

Bacteriophages from waters of the Volga region



Fedorova M.S.*, Mutallapova G.I., Aznabayeva Z.A., Ilyina V.N., Zakarova N.D., Yadykova L.L., Trizna E.Y., Kayumov A.R.

Kazan (Volga Region) Federal University, 18 Kremlevskaya str., Kazan, 420008, Russia, Republic of Tatarstan

ABSTRACT. One of the promising approaches to the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria looks a therapy with bacteriophage. While bacteriophages are indifferent to bacterial resistance to antibiotics, bacteriophages are generally strain-specific, i.e., various isolates of the same bacterium can be insensitive to the given phage, that requires the creation of the library of bacteriophages. Here we report the isolation from wastewater from the city of Kazan (Republic of Tatarstan) the number of bacteriophages virulent against a number of opportunistic bacteria (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* and *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica* Enteritidis and Typhimurium). Phages formed a clear plaques on the bacterial lawn and had a titer up to 10^9 PFU/ml. Additionally, the polyvalent properties of bacteriophages were revealed: KES1, KES2 are lytic against *C. sakazakii* and *S. enterica* serovar Enteritidis, KST1 lyses *S. enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium, KEF1 is virulent against *E. faecalis* and *S. enterica* serovar Enteritidis.

Keywords: bacteriophages, waste waters, infectious diseases

For citation: Fedorova M.S., Mutallapova G.I., Aznabayeva Z.A., Ilyina V.N., Zakarova N.D., Yadykova L.L., Trizna E.Y., Kayumov A.R. Bacteriophages from waters of the Volga region // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 881-887. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-881

1. Introduction

In recent decades, the improper use of antibiotics has significantly increased the spread of bacteria resistance to various antimicrobials. Being a great threat to the health of humanity, the multidrug resistant bacteria contribute to the development of nosocomial infections with increased mortality (Scholtz et al., 2021; Ma et al., 2020). To the date, 12 species of multidrug-resistant bacteria playing a major role in the occurrence of difficult-to-treat infections are included in the list of World Health Organization (WHO) (Rice, 2008; Hoenes et al., 2021; Kalpana et al., 2023). Among them, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella enterica* (serovars) cause infections of the genitourinary system and the gastrointestinal tract in humans (Chang et al., 2021; Bonten et al., 2021; Zhou et al., 2021; Cattoir, 2022; Mkgangara, 2023). The use of bacteriophages can be a promising alternative to antimicrobial therapy for these infections. The main advantage of bacteriophages is their insensitivity to antibiotic resistance (Alharbi and Ziadi, 2021; Pirnay, 2020). Therefore, phages can be

used individually or in combination with conventional antimicrobials (Lewis, 2020; Hatfull et al., 2022). From the other hand, bacteriophages are generally strain-specific, i.e., various isolates of the same bacterium can be insensitive to the given phage. Therefore, a mixture of phages targeting various bacterial isolates should be used for the treatment of the infection, and the library of bacteriophages should be available (Abedon et al., 2021) and therefore the wastewaters and the natural waters are reservoirs for these viral particles. In this study, bacteriophages were isolated from wastewater from the city of Kazan (Republic of Tatarstan), virulent against *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii*, *E. faecalis*, and *S. enterica* (serovars).

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Enterococcus faecalis strains ATCC 19433 NCTC 775, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883 NCTC 9633, *Enterobacter* (*Cronobacter*)

*Corresponding author.

E-mail address: MaSFedorova97@mail.ru (M.S. Fedorova)

Received: May 31, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



sakazakii CCM 3461, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis WHO, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Bacteria were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) broth (Sambrook et al., 1989). The agarized medium, LB (A), includes an additional 2% agar. Semi-liquid agarized medium contained (g/l): agar - 6; NaCl - 6.

2.2. Sample preparation

A water sample (100 ml) was filtered through a paper filter to remove big particles and the resulting filtrate was then filtered twice through a nitrocellulose membrane with a pore diameter of 0.45 µm, with final filtration through a syringe filter with a pore diameter of 0.22 µm.

