

УДК 578.4; 579.678; 579.62

UDC 578.4; 579.678; 579.62

06.02.10 Частная зоотехния, технология производства продуктов животноводства

Private animal husbandry, technology of production of livestock products

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ I-ФОРМ PF-ПОДОБНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ В ЛИЗАТАХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1 ЭКСТРАКТАМИ ФЕКАЛИЙ ЗУБРОВ

MORPHOLOGICAL FEATURES OF I-FORMS OF PF-RELATED BACTERIOPHAGES IN PSEUDOMONAS AERUGINOSA PAO1 LYZATES BY EXTRACTS OF EUROPEAN BIZON'S FEKALIA

Зимин Андрей Антонович
канд. биол. наук
AuthorID: 81249
zimin@ibpm.pushchino.ru

Zimin Andrei Antonovich
Cand.Biol.Sci.
AuthorID: 81249
zimin@ibpm.pushchino.ru

Никулин Никита Алексеевич
nikitakulin@gmail.com
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН - обособленное подразделение ФГБНУ «Пуцинский научный центр биологических исследований» РАН, г. Пушино, Россия

Nikulin Nikita Alekseevich
nikitakulin@gmail.com
Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Skryabin of the Russian Academy of Sciences, Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia

Кошчаев Андрей Георгиевич
д-р. биол. наук, профессор
Scopus ID:57189599222
kagbio@mail.ru
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет им И.Т. Трубилина», г. Краснодар, Россия

Koshchaev Andrey Georgievich
Dr.Sci.Biol., Professor
Scopus ID:57189599222
kagbio@mail.ru
Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar, Russia

Сузина Наталья Егоровна
канд. биол. наук
AuthorID: 7003665776
suzina@ibpm.pushchino.ru
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН - обособленное подразделение ФГБНУ «Пуцинский научный центр биологических исследований» РАН, г. Пушино, Россия

Suzina Nataliya Egorovna
Cand.Biol.Sci.
AuthorID: 7003665776
suzina@ibpm.pushchino.ru
Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G. K. Skryabin of the Russian Academy of Sciences, Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia

В работе мы обнаружили укороченные формы частиц нитчатого бактериофага Pf при индукции лизиса штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 с помощью экстрактов из фекалий зубра для изучения кишечных бактериофагов различных таксономических групп. Были определены размеры укороченных частиц от 250 до 950 нм и их толщина 17 нм. Частицы имели слегка заостренный один конец и иногда флаг на другом расширенном конце. Частицы образовались в лизате данного штамма другими бактериофагами, имеющими отростки. Данные лизаты содержали также высокую концентрацию великул из мембраны псевдомонады. В статье обсуждаются механизмы индукции профага у штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 за счет фаг-фаговой индукции и веществ исследованного экстракта

In this work, we have found shortened particle forms of the filamentous bacteriophage Pf, when the lysis of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain was induced by extracts of bison feces to study the intestinal bacteriophages of this animal. The sizes of the shortened particles from 250 to 950 nm and their thickness 17 nm were determined. The particles had a slightly pointed one end and sometimes a flag on the other extended end. The particles were formed in the process lysis of this strain by other bacteriophages. These lysates also contained a high concentration of vesicles from the pseudomonad membrane. The article discusses the mechanisms of prophage induction in the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain due to phage-phage induction and substances of the investigated extract

Ключевые слова: БАКТЕРИОФАГ PF, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*,

Keywords: BACTERIOPHAGE PF, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *E. COLI*,

