



Research Paper

<https://doi.org/10.5564/pib.v39i2.3327>

PROCEEDINGS OF
PIB
THE INSTITUTE OF BIOLOGY

Bacteriolytic activity of phages isolated from wastewater

Gantulga ANUJIN^{1,2} , Janchiv KHULAN¹ , Baldorj OCHIRKHUYAG¹ ,
and Davaasuren TUMENJARGAL^{1*} 

¹Department of Biology, National University of Mongolia, Ulaanbaatar, 14201, Mongolia

²Institute of Plant and Agricultural Sciences, Darkhan-Uul province, 45047, Mongolia

*Corresponding author: tumenjargal@num.edu.mn, <https://orcid.org/0000-0002-9990-2682>

Abstract. Bacteriophages, which are viruses that infect bacteria, have a significant impact on the dynamics of bacterial communities, the evolution of bacterial genomes, and the biogeochemistry of ecosystems. The specific effects of these factors differ based on whether the phages establish lytic, chronic, or lysogenic infections. In this study, bacteriophages were isolated from wastewater samples obtained from the Central Wastewater Treatment Plant of Ulaanbaatar. The test strains of *Escherichia coli* NIM05 and *Pseudomonas aeruginosa* NIM09 from the collection of the Bacteriological Laboratory, the National Centre for Infectious Diseases were used to determine bacteriolytic activity of bacteriophages. Bacteriophages AT1 and AT2, demonstrating bacteriolytic activity, were isolated. Specifically bacteriophage AT1 was able to lyse 70.2% of cells from the total population of *E. coli* NIM05, while bacteriophage AT2 was able to lyse 78.5% of *P. aeruginosa* NIM09 within a 96-hour cultivation period. Bacteriophage titers were determined, resulting in 1.12×10^{10} PFU/m for the AT1 phage, and 0.98×10^{10} PFU/mL for the AT2 phage.

Keywords: Bacteriophage, bacteriolytic activity, bacteria, *E. coli*, *P. aeruginosa*, wastewater

Received 31 July 2023; received in revised form 22 October 2023; accepted 24 November 2023

© 2023 Author(s). This is an open access article under the [CC BY-NC 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Introduction

Many species of opportunistic or pathogenic bacteria inhabit diverse environments, including wastewater, soil, and air. Bacteriophages, ubiquitous wherever bacteria are present [1, 7], encompass both virulent types influencing lytic cycles, and temperate ones capable of undergoing virion-productive or lysogenic cycles [9, 19].

The issue of bacterial resistance to antibiotics has been highlighted by the World Health Organization (WHO) as one of the top 10 global public health threats [20]. Ciprofloxacin-resistant *E. coli* is found in more than 30 countries and regions, with prevalence rates ranging from 8.4% to 92.9% [8]. The WHO has published a list of highly antibiotic-resistant bacteria that need prioritised research and development for new antibiotics. The phages can also be a potential candidate for disinfection agents and viable alternatives for antibiotic treatment.

The objective of this study is to isolate bacteriophages capable of lysing *E. coli* and *P. aeruginosa* from wastewater and assess their bacteriolytic activity.

Materials and Methods

Host bacteria assessment:

The strains utilized as host bacteria in this study were *Escherichia coli* NIM05 and *Pseudomonas aeruginosa* NIM09, sourced from the collection at the Bacteriological Laboratory, National Centre for Infectious Diseases.

Methods for lysine, indole, and mobility determination

The use of Mobility-Indole-Lysine Medium enables the identification of Enterobacteriaceae family members through the examination of lysine decarboxylase, lysine deaminase, indole production, and mobility. Selected colonies were centrally inoculated with a straight inoculation needle, reaching a depth of $\frac{3}{4}$ volume of medium in the test tube. Test tubes were incubated at 37°C for 24 hours under aerobic conditions. After 24 hours of incubation, 4 drops of Kovac's reagent were introduced into each test tube, and results were evaluated within one minute.

Production of indole: when the colour of the bluish-purple medium transitions to yellow, this indicates the

formation of indole.

Utilization of lysine: The presence of a red ring on the medium's surface, after the addition of 4 drops of Kovac's reagent, signifies its ability to use lysine.

Movement of bacteria: motile bacteria will spread into the media, leading to a noticeable shift in the media's colour to blue.

Determination of urease activity

Urea is produced through the decarboxylation of amino acids, while the hydrolysis of urea generates ammonia and CO₂. The presence of ammonia increases the alkalinity of the medium, causing the colour of the medium with phenol red to shift from light orange to pink (fuchsia) in alkaline conditions. Pure cultures of pathogenic strains were inoculated into a medium and incubated at 37°C in aerobic conditions for 6 days. The culture medium does not change to a yellowish colour if the test bacteria is urease-negative.

Method for determination of citrate degrading activity

Simmons citrate agar was prepared to assess citrate degrading activity in pure cultures. Pure cultures of pathogenic bacteria were inoculated onto Simmons citrate agar, and the culture tubes were incubated at 37±2°C for 24 hours.

Positive test: if the citrate degrading activity is present, it results in a colour change of the Simmons citrate agar to a blue-green shade;

Negative test: In the absence of citrate degradation, the colour of the Simmons citrate agar remains dark green.

Catalase activity test

The selective media was used to incubate the bacterial cultures of *E. coli* and *P. aeruginosa* at 37°C for 24-48 hours. Using an inoculating needle, pick a colony transfer it to a glass slide, and smear the bacterial colony onto the glass slide. Apply a small amount of the catalase reagent to the smear, using 1 or 2 drops. Examine immediately for the rapid production of gas bubbles—indicating a positive test (bubbles of oxygen) or the absence of bubbles, indicating a negative test.

Oxidase activity test

The oxidase reagent is used to saturate a strip of filter paper with a 1% solution. A speck of pure culture, incubated for 18–24 hours, is rubbed on it with a platinum loop, and the resulting colour changes are observed. An intense deep-purple hue appearing within 5–10 seconds

indicates a positive reaction, whereas the absence of colouration or colouration occurring later than 2 minutes indicates a negative reaction.

Determination of pyocyanin production

Test bacteria were inoculated in nutrient broth and incubated at 37°C for 18 to 24 hours. A volume of 5 ml of the pure culture was then collected into a new tube, followed by the addition of 3-5 ml of chloroform. After the formation of the chloroform phase, 1 ml of a 3 mol/l hydrochloric acid solution was added and the mixture was shaken well. Pyocyanin exhibits solubility in organic solvents [6], including chloroform, and displays a characteristic blue hue. When the pH is reduced, it readily dissolves in the aqueous phase, leading to a transformation in colour to reddish pink.

Determination of antibiotic sensitivity

A pure culture suspension of each bacterium was prepared by culturing at 37°C for 24 hours and adjusting the concentration to 1x10⁶ CFU/ml using spectrophotometrical methods at OD600. Subsequently, 0.1ml of the selected bacterial culture was inoculated onto the surface of Nutrient agar plates. Antibiotic-containing paper disks (0.6 mm) were then applied to the Nutrient agar surface, and the plates were incubated at 37°C for 24 hours. Results were quantified by measuring the diameter of the inhibition zone in mm.

Isolation of bacteriophages

Bacteriophages were isolated from wastewater using the double-layer agar method [5, 14, 16].