2.3. Preparation of concentrated sterile phagolysates

The resulting sterile filtrate was mixed in a ratio of 1:1 with a 3 × LB broth, and the resulting suspension was mixed in a ratio of 1:1 with an overnight culture of the host bacterium. Bacteria were incubated with shaking for 24 hours at 30 °C. Next, the cells were removed by centrifugation for 40 minutes at 4000 rpm and 4 °C and the chloroform was added (3% v/v). After the incubation for 24 hours at 4 °C, the mixture was centrifuged at 4000 rpm and filtered through a syringe nitrocellulose filter with a pore diameter of 0.22 µm.

2.4. Bacteriophages detection

The presence of bacteriophages was evaluated by the lysis zones formation in Otto assay (Otto et al., 1922) and the spot assay. Morphology and separation of phage plaques were performed using serial dilutions of phagolysates by the Gratia approach (Gratia, 1936).

3. Results and discussions

Isolation of bacteriophages lysing bacteria *E. coli*, *C. sakazakii*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, and *S. enterica* (serovars).

Bacteriophages lysing *E. coli*, *C. sakazakii*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* and *S. enterica* (serovars) were isolated from wastewaters Kazan city (Republic of Tatarstan) (Fig. 1A). Lysis zones were formed on the lawn of each bacterium, indicating the presence of lytic bacteriophages in the corresponding suspension, virulent against the target host bacterium as indicated.

Next, the morphology of bacteriophage plaques was analyzed. For that, serial dilution of phage lysates were prepared according to the Gratia approach. Several types of plaques have been observed on the agar cup, which probably indicates the different nature of bacteriophages. Each type of plaque has been isolated and phages have been purified until apparent homogeneity of plaques formed on the solid medium (Fig. 1B).

Intriguingly, during the strain-specificity test the polyvalent properties of some phages have been discovered. Thus, isolates KES1, KES2 turned out to be virulent against the bacteria *C. sakazakii* and serovar Enteritidis *S. enterica*. Bacteriophage KST1 lysed bacteria *S. enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. The KEF1 bacteriophage was effective against both *S. enterica* serovar Enteritidis and *E. faecalis* (Fig. 2). Polyvalent bacteriophages are known to be more effective against bacterial infections (Abedon et al., 2021). Therefore, the ES1, ES2 KST1 and KEF1 can be of interest for further investigations.

4. Conclusions

In this work, ten bacteriophages lysing opportunistic bacteria *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii* и *E. faecalis*, *S. enterica* (serovars) have been isolated: two bacteriophages against *K. pneumoniae*, two against *E. coli*, two against *C. sakazakii*, one against *S. enterica*