E. COLI, ФАГИ ЗУБРОВ, УКРОЧЕННЫЕ
ЧАСТИЦЫ ФАГОВ, НИТЧАТЫЕ ФАГИ,
ФАГОТЕРАПИЯ

PHAGES OF EUROPEAN BISON, SHORTONED
PARTICLES OF PHAGES, FILAMENTOUS
BACTERIOPHAGE, PHAGETHERAPY

Doi: 10.21515/1990-4665-149-036

Введение. *Pseudomonas aeruginosa* – это оппортунистический патоген. Он вызывает ряд хронических инфекций как у человека, так и у сельскохозяйственных животных. На слизистых поверхностях в случае такого рода хронических инфекциях могут формироваться бактериальные биопленки. Например, подобная ситуация развивается при псевдомонадном кистозном фиброзе в дыхательных путях у человека и животных. *P. aeruginosa* образует биопленки за счет образования агрегатов бактериальных клеток. Структурно - эти агрегаты представляют собой кластеры бактериальных клеток, заключенных в полимерную матрицу, которая защищает бактерии от воздействия окружающей среды и лечения антибиотиками. Бактериофаги различным образом участвуют в развитии инфекции и образовании биопленок [1-6]. Это и индукция специфического профага и влияние нитчатых фагов псевдомонад на иммунный ответ макроорганизма [1-2], и участие фагов в образовании бактериальных биопленок [5,6]. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 является лизогеном по бактериофагу Pf и, когда клетки этого и подобных штаммов образуют биопленку, появляются большие количества нитевидного бактериофага Pf. В отличие от большинства фагов, которые лизируют клетки бактерий и убивают их бактерий – хозяев, филаментные фаги рода Inovirus, который включает в себя и бактериофаг Pf, не убивают клетку [6]. Вместо этого бактериофаг непрерывно секретируется из бактериальной клетки. При этом данный нитевидный фаг Pf накапливается в матрице биопленки, где он взаимодействует с матричными полимерами. Его накопление приводит к структурной трансформации биопленки в высокоупорядоченный жидкий кристалл. Эта структурная конфигурация способствует бактериальной

адгезии, преодолению высушивания и устойчивости к антибиотикам. То есть бактериофаг Pf вносит вклад в структуру биопленки *P. aeruginosa* и это представляет собой новую форму симбиоза между бактериями и бактериофагами [5,6].

В данной работе мы обнаружили укороченные формы частиц данных бактериофагов, когда пытались получить лизат штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 с помощью экстрактов из фекалий зубра для изучения кишечных бактериофагов различных таксономических групп этого животного. В задачи данной работы входили: морфологические исследования данных укороченных I-форм нитевидного бактериофага Pf и анализ их окружения в условиях данного эксперимента, приведшего к их образованию. Бактериофаги группы f1 широко применяются для фагового дисплея. На основе дисплея на новых нитчатых бактериофагах молекулярных "флагов" в настоящее время предложен метод получения тест-систем для экспресс-определения штаммов хозяев таких бактериофагов в пробах из природы. С этой точки зрения также актуально исследовать новые подходы к индукции данного профага для разработки методов получения нитчатых фагов для дисплея белков и пептидов на поверхности их частиц.

Материалы и методы.

Среды и материалы. Бульон LB содержал: NaCl – 10 г/л (ОСЧ 10-3, Реахим); триптон – 10 г/л (Bacto Tryptone, Difco США), и дрожжевой экстракт - 5 г/л (Yeast extract, Difco США). Для получение твердого агара добавляли агар -15 г/л (Bacto agar, Difco США). Верхний агар для титрования фагов имел тот же состав, но содержал агар - 6.5 г/л (Bacto agar, Difco США).

Штамм бактерии. Использовали штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, который описан и генетически изучен [9 - 11]. Штамм PAO1, производный от исходного австралийского изолята PAO, распространен по всему миру в лабораториях и коллекциях штаммов. Штамм из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ; ИБФМ РАН) сходен с *Pseudomonas aeruginosa*

(strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1).

Методика получения фагового лизата *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 на твердой агаризованной среде. Материалом для исследования послужили пробы фекалий зубров (*Bison bonasus*). Отбор проводился из различных мест обитания в Приокско-террасном государственном заповеднике 20 июля 2016 года с 12-00 до 14-00. В тот же день производили получение фаговых экстрактов. Получение фаговых экстрактов: 2 г фекалий суспендировали в 8 мл фагового буфера. Далее перемешивали в орбитальном шейкере в течение 20 минут при 100 об/мин 22°C, разливали по 5 мл. Центрифугировали 2 мин., 10000 об/мин, и супернатант использовали сразу же после получения. Высев на штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 проводили также после 3 месяцев хранения при -70°C. Для хранения, добавляли глицерин до 50% (об/об) и хранили при -20°C. Высев фагов на штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 делали методом Грациа. Использовали среду LB. Готовили питательную среду LB с концентрациями агара 1,5% и 0,7%. В чашки Петри разливали расплавленную плотную питательную среду, давали ей остыть. Затем чашки сушили. Получали пробирки с полужидкой питательной средой (объем среды 4,5 мл), затем расплавляли агар на водяной бане, после помещали пробирки в водяной термостат (температура 44°C). 0,1 мл ночной культуры чувствительного штамма и 1 мл очищенной пробы инокулировали в пробирки с полужидкой питательной средой. Пробирку перемешивали в руках под углом 45 градусов, а затем помещали содержимое на поверхность плотной питательной среды и давали застыть. Затем на поверхность добавляли еще 2 мл пробы. Инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующий день должно появиться литическое пятно, покрывающее большую часть поверхности. Добавляли 7 мл жидкой питательной среды LB и инкубировали чашки при 4°C в течение 2 суток. После инкубации жидкость с поверхности переносили в одноразовые пробирки и фильтровали лизат

через мембранные фильтры. Очистку фаголизатов от бактерий проводили путем фильтрации через фильтры фирмы Millipore с отверстиями 0.22 мкм. Концентрирование фаговых лизатов проводили в микроцентрифуге с использованием центрифужных насадок Vivaspin 500 (VS0151) с мембранами 300.000 MWCO PES. Препараты фагов для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) контрастировали 1% водным раствором уранилацетата.