The filtrate was incubated with test bacteria in Luria Bertani broth at 37°C overnight. Following this, the culture broth underwent centrifugation at 12,000 rpm for 10 min, and the resulting supernatant was collected and filtered using a 0.22 µm membrane to eliminate any remaining bacterial cells. Agar overlay assay was performed by pouring the top agar (LB consisting of 0.6% agar) into the bottom agar (LB consisting of 2% agar), where 100 µL of bacteriophage filtrate diluted with LB broth and 100 µL of test bacteria were poured onto the LB agar plate. The plates were then incubated at 37°C overnight and the formation of clear plaques could be observed. Phage purification procedures were repeated at least three times.

Bacteriophage titer determination

The titer was determined using the whole plate titer method. A series of tenfold dilutions of the bacteriophage sample were prepared using LB broth. In a sterile

microcentrifuge tube, 100 µL of the overnight or log phase cell culture was mixed with 100 µL of the phage sample aliquot. After closing the cap, the tube was gently tapped to ensure thorough mixing of cells and phages, followed by a 5–10 minute incubation for complete phage adsorption. Each dilution was then plated according to the agar overlay assay and incubated at 37°C overnight. The number of visible plaques was calculated within the range of 30 to 300 plaques, expressed as plaque-forming units per millilitre (PFU/mL).

The result is calculated using the following formula: $\text{pfu/mL} = (\text{plaque count}) / (\text{dilution factor}) * (\text{aliquot volume})$.

Determination of phages' bacteriolytic activity

Phages filtrate an equal volume added to the bacterial suspension and incubated at 37°C. The initial optical density of bacterial suspensions was corrected by McFarland Turbidity Standard (No. 0.5). Cell lysis was monitored for 96 hours using a UV-1100 Spectrophotometer ($\lambda = 600 \text{ nm}$).

Results

The purity of *E. coli* NIM 05 and *P. aeruginosa* NIM09 strains were confirmed by microbiological and physio-biochemical methods.

Physiological and biochemical activity of test bacteria

The stored test strains of *E. coli* NIM05 and *P. aeruginosa* NIM09 were cultivated in a selective medium and the purity of strains was examined by physiological and biochemical properties, as well as Gram staining. Results showed that both bacteria were Gram-negative, capable of utilizing glucose and lactose, negative for H₂S and urease production, and exhibited negative results for gas and citrate production. Additionally, the catalase and motility tests were positive for both strains. Lysine and indole tests were positive and the oxidase test was negative for *E. coli* NIM05. On the other hand, for *P. aeruginosa* NIM09, the lysine and indole tests were negative; while the oxidase test was positive (Table 1).

Results of pyocyanin reaction

Saleem et al. and Lau et al., determined that 90–95% of *P. aeruginosa* strains synthesize Pyocyanin - a blue phenazine pigment [11,17]. Our strain of *P. aeruginosa* NIM09 was found to be Pyocyanin positive (Fig. 1).

Result of antibiotic sensitivity test

The antibiotic sensitivity test of bacteria was determined by the disk diffusion method. The following

Table 1. Physiological and biochemical activity of host-bacteria

Bacteria	Morphology	Gram Strain	Physiological and biochemical properties										
			Glucose	Lactose	Gas	H ₂ S	Motility	Lysine	Indole	Urea	Citrate	Catalase	Oxidase
<i>E. coli</i> NIM05	Rod-shaped	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> NIM09	Rod-shaped	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+

Note: - negative, + positive

Table 2. Antibacterial activity of antibiotics against host bacteria

Antibiotics	Inhibition zone (mm)	
	<i>E. coli</i> NIM05	<i>P. aeruginosa</i> NIM09
Gentamicin (10 mcg/mL)	10.0 ± 0.1	9.4 ± 0.1
Penicillin G (10 mcg/mL)	-	-
Ampicillin (10 mcg/mL)	-	-
Methicillin (10 mcg/mL)	-	-
Cefazolin (30 mcg/mL)	9.2 ± 0.1	9.8 ± 0.1

Note: - resistant

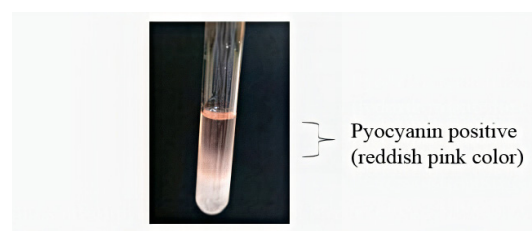


Fig. 1. Results of pyocyanin reaction of *P. aeruginosa* NIM09

five antibiotics were used in the assay: gentamicin with a concentration of 10 mcg/mL, penicillin G (10 mcg/mL), ampicillin (10 mcg/mL), methicillin (10 mcg/mL), and cefazolin (30 mcg/mL). The inhibition zone of *E. coli* NIM05 was 10.0 ± 0.1 mm for gentamicin and 9.2 ± 0.1 mm for cefazolin. Similarly, *P. aeruginosa* NIM09 was also sensitive to gentamicin and cefazolin, with inhibition zones of 9.4±0.1 mm and 9.8±0.1mm, respectively. Both bacterial strains demonstrated resistance to penicillin G, ampicillin, and methicillin (Table 2).

Isolation of bacteriophage

We isolated two phages from wastewater using the

double-layer soft agar method, which we named AT1 and AT2 (Fig. 2).

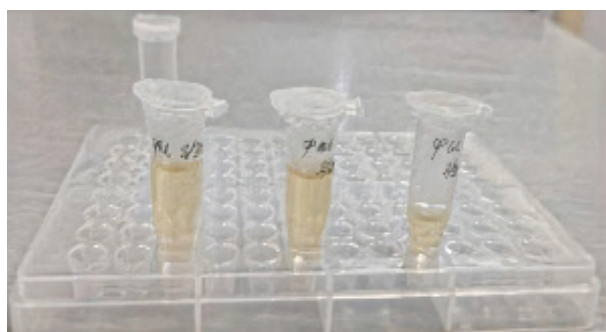


Fig. 2. Isolated bacteriophages suspension

The isolated bacteriophages, AT1 and AT2 were then incubated with *E. coli* NIM05 and *P. aeruginosa* NIM09 strains, respectively. Plaque formations were observed due to the inhibition of growth and lysis of the phage-infected cells on the bacterial lawn.

Plaques became visible on the solid medium after 24 to 72 hours of incubation at 37°C (Fig. 3). The isolated phages show clear plaques and vary in size and shape.

The results of determining of bacteriophages' titer

Following a series of tenfold dilutions, the phages infected with the test bacterial cultures, and incubated for 72 hours. the average number of plaques formed across three Petri dishes was 112 plaques for AT1 phages and 98 plaques for AT2 phages. The phage titer was calculated using the formula written in the methodology section. Consequently, the titer of phage AT1 was 1.12×10^{10} PFU/ml, and the titer of phage AT2 was 0.98×10^{10} PFU/ml, respectively.