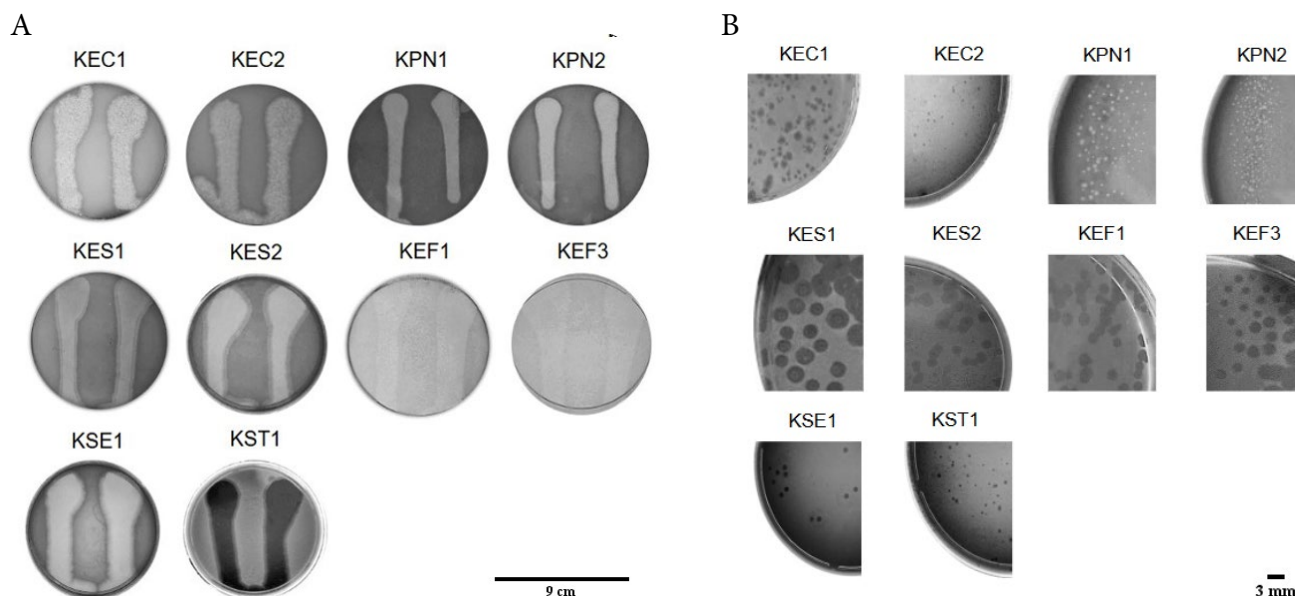


Fig.1. Bacteriophages and their host bacteria: zones of lysis by bacteriophages on bacterial lawns of *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii*, *E. faecalis* and *S. enterica* (serovars) in the Otto assay (A) and plaques in Gratia assay (B). Host strains: KEC1, KEC2 - *E. coli*; KPN1, KPN2 - *K. pneumoniae*, KES1, KES2 - *C. sakazakii*, KEF1, KEF3 - *E. faecalis*, KSE1, KST1 - *S. enterica* (serovars)

ica serovar Enteritidis and one against *S. enterica* serovar Typhimurium. Additionally, the polyvalent properties of bacteriophages were revealed: ES1, ES2 are lytic against *C. sakazakii* and *S. enterica* serovar Enteritidis, KST1 lyses *S. enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium, KEF1 is virulent against *E. faecalis* and *S. enterica* serovar Enteritidis.

Acknowledgements

The work was carried out at the expense of a grant allocated to the Kazan Federal University to complete a task in the field of scientific activity. Project № FZSM2022-0017 (E.Y.Trizna).

Conflict of interest

The author declare no conflicts of interest.

References

- Abedon S.T., Danis-Wlodarczyk K.M., Wozniak D.J. 2021. Phage cocktail development for bacteriophage therapy: toward improving spectrum of activity breadth and depth. *Pharmaceuticals* 14: 1019. DOI: [10.3390/ph14101019](https://doi.org/10.3390/ph14101019)
- Alharbi N.M., Ziadi M.M. 2021. Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28: 4358-4364. DOI: [10.1016/j.sjbs.2021.04.025](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.025)
- Bonten M., Johnson J., Biggelaar A. et al. 2021. Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: a systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases* 72: 1211-1219. DOI: [10.1093/cid/ciaa210](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210)
- Cattoir V. 2022. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. *Current Opinion in Microbiology* 65: 73-80. DOI: [j.mib.2021.10.013](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.013)
- Chang D., Sharma L., Cruz C. et al. 2021. Clinical epidemiology, risk factors, and control strategies of *Klebsiella pneumoniae* infection. *Frontiers in microbiology* 12: 750662. DOI: [10.3389/fmicb.2021.750662](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750662)
- Gratia A. 1936. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bacteriophages. *Annales de l'Institut Pasteur*. Masson Publishing, France.
- Hatfull G.F., Dedrick R.M., Schooley R.T. 2022. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. *Annual review of medicine* 73: 197-211. DOI: [10.1146/annurev-med-080219-122208](https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219-122208)
- Hoenes K., Bauer R., Meurle T. et al. 2021. Inactivation effect of violet and blue light on ESKAPE pathogens and closely related non-pathogenic bacterial species—a promising tool against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant microorganisms. *Frontiers in microbiology* 11: 612367. DOI: [10.3389/fmicb.2020.612367](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612367)
- Kalpana S., Lin W., Wang Y. et al. 2023. Antibiotic Resistance Diagnosis in ESKAPE Pathogens—A Review on Proteomic Perspective. *Diagnostics* 13: 1014. DOI: [10.3390/diagnostics13061014](https://doi.org/10.3390/diagnostics13061014)