Результаты исследований. Были отобраны пробы фекалий зубров, выращиваемых в Центральном питомнике Приокско-террасного биосферного государственного заповедника Минприроды РФ 20 июля 2016 года с 12-00 до 14-00, и в тот же день были получены экстракты этих проб согласно методу, описанному в разделе «Материалы и методы». 2 мл очищенного экстракта наносили на поверхность свежеприготовленного газона штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Суспензия не впитывалась полностью в верхний слой агаризованной среды. В результате на поверхности бактериального газона формировалось большое литическое пятно. Суспензию инкубировали в течение 16 часов и на следующий день собирали пипеткой лизат для дальнейшего исследования. Лизат осветляли центрифугированием, от клеток бактерий избавлялись ультрафильтрацией. Лизат исследовали с помощью ТЭМ. На ТЭМ изображениях лизатов *Pseudomonas aeruginosa*, полученных с помощью экстрактов фекалий зубров, были обнаружены вирусоподобные частицы по морфологии сходные с бактериофагами семейства Inoviridae морфотипа F1 (Рис. 1 – 3.). При этом длина частиц варьировала от 0,3 до 2 мкм. Длина частиц достигала ~ 2000 нм и толщина около 17 нм (Рис.3). Было видно различное устройство концов частиц. У нитчатых бактериофагов кишечной палочки группы f1, таких как f1, fd и m13, концы частиц также различаются по строению. Один конец состоит из 3 – 5 копий белка 3 и 3 – 5 копий белка 6, другой конец составлен несколькими копиями белков 7 и 9 [11]. У нитчатого бактериофага Pf1 *P. aeruginosa* морфотипа F1 концы частиц также различаются по строению [12].

У обнаруженных нами частиц условно "передний" конец представляет собой заостренную головку, а условно "задний" конец немного расширен и схож с базальной пластинкой фагов диаметром 20-23 нм. Бактериофаг Pf играет существенную роль в патогенезе синегнойной палочки. Для образования структурированных биопленок этого патогена существенно и наличие в урожае фага укороченных частиц – I-форм. Большинство обнаруженных нами I-форм было длиной около 400 нм (Рис. 1.).

