteria by Shotgun Cloning. *Molecular Cell* **2013**, *50*, 136–148, doi:10.1016/j.molcel.2013.02.002.
335. Ernits, K.; Saha, C.K.; Brodiazhenko, T.; Chouhan, B.; Shenoy, A.; Buttress, J.A.; Duque-Pedraza, J.J.; Bojar, V.; Nakamoto, J.A.; Kurata, T.; et al. The Structural Basis of Hyperpromiscuity in a Core Combinatorial Network of Type II Toxin–Antitoxin and Related Phage Defense Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2023**, *120*, e2305393120, doi:10.1073/pnas.2305393120.
336. LeRoux, M.; Srikant, S.; Teodoro, G.I.C.; Zhang, T.; Littlehale, M.L.; Doron, S.; Badiiee, M.; Leung, A.K.L.; Sorek, R.; Laub, M.T. The DarTG Toxin-Antitoxin System Provides Phage Defence by ADP-Ribosylating Viral DNA. *Nat Microbiol* **2022**, *7*, 1028–1040, doi:10.1038/s41564-022-01153-5.
337. Burman, N.; Belukhina, S.; Depardieu, F.; Wilkinson, R.A.; Skutel, M.; Santiago-Frangos, A.; Graham, A.B.; Livenskyi, A.; Chechenina, A.; Morozova, N.; et al. A Virally Encoded tRNA Neutralizes the PARIS Antiviral Defence System. *Nature* **2024**, *634*, 424–431, doi:10.1038/s41586-024-07874-3.
338. Millman, A.; Melamed, S.; Leavitt, A.; Doron, S.; Bernheim, A.; Hör, J.; Garb, J.; Bechon, N.; Brandis, A.; Lopatina, A.; et al. An Expanded Arsenal of Immune Systems That Protect Bacteria from Phages. *Cell Host & Microbe* **2022**, *30*, 1556-1569.e5, doi:10.1016/j.chom.2022.09.017.
339. Stokar-Avihail, A.; Fedorenko, T.; Hör, J.; Garb, J.; Leavitt, A.; Millman, A.; Shulman, G.; Wojtania, N.; Melamed, S.; Amitai, G.; et al. Discovery of Phage Determinants That Confer Sensitivity to Bacterial Immune Systems. *Cell* **2023**, *186*, 1863-1876.e16, doi:10.1016/j.cell.2023.02.029.
340. Zhang, T.; Cepauskas, A.; Nadieina, A.; Thureau, A.; Coppieters ‘T Wallant, K.; Martens, C.; Lim, D.C.; Garcia-Pino, A.; Laub, M.T. A Bacterial Immunity Protein Directly Senses Two Disparate Phage Proteins. *Nature* **2024**, *635*, 728–735, doi:10.1038/s41586-024-08039-y.
341. Wang, Y.; Wu, H.; Li, J.; An, Q.; Tian, Z.; Deng, Z. Anti-Phage Defense Mechanism Involving Phage-Encoded DNA Binding Protein and Bacterial

- Reverse Transcriptase DRT4. *Nat Commun* **2025**, *17*, 289, doi:10.1038/s41467-025-66997-x.
342. Hsueh, B.Y.; Severin, G.B.; Elg, C.A.; Waldron, E.J.; Kant, A.; Wessel, A.J.; Dover, J.A.; Rhoades, C.R.; Ridenhour, B.J.; Parent, K.N.; et al. Phage Defence by Deaminase-Mediated Depletion of Deoxynucleotides in Bacteria. *Nat Microbiol* **2022**, *7*, 1210–1220, doi:10.1038/s41564-022-01162-4.
343. Gao, L.; Altae-Tran, H.; Böhning, F.; Makarova, K.S.; Segel, M.; Schmid-Burgk, J.L.; Koob, J.; Wolf, Y.I.; Koonin, E.V.; Zhang, F. Diverse Enzymatic Activities Mediate Antiviral Immunity in Prokaryotes. *Science* **2020**, *369*, 1077–1084, doi:10.1126/science.aba0372.