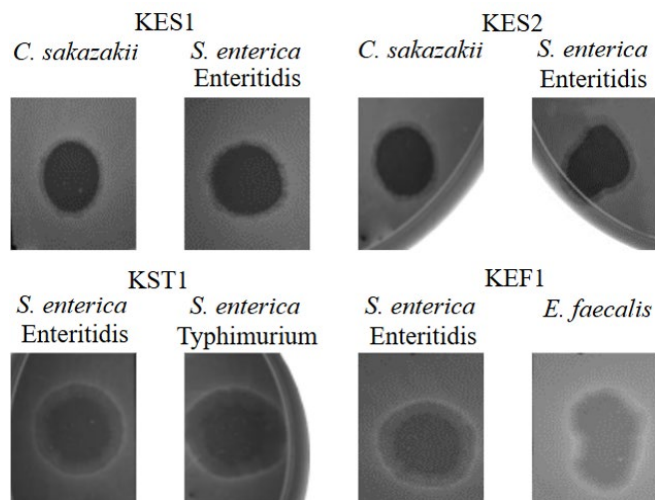


Fig.2. Polyvalent properties of bacteriophages KES1, KES2, KST1, KEF1. Zones of lysis by bacteriophages on bacterial lawns of *C. sakazakii*, *E. faecalis* and *S. enterica* (serovars) in the spot assay

- Lewis K. 2020. The science of antibiotic discovery. *Cell* 181: 29-45. DOI: [10.1016/j.cell.2020.02.056](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056)
- Ma Y.X., Wang C., Li Y. et al. 2020. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Advanced Science* 7: 1901872. DOI: [10.1002/advs.201901872](https://doi.org/10.1002/advs.201901872)
- Mkangara M. 2023. Prevention and control of human *Salmonella enterica* infections: An implication in food safety. *International Journal of Food Science* 2023. DOI: [10.1155/2023/8899596](https://doi.org/10.1155/2023/8899596)
- Otto R., Munter H., Winkler W.F. 1922. Contributions to the d'Hérelle phenomenon. *Journal of Hygiene and Infectious Diseases*. 96: 118-160.
- Pirnay J.P. 2020. Phage therapy in the year 2035. *Frontiers in Microbiology* 11: 538375. DOI: [10.3389/fmicb.2020.01171](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01171)
- Rice L.B. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases* 197: 1079-1081. DOI: [10.1086/533452](https://doi.org/10.1086/533452)
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Scholtz V., Vankova E., Kasparova P. et al. 2021. Non-thermal plasma treatment of ESKAPE pathogens: a review. *Frontiers in Microbiology* 12: 737635. DOI: [10.3389/fmicb.2021.737635](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737635)
- Zhou A., Wang L., Zhang J. et al. 2021. Survival of viable but nonculturable *Cronobacter sakazakii* in macrophages contributes to infections. *Microbial Pathogenesis* 158: 105064. DOI: [10.1016/j.micpath.2021.105064](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105064)

Выделение бактериофагов из сточных вод г. Казани

Краткое сообщение

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Федорова М.С.*, Муталлапова Г.И., Азнабаева З.А., Ильина В.Н.,
Закарова Н.Д., Ядыкова Л.Л., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008, Россия, Республика Татарстан