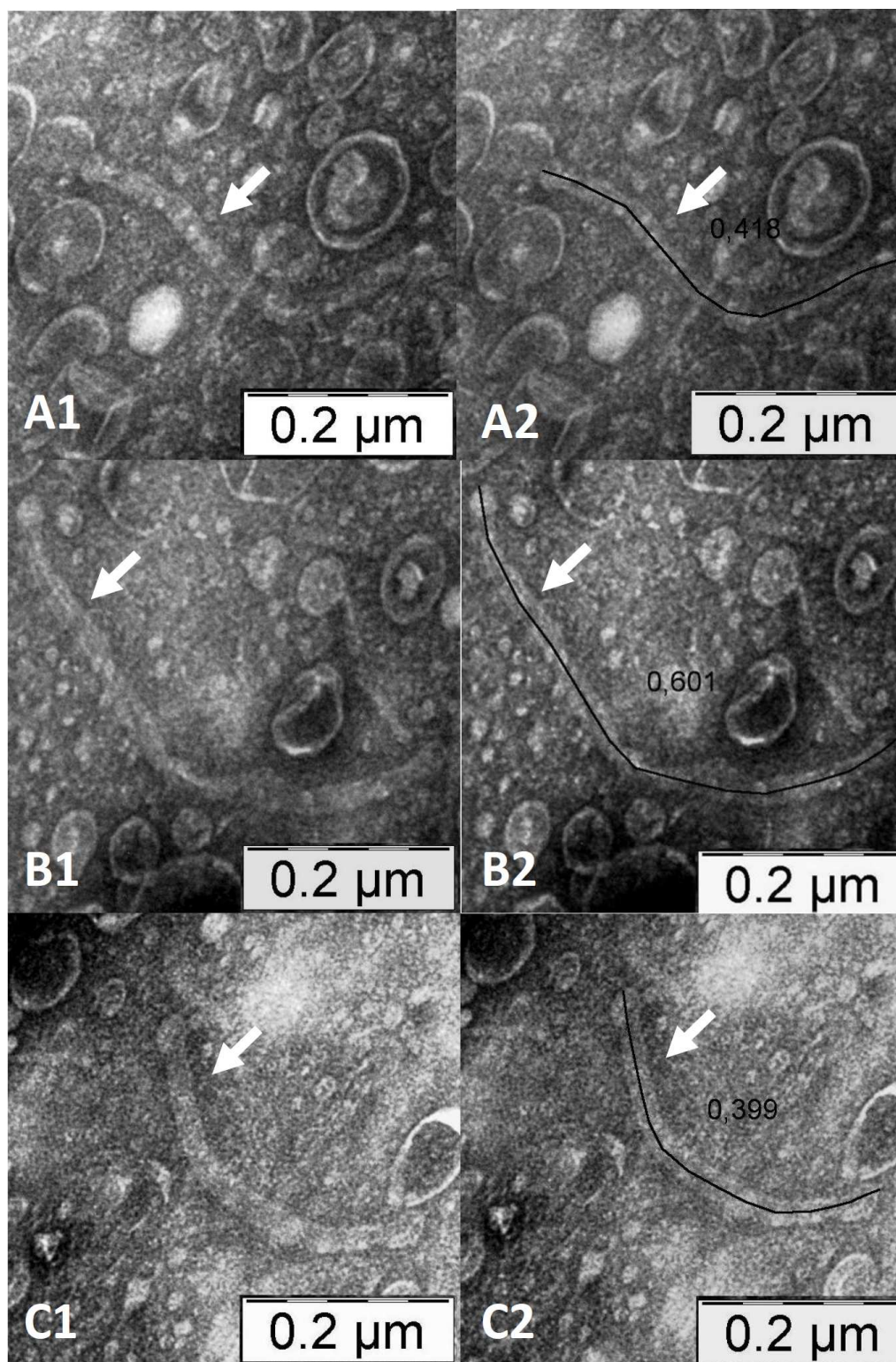


Рис. 1 – Определение длины вирусоподобных частиц I-форм с помощью программы IMAGE-J по изображениям негативно-окрашенных препаратов, полученных с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Длина масштабной линейки (2 мкм) приведена в правом нижнем углу каждого снимка. Нитчатые вирусоподобные частицы показаны стрелками. A1, B1, C1 – фото без измерения длины, A2, B2, C2 – те же фото с размером частиц в микрометрах.

Обсуждение. Морфологические параметры, обнаруженных нами I-форм, имеют сходство с морфологическими характеристиками ряда более изученных нитевидных вирусов. Например, для нитевидного колифага $\phi 1$ обнаружены укороченные нитевидные частицы с одним факелоподобным концом [14]. Такие I-формы образуются под воздействием границы раздела фаз хлороформ-вода при 22 или понижении температуры до 4 °С. В этих же условиях бактериофаг $\phi 1$ может образовывать и сфероидные частицы. Было показано, что I-формы и сфероиды содержат один и тот же набор мелких белков оболочки, как и необработанный флаг. Эти укороченные частицы могут быть выделены путем центрифугирования в градиенте плотности CsCl вместе с целыми бактериофагами. Белок А (или белок-лоцман, или продукт гена 3) был обнаружен на факельном конце частицы I-формы [14].

Подобные структуры на также были обнаружены нами (рис. 1. В1). Длина таких I-форм у бактериофага $\phi 1$ составляет 250 нм, ширина 15 нм. Что также имеет сходство с наблюдаемыми нами укороченными частицами бактериофага Pf. Концы некоторых частиц были закрытые и слегка заостренные, другие концы открытые. Такие формы также были выявлены в исследованных лизатах (Рис. 1 и 2).

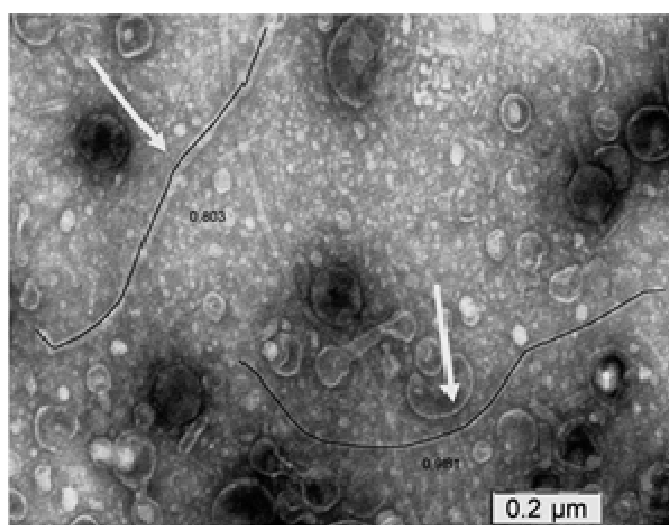


Рис. 2 – Укороченные частицы нитчатого Pf1 – подобного бактериофага наибольшей длины в половину размера целого фага (0,803 и 0,961 мкм).