344. Yu, Y.T.; Snyder, L. Translation Elongation Factor Tu Cleaved by a Phage-Exclusion System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 802–806, doi:10.1073/pnas.91.2.802.
345. Li, H.; Tan, Y.; Basu, D.; Corbett, K.D.; Zhang, D. Unveiling the Multifaceted Domain Polymorphism of the Menshen Antiphage System. *Nucleic Acids Research* **2025**, *53*, gkaf357, doi:10.1093/nar/gkaf357.
346. Stokar-Avihail, A.; Fedorenko, T.; Hör, J.; Garb, J.; Leavitt, A.; Millman, A.; Shulman, G.; Wojtania, N.; Melamed, S.; Amitai, G.; et al. Discovery of Phage Determinants That Confer Sensitivity to Bacterial Immune Systems. *Cell* **2023**, *186*, 1863–1876.e16, doi:10.1016/j.cell.2023.02.029.
347. Doron, S.; Melamed, S.; Ofir, G.; Leavitt, A.; Lopatina, A.; Keren, M.; Amitai, G.; Sorek, R. Systematic Discovery of Antiphage Defense Systems in the Microbial Pangenome. *Science* **2018**, *359*, eaar4120, doi:10.1126/science.aar4120.
348. Zhang, Z.; Todeschini, T.C.; Wu, Y.; Kogay, R.; Naji, A.; Cardenas Rodriguez, J.; Mondi, R.; Kaganovich, D.; Taylor, D.W.; Bravo, J.P.K.; et al. Kiwa Is a Membrane-Embedded Defense Supercomplex Activated at Phage Attachment Sites. *Cell* **2025**, *188*, 5862–5877.e23, doi:10.1016/j.cell.2025.07.002.
349. Schiltz, C.J.; Lee, A.; Partlow, E.A.; Hosford, C.J.; Chappie, J.S. Structural Characterization of Class 2 OLD Family Nucleases Supports a Two-Metal Catalysis Mechanism for Cleavage. *Nucleic Acids Research* **2019**, *47*, 9448–9463, doi:10.1093/nar/gkz703.
350. Zhen, X.; Xu, X.; Ye, L.; Xie, S.; Huang, Z.; Yang, S.; Wang, Y.; Li, J.; Long, F.; Ouyang, S. Structural Basis of Antiphage Immunity Generated by a Prokaryotic Argonaute-Associated SPARSA System. *Nat Commun* **2024**, *15*, 450, doi:10.1038/s41467-023-44660-7.
351. Johnson, M.; Laderman, E.; Huiting, E.; Zhang, C.; Davidson, A.; Bondy-Denomy, J. Core Defense Hotspots within *Pseudomonas Aeruginosa* Are a Consistent and Rich Source of Anti-Phage Defense Systems 2022.
352. Loeff, L.; Walter, A.; Rosalen, G.T.; Jinek, M. DNA End Sensing and Cleavage by the Shedu Anti-Phage Defense System. *Cell* **2025**, *188*, 721–733.e17, doi:10.1016/j.cell.2024.11.030.
353. Li, Y.; Shen, Z.; Zhang, M.; Yang, X.-Y.; Cleary, S.P.; Xie, J.; Marathe, I.A.; Kostelic, M.; Greenwald, J.; Rish, A.D.; et al. PtuA and PtuB Assemble into an Inflammasome-like Oligomer for Anti-Phage Defense. *Nat Struct Mol Biol* **2024**, *31*, 413–423, doi:10.1038/s41594-023-01172-8.

354. Wu, Z.; Chen, G.; He, L.; Guo, H.; Yuan, R.; Su, H.; Xie, Z.; Li, F. Structural Insights into the Regulatory Mechanisms of the Toxic Activity of Sofic in Anti-Phage Defense Systems. *IJMS* **2025**, *26*, 6074, doi:10.3390/ijms26136074.