Results of determination of phage bacteriolytic activity

Test bacterial pure cultures and those infected with phages AT1 and AT2, respectively, were incubated for 24–96 hours. The optical density of the bacterial

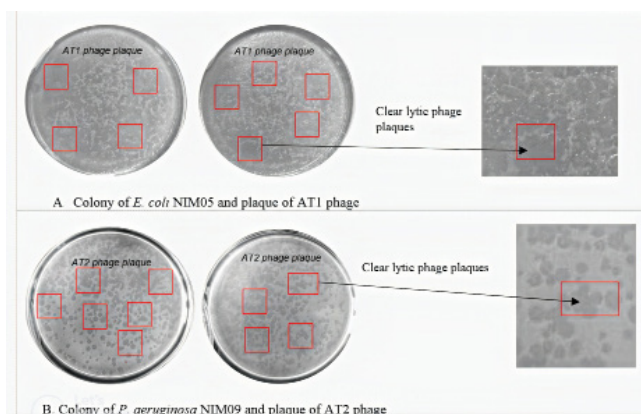


Fig. 3. Phage's plaque

Table 3. Bacteriolytic activity of AT1 phage (OD, λ=600 nm, 37°C)

Cultivation time	OD (<i>E. coli</i> NIM05 - control)	OD (<i>E. coli</i> NIM05 infected)	Bacteriolytic activity (%)
0	0.452	0.452	-
24	0.809	0.340	24.7
48	0.969	0.239	47.1
72	1.465	0.153	66.1
96	1.354	0.134	70.3

Table 4. Bacteriolytic activity of AT2 phage (OD, λ=600 nm, 37°C)

Cultivation time	OD (<i>P. aeruginosa</i> NIM09 - control)	OD (<i>P. aeruginosa</i> NIM09 - infected)	Bacteriolytic activity (%)
0	0.439	0.439	-
24	0.600	0.314	28.5
48	0.736	0.206	53.0
72	0.971	0.098	77.6
96	0.812	0.094	78.5

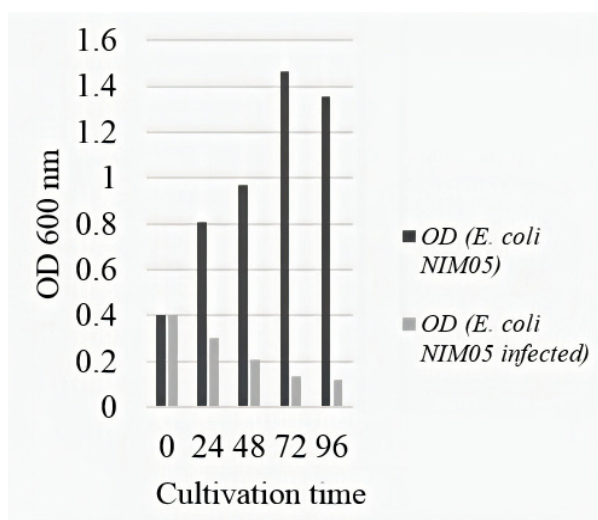


Fig. 4. Bacteriolytic activity of phages AT1

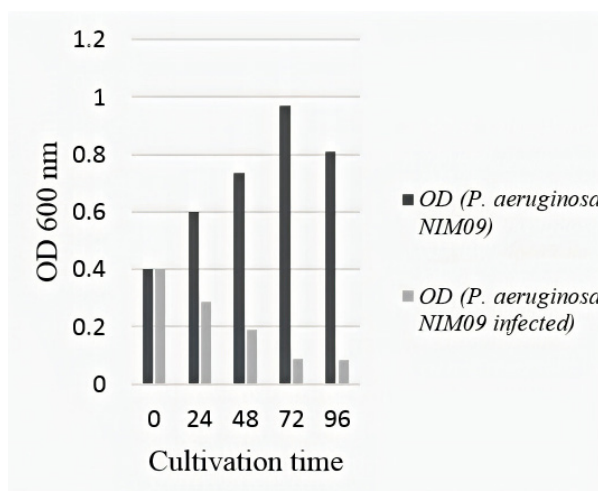


Fig. 5. Bacteriolytic activity of phages AT2

suspensions was measured at intervals of 24, 48, 72, and 96 hours of incubation (**Tables 3 and 4**).

The bacterial population was seen to decrease during the phage treatment (contrary to the control).

The bacteriolytic activity of phages AT1 and AT2 increased with time of incubation and reached its maximum activity with a death rate of 70.3% and 78.5%, respectively, at 96h (**Fig.s 4 and 5**).

Discussion

Bacteriophages are abundantly distributed in the environment, estimated to be around 10^{30} [3], with the aquatic environment serving as the main reservoir. The quantity of phages in sewage water has been approximated to range from 10^8 to 10^{10} , in contrast to seawater and soil [15]. The optimal population of microorganisms is effectively maintained by its crucial role. In the same manner, these bacteriophages have the ability to safeguard the population by eradicating harmful bacteria that threaten public health [4].

In their study, Mattila *et al.* carried out 283 phage isolation experiments targeting 83 distinct host strains. The outcome of their research revealed the discovery of a total of 108 bacteriophages [12]. The probability of cell death for *Acinetobacter baumannii* infection was 38.9%, *Enterococcus faecium/faecalis* was 33.9%, *E. coli* was 90.3%, *Klebsiella pneumonia* was 83.3%, *P. aeruginosa* was 79.4%, *Salmonella* sp. was 88.9%, and *S. aureus* was 6.1%, respectively [12].

The recent study uncovered two phages (AT1 and AT2), demonstrating the ability to lyse host strains *E. coli* NIM05 and *P. aeruginosa* NIM09, with a cell death ratio of approximately 70.2% and 78.5% after 96 hours of incubation, respectively. The bacteriolytic activity of the detected two phages (AT1 and AT2) aligns comparably with the results reported by Mattila *et al* [12].

One important aspect of phage infection and bacteriolytic activity is that phages may be either monovalent or polyvalent, thus causing fluctuations in their host range from narrow to broad. As a result of such behaviours of phages, it becomes relatively simple to isolate phages targeting prominent pathogenic bacteria, such as i.e. *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., and *S. aureus* [10].

Our isolated phages, AT1 and AT2 exhibit lytic activity against a single host genera of bacteria, so we supposed that these two phages are monovalent according to Ackermann and DuBow [2]. Additionally, when combined with previously isolated phages capable of lysing *Enterococcus faecalis* [18]. AT1 and AT2 may

find applicability in the treatment of severe skin wounds.

Several researchers have isolated and used phages for the treatment and prophylaxis of *E. coli* infections in animals i.e. lambs, calves, and piglets. The importance of phage therapy can also be determined from the fact that the wounds that have developed resistance to antibiotics resulting in various infectious diseases are now treated with phages, which includes the treatment of lung infections, meningitis, osteomyelitis and other wound infections caused by a variety of microbes including *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella* sp., and *Staphylococcus* sp. etc. [13].

Conclusion

Isolated bacteriophages (AT1 and AT2) show promising activity for lysing the antibiotic-resistant strains of *E. coli* NIM05 and *P. aeruginosa* NIM09, with a death rate of 70.3% and 78.5%, within 96 hours of cultivation, respectively.

The phage titer for AT1 was 1.12×10^{10} PFU/mL against *E. coli* NIM05, and for phage AT2 it was 0.98×10^{10} PFU/mL against *P. aeruginosa* NIM09.

Bacteriolytic phages attract attention not only from the point of view of environmental challenges such as water and soil bacterial pollution but also from the perspective of veterinary application. The isolated bacteriolytic phages could arouse interest as an alternative way to treat bacterial infections.

Acknowledgments

I would like to express my deepest gratitude to Associate Professor D. Tumenjargal Ph.D., who supervised my research. I am also grateful to my colleagues from the Bio-Innovation Department of the National Center for Public Health, who provided me the opportunity to conduct my research. Special thanks to M. Gerelt-Od, a laboratory technician at the Microbial Ecology and Biotechnology laboratory at the National University of Mongolia.