АННОТАЦИЯ. Одним из многообещающих подходов к лечению инфекций, вызванных бактериями со множественной лекарственной устойчивостью, является терапия бактериофагами. Хотя способность бактериофагов лизировать бактериальные клетки, как правило, не зависит от устойчивости последних к антибиотикам, сами бактериофаги штаммоспецифичны, т.е. различные изоляты одной и той же бактерии могут быть нечувствительны к определенному бактериофагу, что требует создания коллекции бактериофагов. В данном исследовании мы сообщаем о выделении из сточных вод города Казани (Республика Татарстан) бактериофагов, вирулентных в отношении ряда условно-патогенных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* и *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica* серовары Enteritidis и Typhimurium). Бактериофаги формировали прозрачные бляшки на бактериальных газонах и лизировали культуру с образованием фаголизата с титром 10^9 БОЕ/мл и более. Кроме того, были выявлены поливалентные свойства отдельных штаммов: бактериофаги KES1, KES2 проявили литические свойства в отношении *C. sakazakii* и *S. enterica* серовара Enteritidis, бактериофаг KST1 лизировал *S. enterica* серовары Enteritidis и Typhimurium, бактериофаг KEF1 оказался вирулентным в отношении бактерий *E. faecalis* и *S. enterica* серовар Enteritidis.

Ключевые слова: бактериофаги, сточные воды, инфекционные заболевания

Для цитирования: Федорова М.С., Муталлапова Г.И., Азнабаева З.А., Ильина В.Н., Закарова Н.Д., Ядыкова Л.Л., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р. Выделение бактериофагов из сточных вод г. Казани // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 881-887. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-881

1. Введение

За последние десятилетия неграмотное применение антибиотиков значительно усилило распространение бактериальной резистентности к различным противомикробным препаратам. Бактерии со множественной лекарственной устойчивостью способствуют развитию внутрибольничных инфекций с высокой смертностью, что является серьезной угрозой для здоровья всего человечества (Scholtz et al., 2021; Ma et al., 2020). На сегодняшний день в список Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) включены 12 видов бактерий со множественной лекарственной устойчивостью, представляющие ключевую роль в возникновении трудно поддающихся лечению инфекций (Rice, 2008; Hoenes et al., 2021; Kalpana et al., 2023). Среди таких бактерий представители *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterococcus faecalis* и *Salmonella*

enterica (серовары), способные вызывать инфекции мочеполовой системы и желудочно-кишечного тракта (Chang et al., 2021; Bonten et al., 2021; Zhou et al., 2021; Cattoir, 2022; M कांगара, 2023). Использование бактериофагов может стать многообещающей альтернативой антимикробной терапии данных инфекций. Основным преимуществом бактериофагов является их нечувствительность к бактериальной антибиотикорезистентности (Alharbi and Ziadi, 2021; Pirnay, 2020). Следовательно, бактериофаги можно использовать отдельно в качестве самостоятельного препарата или в комбинации с традиционными противомикробными препаратами (Lewis, 2020; Hatfull et al., 2022). С другой стороны, бактериофаги, как правило, являются штаммоспецифичными, т.е. различные изоляты одной и той же бактерии могут быть нечувствительны к определенному бактериофагу. Следовательно, для лечения инфекций следует использовать смесь бактерио-

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: MaSFedorova97@mail.ru (М.С. Федорова)

Поступила: 31 мая 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



фагов, нацеленных на различные бактериальные изоляты. Для создания бактериофаговых коктейлей необходимо создавать библиотеку бактериофагов (Abeldon et al., 2021). Известно, что сточные воды и природные водоемы являются хранилищами для обитания большинства бактериофагов. В данном исследовании из сточных вод города Казани (Республика Татарстан) были выделены бактериофаги, вирулентные против бактерий *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii*, *E. faecalis* и *S. enterica* (сероваров).