355. Kibby, E.M.; Conte, A.N.; Burroughs, A.M.; Nagy, T.A.; Vargas, J.A.; Whalen, L.A.; Aravind, L.; Whiteley, A.T. Bacterial NLR-Related Proteins Protect against Phage. *Cell* **2023**, *186*, 2410–2424.e18, doi:10.1016/j.cell.2023.04.015.
356. Gao, L.A.; Wilkinson, M.E.; Strecker, J.; Makarova, K.S.; Macrae, R.K.; Koonin, E.V.; Zhang, F. Prokaryotic Innate Immunity through Pattern Recognition of Conserved Viral Proteins. *Science* **2022**, *377*, eabm4096, doi:10.1126/science.abm4096.
357. Murphy, K.C. Bacteriophage P22 Abc2 Protein Binds to RecC Increases the 5' Strand Nicking Activity of RecBCD and Together with λ Bet, Promotes Chi-Independent Recombination1. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *296*, 385–401, doi:10.1006/jmbi.1999.3486.
358. Wilkinson, M.; Wilkinson, O.J.; Feyerherm, C.; Fletcher, E.E.; Wigley, D.B.; Dillingham, M.S. Structures of RecBCD in Complex with Phage-Encoded Inhibitor Proteins Reveal Distinctive Strategies for Evasion of a Bacterial Immunity Hub. *eLife* **11**, e83409, doi:10.7554/eLife.83409.
359. Millman, A.; Bernheim, A.; Stokar-Avihail, A.; Fedorenko, T.; Voichek, M.; Leavitt, A.; Oppenheimer-Shaanan, Y.; Sorek, R. Bacterial Retrons Function In Anti-Phage Defense. *Cell* **2020**, *183*, 1551–1561.e12, doi:10.1016/j.cell.2020.09.065.
360. Doron, S.; Melamed, S.; Ofir, G.; Leavitt, A.; Lopatina, A.; Keren, M.; Amitai, G.; Sorek, R. Systematic Discovery of Anti-Phage Defense Systems in the Microbial Pan-Genome. *Science* **2018**, *359*, eaar4120, doi:10.1126/science.aar4120.
361. Deep, A.; Gu, Y.; Gao, Y.-Q.; Ego, K.M.; Herzik, M.A.; Zhou, H.; Corbett, K.D. The SMC-Family Wadjet Complex Protects Bacteria from Plasmid Transformation by Recognition and Cleavage of Closed-Circular DNA. *Mol Cell* **2022**, *82*, 4145–4159.e7, doi:10.1016/j.molcel.2022.09.008.
362. Antine, S.P.; Johnson, A.G.; Mooney, S.E.; Leavitt, A.; Mayer, M.L.; Yirmiya, E.; Amitai, G.; Sorek, R.; Kranzusch, P.J. Structural Basis of Gabija Anti-Phage Defence and Viral Immune Evasion. *Nature* **2024**, *625*, 360–365, doi:10.1038/s41586-023-06855-2.
363. Zhuang, Z.; Cheng, Y.-Y.; Deng, J.; Cai, Z.; Zhong, L.; Qu, J.-X.; Wang, K.; Yang, L. Genomic Insights into the Phage-Defense Systems of *Stenotrophomonas Maltophilia* Clinical Isolates. *Microbiological Research* **2024**, *278*, 127528, doi:10.1016/j.micres.2023.127528.
364. Johnson, M.C.; Laderman, E.; Huiting, E.; Zhang, C.; Davidson, A.; Bondy-Denomy, J. Core Defense Hotspots within *Pseudomonas Aeruginosa* Are a Consistent and Rich Source of Anti-Phage Defense Systems. *Nucleic Acids Research* **2023**, *51*, 4995–5005, doi:10.1093/nar/gkad317.
365. Garrett, S.R.; Tucker, S.K.; Pavelka, V.; Roe, A.J.; Mariano, G. Genomic Islands in *Pseudomonas* Encode Modular Hotspots of Defence and Anti-Defence Systems. *NAR Genomics and Bioinformatics* **2025**, *7*, lqaf148, doi:10.1093/nargab/lqaf148.