References

- [1] Ackermann, H.W., (2009). Phage classification and characterisation. *Methods. Mol. Biol.* 501, 127–140.
- [2] Ackermann, H.W. and DuBow, M.S. (1987). *Viruses of Prokaryotes: General Properties of Bacteriophages*; CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, USA, Volume 1, pp. 49–85.
- [3] Ashelford, K.E., Norris, S.J., Fry, J.C., Bailey, M.J. and Day, M.J. (2000). Seasonal population dynamics

- and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 10, pp. 4193-4199.
- [4] Beheshti Maal, K., Soleimani Delfan, A. and Salmanizadeh, S. (2015). Isolation and Identification of Two Novel *Escherichia coli* bacteriophages and their application in wastewater treatment and coliform's Phage Therapy. *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 8, no. 3, pp. e14945.
- [5] Chen, Y., Sun, E., Song, J. et al., (2018). Complete genome sequence of a novel T7-Like bacteriophage from a *Pasteurella multocida* capsular type A isolate. *Curr. Microbiol.* 75:574–579.
- [6] DeBritto, S., Gajbar, T.D., Satapute, P. et al., (2020). Isolation and characterization of nutrient-dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Sci. Rep.* 10, 1542 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58335-6>.
- [7] Fauquet, C.M., (2008). Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. *Encyclopedia of Virology*, 9-23. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00509-4>.
- [8] Geneva: World Health Organization., (2020). Global antimicrobial resistance surveillance system (glass) report: early implementation 2020.
- [9] Howard-Varona, C., Hargreaves, K., Abedon, S. et al., (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J* 11, 1511–1520 <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>.
- [10] Hyman, P. and Abedon, S.T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 70, pp. 217-248.
- [11] Lau, G.W. et al. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect. Immun.* 72, 4275–4278.
- [12] Mattila, S., Ruotsalainen, P., Jalasvuori, M., (2015). On-demand isolation of bacteriophages against drug-resistant bacteria for personalized phage therapy. *Front. Microbiol.*, 6, 1271. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01271>.
- [13] Monk, A., Rees, C., Barrow, P., Hagens, S. and Harper, D. (2010). Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology*, vol. 51, no. 4, pp. 363-369.
- [14] Rasool, M.H., (2016). Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Bacteriophages Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pakistan. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(10). <https://doi.org/10.5812/jjm.36135>.
- [15] Sharp, R. (2001). Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire)*, vol. 76, no. 7, pp. 667-672.
- [16] Safia Samir, A.E., (May 2022). Isolation and characterization of lytic bacteriophages from sewage at an Egyptian tertiary care hospital against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Saudi Journal of Biological Sciences* Volume 29. Issue 5. Pages 3097-3106. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.03.019>.
- [17] Saleem, H., Mazhar S, Syed Q, Javed MQ, Adnan A., (2021). Bio-characterization of food grade pyocyanin bio-pigment extracted from chromogenic *Pseudomonas* species found in Pakistani native flora. *Arab J. Chem.* 14(3):103005. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103005>.
- [18] Tumenjargal, D., Khulan, J., Anujin, G., Khaliunaa, T., Ochirkhuyag, B., (2023). A study on the detection of bacteriophages able to lyse *Staphylococcus aureus* and *Enterococci*. *Ecology and Geochemical Activity of Microorganisms in Extreme Environments*, 3rd all-Russian conference with international participation, Ulan-Ude – Baikalsk, July 3–7, 2023, Book of abstracts, Novosibirsk, 2023: pp.124.
- [19] Wardani, A. K., Nurbayu, I. R., Qodriyah, N.L., (2020). Isolation of lytic bacteriophages and their potential to control *Cronobacter* spp. opportunistic food-borne pathogens. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 475, 012086–. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/475/1/012086>.
- [20] World Health Organization. (accessed 15 January 2015). The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>



Бохир уснаас ялган авсан фагийн бактериолитик идэвх

Гантулга Анужин^{1,2} , Жанчив Хулан¹ , Балдорж Очирхуяг¹ ,
 Даваасүрэн Түмэнжаргал^{1*} 

¹Монгол Улс, Улаанбаатар, Монгол Улсын их сургууль, Шинжлэх ухааны сургууль, Байгалийн ухааны салбар, Биологийн тэнхим

²Монгол Улс, Дархан-Уул аймаг, Дархан, Ургамал газар тариалангийн хүрээлэн

*Холбоо барих зохиогч: tumenjargal@num.edu.mn, <https://orcid.org/0000-0002-9990-2682>

Хураангуй. Бактерид халдварладаг вирус нь бактерийн өсөлтийн динамик, бактерийн геномын хувьсал, экосистемийн биогеохимийн процесст нөлөөлдөг. Эдгээр нөлөөллүүд нь тухайн фагууд литик, архагшсан эсвэл лизоген халдвар үүсгэж байгаа эсэхээс хамаарч өөр өөр байдаг. Энэхүү судалгаанд ХӨСҮТ –ийн Нэгдсэн лабораторийн Нян судлалын лабораторид хадгалагдаж байгаа *Escherichia coli* NIM05 болон *Pseudomonas aeruginosa* NIM09 –ийн омгуудыг тест өсгөврөөр ашиглав. Улаанбаатар хотын Төв цэвэрлэх байгууламжийн бохир уснаас эдгээр өсгөврийг лизист оруулах чадвартай AT1 ба AT2 бактериофагуудийг ялгаж авав. AT1 бактериофаг *E. coli* –ийн нийт эсийн 70.2% –ийг, AT2 фаг *P. aeruginosa* –ийн нийт эсийн 78.5.5% –ийг 96 цагийн хугацаанд лизист оруулах чадвартай болохыг тогтоов. Ялгаж авсан AT1 фагийн титр 1.12×10^{10} PFU/mL, AT2 фагийн титр 0.98×10^{10} PFU/mL тус тус байна.

Түлхүүр үгс: Бактериофаг, бактериолитик идэвх, бактери, *E. coli*, *P. aeruginosa*, бохир ус

Хүлээн авсан 2023.07.31; хянан тохиолдуулсан 2023.10.22; зөвшөөрсөн 2023.11.24

© 2023 Зохиогчид. [CC BY-NC 4.0 лиценз](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Оршил

Хүрээлэн буй орчин, хөрс, агаар, бохир усанд олон төрлийн өвчин үүсгэгч бактери байдаг бөгөөд бактери байгаа бүхий л газарт [1,7] вирулент [9] эсвэл лизоген (temperate) бактериофагууд байдаг [19].

ДЭМБ-аас гаргасан тайланд бактерийн олон эмийн эсрэг тэсвэржилт ихсэж байгаа нь дэлхийн хүн ам болон нийгмийн эрүүл мэндийн тулгамдсан 10 асуудлын нэг хэмээн мэдээлсэн [20] бөгөөд 30 гаруй улс орон, бүс нутагт ципрофлоксацинд тэсвэртэй *E. coli* –н тархалт ойролцоогоор 8.4%-92.9% байна гэжээ [8]. ДЭМБ –аас шинэ антибиотикийг судлах, хөгжүүлэхэд нэн тэргүүнд шаардлагатай антибиотикт тэсвэртэй бактерийн жагсаалтыг гаргасан. Бактери антибиотикийн үйлчлэлд улам бүр тэсвэржиж байгаа нь судлаачдад бактериофагийн талаарх онол болон судалгааны мэдээллийг хангалттай өгөх, бактериофагийн эмчилгээнд хөрөнгө оруулалт хийх, фагийн чиглэлээр судалгааг түлхүү хийж, судлах шаардлагатайг харуулж байна.