2. Материалы и методы

2.1. Бактериальные штаммы и условия роста

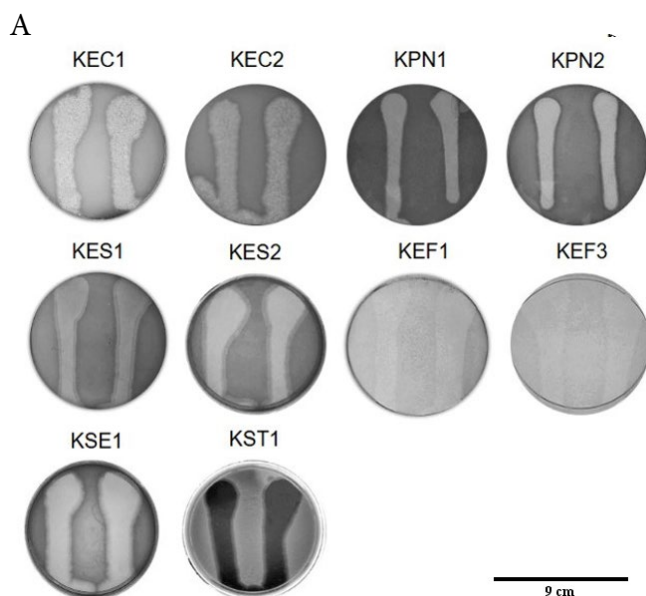
2.2.

Enterococcus faecalis strains ATCC 19433 NCTC 775, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 13883 NCTC 9633, *Enterobacter* (*Cronobacter*) *sakazakii* CCM 3461, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* WHO, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 14028. Бактерии выращивали при температуре 37°C в среде Лурия-Бертани (LB) (Sambrook et al., 1989). Агаризованная среда LB (A) дополнительно содержала 2% агара. Полуужидкая агаризованная среда содержала (г/л): агар - 6; NaCl - 6.

2.3. Подготовка образцов

Пробы, взятые из места сброса сточных вод, (100 мл) фильтровали через бумажный фильтр для удаления загрязнения (крупных частиц), затем полученный фильтрат дважды фильтровали через нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.45 мкм с окончательной фильтрацией через шприцевой фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

2.4. Приготовление концентрированных



стерильных фаголизатов

Полученный стерильный фильтрат воды смешивали в соотношении 1:1 с 3×LB-бульона, полученную суспензию смешивали в соотношении 1:1 с бактериальной культурой –хозяином и инкубировали с качанием в течение 24 часов при 30°C. Затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 40 минут при 4000 об/мин и температуре 4°C, и добавляли хлороформ (3% от объема). После инкубации в течение 24 часов при температуре 4°C смесь центрифугировали при 4000 об/мин и фильтровали через нитроцеллюлозный шприцевой фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

2.5. Обнаружение бактериофагов

Наличие бактериофагов оценивали по формированию на бактериальном газоне зон лизиса с помощью метода Отто (Otto et al., 1922) и точечного метода. Морфологию и разделения бактериофаговых бляшек проводили с использованием последовательных разведений фаголизатов методом Грация (Gratia, 1936).

3. Результаты и обсуждения

Выделение бактериофагов, лизирующих бактерии *E. coli*, *C. sakazakii*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* и *S. enterica* (серовары)

Бактериофаги, лизирующие *E. coli*, *C. sakazakii*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* и *S. enterica* (серовары), были выделены из сточных вод города Казани (Республика Татарстан) (Рис. 1А). На поверхности бактериальных газонов образовывались зоны лизиса в отношении бактерий-хозяев, указывающие на присутствие литических бактериофагов в соответствующей суспензии. Далее была проанализирована морфология бактериофаговых бляшек.