Бид судалгаандаа Улаанбаатар хотын Төв цэвэрлэх байгууламжийн бохир уснаас *Escherichia coli* болон *Pseudomonas aeruginosa* –ийн эсийг лизист оруулах

чадвартай бактериофагийг цэврээр ялган авах, идэвхийг нь судлах зорилго тавьсан болно.

Материал, арга зүй

Тест бактери

Халдварт Өвчин Судлалын Үндэсний Төвийн Нэгдсэн лабораторийн Нян судлалын лабораторийн *E. coli* NIM05 болон *P. aeruginosa* NIM09 –ийн омгийг тест өсгөвөр болгон ашиглав.

Лизин, индол ба хөдөлгөөн тодорхойлох арга зүй

Хөдөлгөөн-Лизин-Индолын орчин нь *Enterobacteriaceae* –ийн овгийн төрөл, зүйлүүдийн лизин декарбоксилаза, лизин деаминаза, индол үүсгэлт болон бактерийн хөдөлгөөнийг илрүүлэхэд ашиглана.

Ариутгасан тарилгын зүү ашиглан бактерийн колониос авч тэжээлт орчны эзлэхүүний ¼ байхаар гүн рүү хатгаж тарилт хийнэ. Хуруу шилтэй орчинг 37°C-т 18–24 цаг өсгөвөрлөсний дараа Ковачийн урвалжаас 4 дуслыг дусааж, нэг минутын дотор үр дүнг тооцно.

Индол үүсгэлт: Хөх ягаан өнгийн тэжээлт орчны

өнгө хувиран шар өнгөтэй болсон бол индол үүсгэсэн.

Лизин ашиглах чадвар: Ковача уусмалаас 4 дуслыг дусаахад тэжээлт орчны гадаргуу дээр улаан өнгийн цагариг үүсэж байвал лизин ашиглах чадвартай.

Бактерийн хөдөлгөөн: Тарилт хийсэн хэсгээс бусад хэсэгт бактерийн ургалт тархсан байвал хөдөлгөөнтэй гэж тодорхойлно.

Мочевины идэвх тодорхойлох

Мочевин нь амин хүчлүүдийн декарбоксилжилтын бүтээгдэхүүн бөгөөд гидролизын дүнд аммиак, CO_2 үүсгэдэг. Аммиак үүсэх нь орчинг шүлтлэгжүүлж, шүлтлэг нөхцөлд фенол агуулсан орчны өнгө хувиран цайвар улбар шараас ягаан (fuchsia) болж өөрчлөгдөнө.

Эмгэг төрүүлэгч бактерийн цэвэр өсгөврөөс шээгтэй орчинд тарьж, агаартай нөхцөлд 37°C -т 6 хоногийн турш өсгөврөлөнө. Хэрэв тухайн бактери шээг сөрөг байвал өсгөврөлөж байгаа тэжээлт орчны өнгө шаргал болж өөрчлөгдөхгүй.

Цитрат задлах идэвхийг тодорхойлох арга

Симмонс цитрат агарыг ашиглан цитрат задлах идэвхийг тодорхойлно. Тест бактерийн цэвэр өсгөврөөс авч Симмонс цитрат агартай хуруу шилэнд тарьж $37\pm 2^\circ\text{C}$ -т 24 цагийн турш өсгөврөлөнө.

Эерэг сорил – Тэжээлт орчны өнгө өөрчлөгдөж цэнхэр-ногоон өнгөтэй болно.

Сөрөг сорил – Тэжээлт орчны өнгө өөрчлөгдөхгүй хар ногоон хэвээрээ байна.

Каталазын идэвхийг тодорхойлох арга

Тест бактерийн өсгөврийг сонгомол тэжээлт орчинд гадаргуугийн аргаар тарьж 37°C -т 24–48 цаг өсгөврөлөнө. Тарилгын гогцоогоор бактерийн колониос сонгон авч, тавиур шилэн дээр түрхэнэ. Түрхэц дээр каталазын урвалжаас 1-2 дуслыг нэмнэ. Хийн бөмбөлөг үүсч байвал каталаза эерэг, хэрэв хүчилтөрөгчийн бөмбөлөг үүсэхгүй байвал каталаза сөрөг байна.

Оксидазын идэвхийн тодорхойлох арга

Фильтрийн цаасыг 1%-ийн оксидазын урвалжийн уусмалд хийнэ. 18-24 цагийн турш өсгөврөлөсөн бактерийн өсгөврөөс гогцоогоор авч оксидазын урвалжтай фильтрийн цаасан дээр түрхэнэ. Толбоны өнгөний өөрчлөлтийг ажиглана. Оксидазын сорил эерэг бол 5-10 секунд дотор ягаан өнгө тодорч гарч ирнэ, сорил сөрөг үед ямар нэгэн өнгө үзүүлэхгүй.

Пиоцианины нийлэгжлийг тодорхойлох арга

Тест бактерийн өсгөврийг Nutrient шөлөнд тарьж 37°C -т 18-24 цагийн турш өсгөврөлөнө. Шинэ хуруу шилэнд бактерийн өсгөврөөс 5 мл –ийг хийж, дээрээс нь 3-5 мл хлороформ нэмнэ. Хлороформын үе үүссэний дараа 3 моль/л концентрацтай давсны хүчлээс 1 мл –ийг нэмж сайтар сэгсэрнэ. Пиоцианин нь хлороформ зэрэг органик уусгагчид [6] уусдаг бөгөөд цэнхэр өнгөтэй байна. Хүчиллэг рН-д цэнхэр өнгө нь уусаж улаавтар ягаан өнгөтэй болж өөрчлөгдөнө.

Антибиотикт мэдрэг чанарыг тодорхойлох арга

Тест бактерийн өсгөврийн суспензийн концентрацыг McFarland standart 0.5-аар 1×10^6 CFU/мл болгон тохируулан 0.1 мл –ийг авч Nutrient агарын гадаргуу дээр тарьж антибиотик агуулсан цаасан диск (0.6 мм) –ийг тэжээлт орчны гадаргуу дээр байрлуулж 37°C -н температурт 24 цагийн турш өсгөврөлөнө. Үр дүнг антибиотикийн дарангуйллын бүсийн диаметрийг хэмжиж тогтооно.

Бактериофаг ялгах арга

Бактериофагийг Double-layer soft agar method –аар ялгаж авна [7, 8, 9]. Бохир усыг $0.45 \mu\text{m}$ –ийн мембран фильтрээр шүүж, шүүгдсийг тест бактериартай LB шөлөнд (Luria Bertani) 37°C -т шөнийн турш өсгөврөлөнө. Өсгөврөлөсөн шөлийг центрифугийн 12000 эрг/мин –ээр 10 минут центрифугдэж, супернатентыг цуглуулан $0.22 \mu\text{m}$ –ийн мембран фильтрээр шүүж, бактерийн үлдэгдлээс цэвэрлэнэ. LB шөлөөр шингэлсэн 100 μl бактериофагийн дээж болон 100 мкл тест бактерийн өсгөврөөс тус тус авч 0.6% –ийн агартай (агарын дээд давхарга) LB –д хийж зөөлөн хольж 2% –ийн (агарын доод давхарга) LB орчинд хийж жигд тараана, 37°C –т шөнийн турш өсгөврөлөнө. Тэжээлт орчны гадаргуу дээр фагийн плаг үүснэ. Фагийн цэвэршүүлэлтийг хамгийн багадаа 3 удаа давтан хийнэ.

Бактериофагийн титрийг тодорхойлох

Whole plate titer шинжилгээний аргыг ашиглан тодорхойлно. LB шөлөөр бактериофагийн дээжийг аравтын цуваагаар шингэрүүлнэ. Ариутгасан микроцентрифугийн тюбэнд бактерийн өсгөвөр (100 мкл 18-24 цагийн өсгөвөр) болон фагийн дээжийг (100 мкл) 1:1 харьцаатайгаар хийж тюбений тагийг таглан зөөлөн холино. 5-10 минут тасалгааны температурт байлгаж фагийг бактерийн эсэд халдварлуулна. Аравтын шингэрүүлэлт тус бүрийг давхар агарын

аргын дагуу хийж 37°C-т 18-24 цаг өсгөвөрлөнө. Шингэрүүлгүүдээс плагийн тоо 30–300–ийн хооронд байх үр дүнг сонгон авч плаг үүсгэлтийг PFU/мл (plaque forming unit per mL) нэгжээр тооцоолж, үр дүнг дараах томъёогоор тооцоолно.

$$\text{pfu/мл} = (\text{плагийн тоо}) / (\text{уусмалын эзлэхүүн}) * (\text{шингэрүүлэлтийн зэрэг})$$

Фагийн бактериолитик идэвхийг тодорхойлох

Бактерийн цэвэр өсгөврийг хяналтаар харин бактериофагаар халдварласан тухайн бактерийн өсгөврийг 1:1 харьцаатайгаар хийж 37°C–т өсгөвөрлөнө. Халдварлуулаагүй өсгөвөр болон фагаар халдварлуулсан бактерийн суспензийн нягтыг McFarland Turbidity Standard (No. 0.5) уусмалаар тохируулна. UV-1100 спектрофотометрээр 600 нм–ийн долгионы уртад 96 цагийн хугацаанд хэмжинэ [9].

Үр дүн

Escherichia coli NIM05 болон *Pseudomonas aeruginosa* NIM09 омгийн цэвэр өсгөврийн шинж чанарыг физиологи-биохимийн аргаар шалгав.

Тест өсгөврүүдийн физиологи-биохимийн идэвх

E. coli NIM05, *P. aeruginosa* NIM09 өсгөврүүдийг сонгомол тэжээлт орчинд өсгөвөрлөн Грамын будалт болон физиологи-биохимийн шинж чанарыг тодорхойлоход тест бактериуд нь Грам сөрөг, глюкоза, лактоза ашиглах чадвартай, H₂S болон мочефин үүсгэдэггүй, хий үүсгэдэг, цитрат задалдаггүй, хөдөлгөөнтэй, каталаза эерэг байна. *E. coli* NIM05 өсгөврийн лизин, индолын сорил эерэг харин оксидаза сорил сөрөг байна. *P. aeruginosa* NIM09 өсгөвөр лизин болон индол сөрөг, оксидазын тест эерэг байна (1 –р хүснэгт).

Пиоцианины урвалын үр дүн

P. aeruginosa –ийн зүйлийн 90-95% нь пиоцианин (цэнхэр өнгийн Феназин пигмент) үүсгэдэг болохыг Saleem, H. et al. болон Lau, G.W. нар тогтоосон [11,17]. *P. aeruginosa* NIM09 омог пиоцианин эерэг байгааг тогтоов (1 –р зураг).

Антибиотикт мэдрэг чанарыг сорьсон үр дүн

E. coli NIM05 болон *P. aeruginosa* NIM09 өсгөврүүдийн антибиотикт мэдрэг чанарыг дискийн аргаар 10 мкг/мл концентрацтай гентамицин, пенициллин G (10 мкг/мл), ампициллин (10 мкг/мл), метициллин (10 мкг/мл), болон цефазолин (30 мкг/мл) зэрэг антибиотикийн эсрэг сорив. Тест

өсгөврүүд гентамицин болон цефазолинд мэдрэг байна: гентамицин *E. coli* NIM05 –ын эсрэг 10.0±0.1 мм, цефазолин 9.2±0.1мм дарангуйллын хүрээ үүсгэсэн; харин *P. aeruginosa* NIM09 гентамицинд 9.4±0.1 мм, цефазолинд 9.8±0.1 мм дарангуйллын хүрээг тус тус үүсгэсэн. Тест бактериуд пенициллин G, ампициллин, метицилинд тэсвэртэй байна (2 –р хүснэгт).

1 –р хүснэгт. Тест бактерийн физиологи, биохимийн идэвх

Бактер	Морфологи	Грамын будалт	Физиологи, биохимийн шинж чанар										
			Глюкоза	Лактоза	Хий	H ₂ S	Хөдөлгөөн	Лизин	Индол	Мочевин	Цитрат	Каталаза	Оксидаза
<i>E. coli</i> NIM05	Савханцар	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> NIM09	Савханцар	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+

Тайлбар: - сөрөг, + эерэг

2 –р хүснэгт. Тест бактерийн антибиотик мэдрэг чанар

Антибиотик	Дарангуйллын бүс (мм)	
	<i>E. coli</i> NIM05	<i>P. aeruginosa</i> NIM09
Гентамицин (10 мкг/мл)	10.0 ± 0.1	9.4 ± 0.1
Пенициллин G (10 мкг/мл)	–	–
Ампициллин (10 мкг/мл)	–	–
Метициллин (10 мкг/мл)	–	–
Цефазолин (30 мкг/мл)	9.2 ± 0.1	9.8 ± 0.1

Тайлбар: – тэсвэртэй

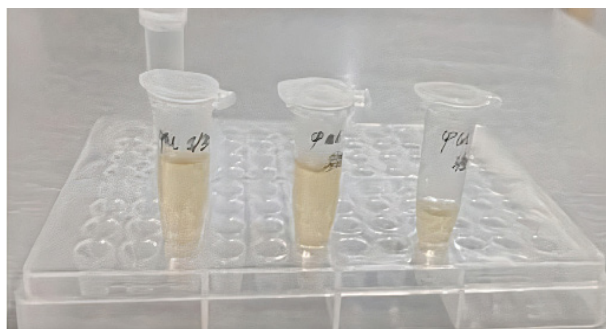


Пиоцианин эерэг (улаавтар ягаан өнгө)

1 –р зураг. *P. aeruginosa* –ийн пиоцианины урвалын үр дүн

Бактериофаг ялган авсан үр дүн

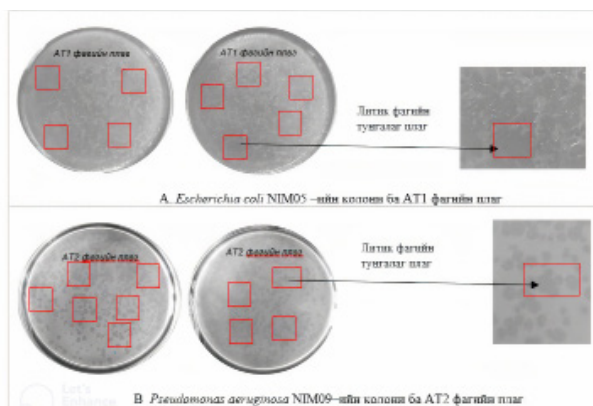
Бид бохир уснаас Double-layer soft agar –ийн аргаар хоёр фаг ялган авч AT1 болон AT2 фаг гэж дугаарлав (2-р зураг).