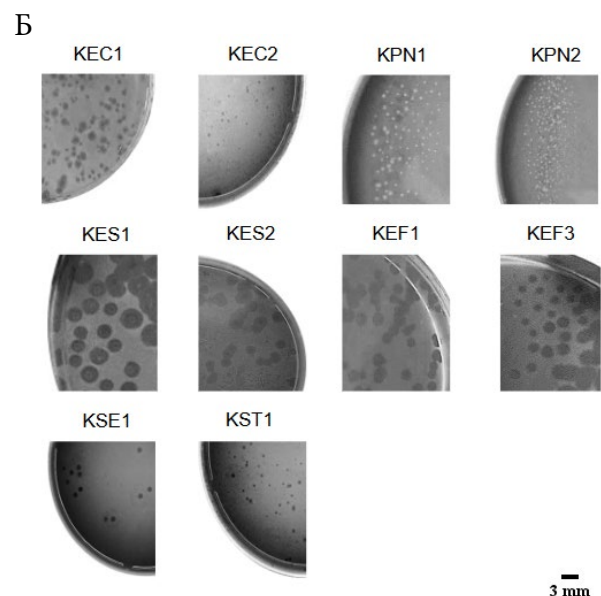


Рис.1. Бактериофаги и бактерии-хозяева: зоны лизиса бактериофагов на бактериальных газонах *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii*, *E. faecalis* и *S. enterica* (серовары) с помощью метода Отто (А); негативные колонии бактериофагов, метод Грация (Б). Бактериофаги и штаммы-хозяева: KEC1, KEC2 - *E. coli*; KPN1, KPN2 - *K. pneumoniae*, KES1, KES2 - *C. sakazakii*, KEF1, KEF3 - *E. faecalis*, KSE1, KST1 - *S. enterica* (серовары).

Для этого были приготовлены последовательные разведения фаголизатов согласно методу Грациа. На чашках с бактериальными газонами было обнаружено несколько типов бляшек, что указывало на наличие нескольких штаммов бактериофагов в пробе. Каждый тип бляшек был изолирован и очищен до получения последующей видимой однородности бляшек на бактериальном газоне (Рис. 1Б).

Интересно, что при оценке штаммоспецифичности бактериофагов у некоторых фаговых изолятов были обнаружены поливалентные свойства. Так, изоляты KES1, KES2 оказались вирулентными в отношении бактерий *C. sakazakii* и *S. enterica* серовара Enteritidis. Бактериофаг KST1 лизировал бактерии *S. enterica* серовары Enteritidis и Typhimurium. Бактериофаг KEF1 был эффективен как против *S. enterica*, серовара Enteritidis, так и против *E. faecalis* (Рис. 2). Известно, что поливалентные бактериофаги более эффективны против бактериальных инфекций (Abeldon et al., 2021). Таким образом, ES1, ES2 KST1 и KEF1 могут представлять интерес для дальнейших исследований.

4. Выводы

В данной работе было выделено десять бактериофагов, лизирующих условно-патогенные бактерии *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. sakazakii* и *E. faecalis*, *S. enterica* (серовары): два бактериофага оказались эффективными против *K. pneumoniae*, два против *E. coli*, два против *C. sakazakii*, один против *S. enterica* серовара Enteritidis и один против *S. enterica* серовара Typhimurium. Кроме того, были выявлены поливалентные свойства бактериофагов: ES1, ES2 оказались эффективными против бактерий *C. sakazakii* и *S. enterica* серовара Enteritidis, KST1 лизировал *S. enterica* серовары Enteritidis и Typhimurium, KEF1 оказался вирулентным против *E. faecalis* и *S. enterica* серовара Enteritidis.

Благодарности

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017. (Е.Ю.Тризна).

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов.

Список литературы

Abeldon S.T., Danis-Wlodarczyk K.M., Wozniak D.J. 2021. Phage cocktail development for bacteriophage therapy: toward improving spectrum of activity breadth and depth. *Pharmaceuticals* 14: 1019. DOI: [10.3390/ph14101019](https://doi.org/10.3390/ph14101019)

Alharbi N.M., Ziadi M.M. 2021. Wastewater as a fertility source for novel bacteriophages against multi-drug resistant bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28: 4358-4364.