2 –р зураг. Ялгаж авсан бактериофагийн суспензи

E. coli NIM05 өсгөврийг AT1 фагтай хамт, *P. aeruginosa* NIM09 өсгөврийг AT2 фагтай хамт 37°C –т 24-72 цаг өсгөвөрлөхөд хатуу тэжээлт орчны гадаргуу дээр бактериофагийн тунгалаг плаг үүсэв (3 –р зураг).

Ялгаж авсан фагийн плагийн хэмжээ болон хэлбэр харилцан адилгүй байна.



3 –р зураг. Фагийн плаг

Фагийн титрийг тодорхойлсон үр дүн

Фагийн суспензийг 10–тын шингэрүүлгээр шингэлж, тест бактерийн өсгөвөрт халдварлуулан 72 цаг өсгөвөрлөхөд AT1 фаг 112 плаг, AT2 фаг 98 плаг (гурван Петрийн аяганы дундаж) үүсгэсэн. Фагийн титрийг арга зүйн хэсэгт бичсэн томъёогоор тооцоолоход AT1 фагийн титр 1.12×10^{10} PFU/мл, AT2 фагийн титр 0.98×10^{10} PFU/мл тус тус байна.

Фагийн бактериолитик идэвхийг тодорхойлсон үр дүн

Тест бактерийн 2 өсгөврийг хяналтаар, AT1 болон AT2 фагаар тус тус халдварлуулсан дээрх тест бактерийн өсгөврийг 96 цагийн турш өсгөвөрлөн өсгөврийн суспензийн гэрлийн нягтыг инкубацийн 24, 48, 72, 96 цагт тус тус хэмжиж идэвхийг тогтоов (3 ба 4 –р хүснэгт).

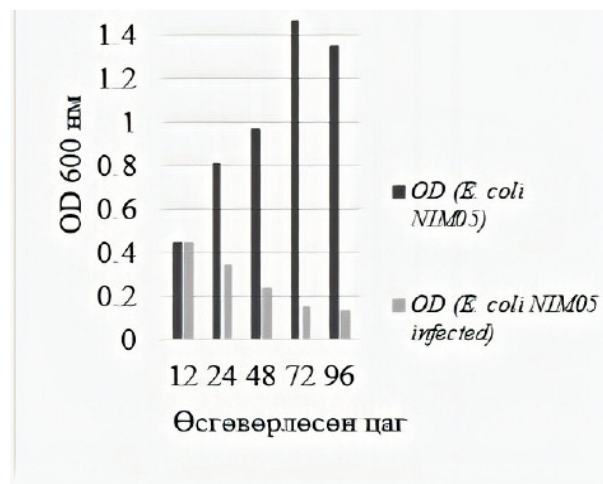
Фагаар халдварлуулсан тест бактерийн өсгөврийн нийт тоо хяналттай харьцуулахад эрс буурч байна. AT1 фаг *E. coli* NIM05 –ийн суспензи дэх нийт эсийн

3 –р хүснэгт. AT1 фагийн бактериолитик идэвх (OD, $\lambda=600$ нм, 37°C)

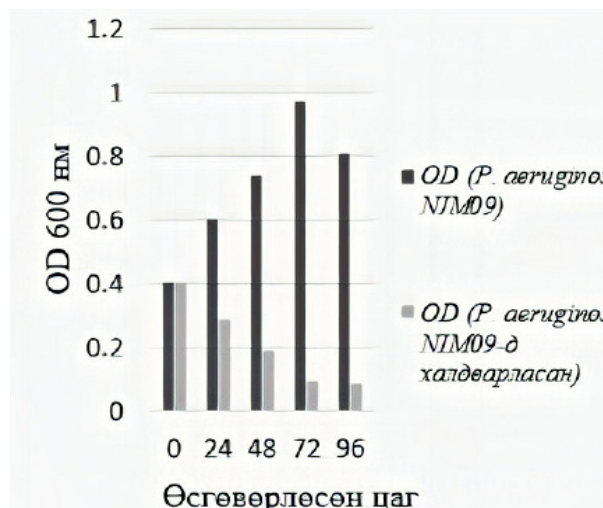
Өсгөвөрлөсөн цаг	OD (<i>E. coli</i> NIM05 - хяналт)	OD (<i>E. coli</i> NIM05–ийг фагаар халдварлуулсан)	Бактериолитик идэвх (%)
0	0.452	0.452	-
24	0.809	0.340	24.7
48	0.969	0.239	47.1
72	1.465	0.153	66.1
96	1.354	0.134	70.3

4 –р хүснэгт. AT2 фагийн бактериолитик идэвх (OD, $\lambda=600$ нм, 37°C)

Өсгөвөрлөсөн цаг	OD (<i>P. aeruginosa</i> NIM09–хяналт)	OD (<i>P. aeruginosa</i> NIM09–йг фагаар халдварлуулсан)	Бактериолитик идэвх (%)
0	0.439	0.439	-
24	0.600	0.314	28.5
48	0.736	0.206	53.0
72	0.971	0.098	77.6
96	0.812	0.094	78.5



4 –р зураг. AT1 фагийн бактериолитик идэвх



5 –р зураг. AT2 фагийн бактериолитик идэвх

70.3% -ийг (4 –р зураг), харин АТ2 фаг *P. aeruginosa* NIM09 –ийн нийт эсийн 78.5% -ийг 96 цагийн дотор задлах чадвартай байна (5–р зураг).

Хэлэлцүүлэг

Бактериофаг нь хүрээлэн буй орчинд элбэг тархсан ба ойролцоогоор тэдгээрийн нийт тоог 10^{30} гэж тооцоолсон байдаг [3]. Усан орчин нь фагийн баялаг эх үүсвэр бөгөөд бохир усан дахь фагийн тоо нь далайн ус болон хөрстэй харьцуулахад 10^8 – 10^{10} байна [15]. Фаг нь бичил биетний оптимал популяцийг үүсэхэд чухал үүрэг гүйцэтгэдэг. Нийгмийн эрүүл мэндэд аюул учруулж буй эмгэг төрүүлэгч бактерийн өвчлөлтэй тэмцэхэд ч бактериолитик фаг ач холбогдолтой байна [4].

Маттила нар 83 тест бактерийн эсрэг нийт 283 фаг үйлчлүүлж шинээр 108 бактериолитик фаг ялгаж авсан. Тэдгээр нь *Acinetobacter baumannii* –ийн эсийн 38.9%, *Enterococcus faecium/faecalis*–ийн эсийн 33.9%, *E. coli* –ийн эсийн 90.3%, *Klebsiella pneumoniae*–ийн эсийн 83.3%, *P. aeruginosa*–ийн эсийн 79.4%, *Salmonella* sp.–ийн эсийн 88.9%, *S. aureus*–ийн эсийн 6.1%–ийг тус тус лизист оруулж байгааг тогтоосон [12].

Бид *Escherichia coli* NIM05 болон *Pseudomonas aeruginosa* NIM09 омгуудыг лизист оруулах чадвартай АТ1 болон АТ2 хоёр фаг ялгаж авсан бөгөөд тест бактерийн өсгөврүүдийг тухайн фагуудаар халдварлуулж өсгөвөрлөхөд нийт эсийн 70.3% болон 78.5% –ийг тус тус лизист оруулах чадвартай байгааг тогтоов. Бохир уснаас ялгаж авсан эдгээр фагийн бактериолитик идэвхийг Маттила нарын үр дүнтэй жишиж болохуйц байна.

Түмэнжаргал нар бохир усны дээжээс *Enterococcus faecalis* болон *S. aureus* –ийн эсийг лизист оруулах чадвартай хоёр төрлийн бактериолитик фаг ялгаж авсан ба эдгээр фагууд 0.2 ± 0.1 мм хэмжээтэй плаг үүсгэдгийг тогтоосон [18].

Фагийн халдвар болон бактериолитик идэвх тухайн фаг моновалент эсвэл поливалент байхаас хамаарч тэдгээрийн эзэн эсийн хүрээ өөр өөр байдаг. Фагийн энэхүү шинж чанарыг ашиглан эмгэг төрүүлэгч бактери, тухайлбал *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. болон *S. aureus* –ийн эсрэг идэвхтэй фагуудийг ялган авах боломжтой [10].

Бидний ялгаж авсан АТ1 болон АТ2 фагууд нь зөвхөн өөрийн эзэн бактерийг лизист оруулж байгаа нь Ackermann ба DuBow нарын тодорхойлолтын дагуу эдгээр фагууд моновалент шинж чанартай байна [2].

Гадны зарим судлаачид хурга, тугал, гахай зэрэг амьтдын *E. coli*–ийн гаралтай халдварыг эмчлэх, халдвараас урьдчилан сэргийлэх зорилгоор фагуудийг ялган авч судалсан. Төрөл бүрийн халдварт өвчний антибиотикийн үйлчлэлд тэсвэртэй болсон бактерийн халдварын эсрэг эмчилгээнд бактериолитик фагийг хэрэглэсэн нь үр дүнтэй байна, тухайлбал уушгины халдвар, менингит, остеомиелитийг эмчлэхэд мөн түүнчлэн *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella* sp., *Staphylococcus* sp. –ийн гаралтай халдварыг эмчлэхэд [13].

Дүгнэлт

Бохир уснаас ялгаж авсан АТ1 фаг антибиотикт тэсвэртэй тест бактери *E. coli* NIM05 –ийн нийт эсийн 70.3% –ийг харин АТ2 фаг *P. aeruginosa* NIM09 –ийн нийт эсийн 78.5% -ийг задлах чадвартай байгаа нь бидний ялгаж авсан фагууд бактериолитик идэвхтэй байна.

АТ1 фагийн титр 1.12×10^{10} PFU/мл харин АТ2 фагийн титр 0.98×10^{10} PFU/мл байна.

Бактериолитик фагийн судалгаа нь хүрээлэн буй орчны тулгамдсан асуудал болох ус болон хөрсний өвчин үүсгэгч бактерийн бохирдлыг бууруулахаас гадна мал эмнэлгийн практикт ашиглах асуудал ихээхэн анхаарал татаж байна. Мөн түүнчлэн эмгэг төрүүлэгч бактерийн халдварын эсрэг эмчилгээний шинэ арга боловсруулахад бактериолитик фагийг ашиглах боломжтой байна.

Талархал

Судалгааны ажлын арга зүй боловсруулах, судалгааг гүйцэтгэх, үр дүнг нэгтгэх явцад онол арга зүйн үнэтэй зөвлөгөө өгч тусалсан удирдагч багш Дэд профессор, доктор Д.Түмэнжаргал болон судалгааг хийхэд тусламж дэмжлэг үзүүлсэн Нийгмийн эрүүл мэндийн үндэсний төвийн Биоинновацийн албаны ажилчид, МУИС -ийн ШУС-ийн Биологийн тэнхимийн Микробиологийн дэд хөтөлбөрийн лаборантаар ажиллаж байсан М.Гэрэлт-Од нартаа талархал илэрхийлье.

Ашигласан бүтээл

- [1] Ackermann, H.W., (2009). Phage classification and characterisation. *Methods. Mol. Biol.* 501, 127–140.
- [2] Ackermann, H.W. and DuBow, M.S. (1987). *Viruses of Prokaryotes: General Properties of Bacteriophages*; CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, USA, Volume 1, pp. 49–85.

- [3] Ashelford, K.E., Norris, S.J., Fry, J.C., Bailey, M.J. and Day, M.J. (2000). Seasonal population dynamics and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 10, pp. 4193-4199.
- [4] Beheshti Maal, K., Soleimani Delfan, A. and Salmanizadeh, S. (2015). Isolation and Identification of Two Novel *Escherichia coli* bacteriophages and their application in wastewater treatment and coliform's Phage Therapy. *Jundishapur Journal of Microbiology*, vol. 8, no. 3, pp. e14945.
- [5] Chen, Y., Sun, E., Song, J. *et al.*, (2018). Complete genome sequence of a novel T7-Like bacteriophage from a *Pasteurella multocida* capsular type A isolate. *Curr. Microbiol.* 75:574–579.
- [6] DeBritto, S., Gajbar, T.D., Satapute, P. *et al.*, (2020). Isolation and characterization of nutrient-dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Sci. Rep.* 10, 1542 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58335-6>.
- [7] Fauquet, C.M., (2008). Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. *Encyclopedia of Virology*, 9-23. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00509-4>.
- [8] Geneva: World Health Organization., (2020). Global antimicrobial resistance surveillance system (glass) report: early implementation 2020.
- [9] Howard-Varona, C., Hargreaves, K., Abedon, S. *et al.*, (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J* 11, 1511–1520 <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>.
- [10] Hyman, P. and Abedon, S.T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 70, pp. 217-248.
- [11] Lau, G.W. *et al.* (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect. Immun.* 72, 4275–4278.
- [12] Mattila, S., Ruotsalainen, P., Jalasvuori, M., (2015). On-demand isolation of bacteriophages against drug-resistant bacteria for personalized phage therapy. *Front. Microbiol.*, 6, 1271. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01271>.
- [13] Monk, A., Rees, C., Barrow, P., Hagens, S. and Harper, D. (2010). Bacteriophage applications: where are we now? *Letters in Applied Microbiology*, vol. 51, no. 4, pp. 363-369.
- [14] Rasool, M.H., (2016). Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Bacteriophages Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pakistan. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(10). <https://doi.org/10.5812/jjm.36135>.
- [15] Sharp, R. (2001). Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire)*, vol. 76, no. 7, pp. 667-672.
- [16] Safia Samir, A.E., (May 2022). Isolation and characterization of lytic bacteriophages from sewage at an Egyptian tertiary care hospital against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Saudi Journal of Biological Sciences* Volume 29. Issue 5. Pages 3097-3106. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.03.019>.
- [17] Saleem, H., Mazhar S, Syed Q, Javed MQ, Adnan A., (2021). Bio-characterization of food grade pyocyanin bio-pigment extracted from chromogenic *Pseudomonas* species found in Pakistani native flora. *Arab J. Chem.* 14(3):103005. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103005>.
- [18] Tumenjargal, D., Khulan, J., Anujin, G., Khaliunaa, T., Ochirkhuyag, B., (2023). A study on the detection of bacteriophages able to lyse *Staphylococcus aureus* and *Enterococci*. Ecology and Geochemical Activity of Microorganisms in Extreme Environments, 3rd all-Russian conference with international participation, Ulan-Ude – Baikalsk, July 3–7, 2023, Book of abstracts, Novosibirsk, 2023: pp.124.
- [19] Wardani, A. K., Nurbayu, I. R., Qodriyah, N.L., (2020). Isolation of lytic bacteriophages and their potential to control Cronobacter spp. opportunistic food-borne pathogens. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 475, 012086–. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/475/1/012086>.
- [20] World Health Organization. (accessed 15 January 2015). The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>