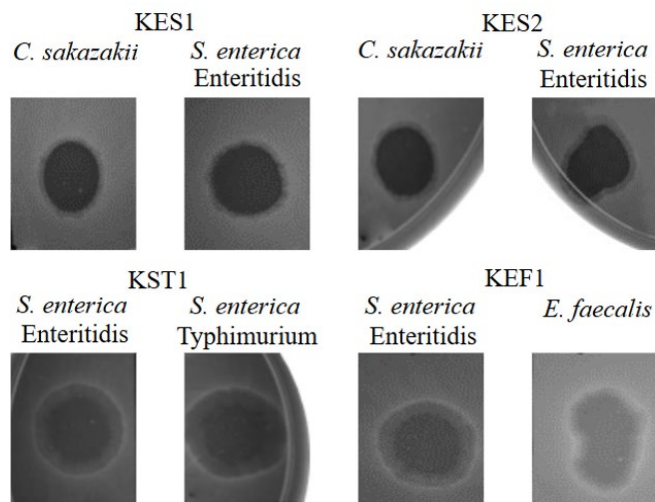


Рис.2. поливалентные свойства бактериофагов KES1, KES2, KST1, KEF1. Зоны лизиса бактериофагов на бактериальных газонах *C. sakazakii*, *E. faecalis* и *S. enterica* (серовары), точечный (спот) тест

DOI: [10.1016/j.sjbs.2021.04.025](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.025)

Bonten M., Johnson J., Biggelaar A. et al. 2021. Epidemiology of Escherichia coli bacteremia: a systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases* 72: 1211-1219. DOI: [10.1093/cid/ciaa210](https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210)

Cattoir V. 2022. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. *Current Opinion in Microbiology* 65: 73-80. DOI: [j.mib.2021.10.013](https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.10.013)

Chang D., Sharma L., Cruz C. et al. 2021. Clinical epidemiology, risk factors, and control strategies of Klebsiella pneumoniae infection. *Frontiers in microbiology* 12: 750662. DOI: [10.3389/fmicb.2021.750662](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750662)

Gratia A. 1936. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bacteriophages. *Annales de l'Institut Pasteur*. Masson Publishing, France.

Hatfull G.F., Dedrick R.M., Schooley R.T. 2022. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. *Annual review of medicine* 73: 197-211. DOI: [10.1146/annurev-med-080219-122208](https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219-122208)

Hoenes K., Bauer R., Meurle T. et al. 2021. Inactivation effect of violet and blue light on ESKAPE pathogens and closely related non-pathogenic bacterial species—a promising tool against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant microorganisms. *Frontiers in microbiology* 11: 612367. DOI: [10.3389/fmicb.2020.612367](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612367)

Kalpana S., Lin W., Wang Y. et al. 2023. Antibiotic Resistance Diagnosis in ESKAPE Pathogens—A Review on Proteomic Perspective. *Diagnostics* 13: 1014. DOI: [10.3390/diagnostics13061014](https://doi.org/10.3390/diagnostics13061014)

Lewis K. 2020. The science of antibiotic discovery. *Cell* 181: 29-45. DOI: [10.1016/j.cell.2020.02.056](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056)

Ma Y.X., Wang C., Li Y. et al. 2020. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Advanced Science* 7: 1901872. DOI: [10.1002/adv.201901872](https://doi.org/10.1002/adv.201901872)

Mkangara M. 2023. Prevention and control of human Salmonella enterica infections: An implication in food safety. *International Journal of Food Science* 2023. DOI: [10.1155/2023/8899596](https://doi.org/10.1155/2023/8899596)

Otto R., Munter H., Winkler W.F. 1922. Contributions to the d'Hérelle phenomenon. *Journal of Hygiene and Infectious Diseases*. 96: 118-160.

Pirnay J.P. 2020. Phage therapy in the year 2035.

Frontiers in Microbiology 11: 538375. DOI: [10.3389/fmicb.2020.01171](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01171)

Rice L.B. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases* 197: 1079-1081. DOI: [10.1086/533452](https://doi.org/10.1086/533452)

Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.

Scholtz V., Vankova E., Kasparova P. et al. 2021. Non-thermal plasma treatment of ESKAPE pathogens: a review. *Frontiers in Microbiology* 12: 737635. DOI: [10.3389/fmicb.2021.737635](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737635)

Zhou A., Wang L., Zhang J. et al. 2021. Survival of viable but nonculturable *Cronobacter sakazakii* in macrophages contributes to infections. *Microbial Pathogenesis* 158: 105064. DOI: [10.1016/j.micpath.2021.105064](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105064)