ТЭМ, увеличение X 50000. Масштабная линейка 100 нм. Контрастирование 1% уранилацетатом. Стрелки указывают на расположение укороченных частиц на снимках.

Эти I-формы у бактериофага Pf могли превращаться в сфероиды в зависимости от температуры и наличия раздела фаз. Эти изменения, вызванные воздействием растворителя, возможно, связаны с начальными стадиями проникновения фагов *in vivo* [13]. Наблюдение сфероидов на наших ТЭМ снимках было весьма затруднено, так как штамм PAO1 продуцирует больше количество везикул сходного со сфероидами нитчатых колифагов размера (рис. 1-3). Стандартный метод выделения с помощью ультрафильтрации не позволяет отделить везикулы от частиц фагов.

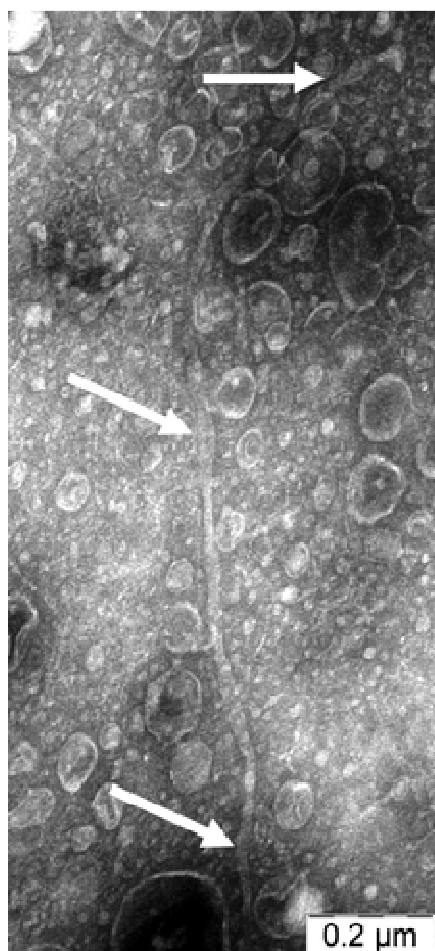


Рис. 3 –Частица бактериофага Pf полной длины 1950 нм. Стрелками показано её местонахождение. Фото получено ТЭМ при увеличении 50 000.

Маркер размера (2 мкм) приведен в правом нижнем углу снимка.

В дальнейшем мы планируем получить на твердой или жидкой среде значительно большие объемы подобного лизата для получения большего количества укороченных частиц с целью последующей очистки в градиенте плотности хлористого цезия. Предложенный методический подход обеспечит, при достаточном количестве этих частиц, отделение их от присутствующих в тотальном препарате лизата клеточных везикул и получение препаратов обогащенных сфероидами.

С помощью исследования мутантов бактериофагов fd и M13 было показано, что индуцированное хлороформом сжатие частиц нитчатого фага включает специфический механизм, а не генерализованную денатурацию, вызванную растворителем, и что критические структурные изменения происходят на локализованном уровне в фаге. Эти результаты являются дополнительным подтверждением предположения, что последовательное сокращение нитей в I-формы, а затем и в S-формы имитирует соответствующие этапы проникновения фага в клетку хозяина и в обратном порядке – этапы сборки зрелых фагов [15]. В нашем случае выход нитчатых бактериофагов из клеток *Pseudomonas aeruginosa PAO1* мог быть индуцирован как различными веществами в составе фекалий зубров, так и другими бактериофагами, которые также обнаруживались в исследуемых лизатах. Лизаты содержали множество везикул, образованных из фрагментов мембран лизированных клеток *Pseudomonas aeruginosa PAO1*. Можно предположить, что поверхность этих везикул является разделом фаз, который служит индуктором для возникновения I-форм. Интересным предположением является индукция лизогена псевдомонады за счет других фагов. Ранее была описана фаг-фаговая индукция [16,17]. Это явление состоит в том, что какой-либо фаг извне может индуцировать лизис штамма-лизогена и появление в среде соответствующего лизогенизирующего фага. В нашем случае хвостатые бактериофаги из экстрактов фекалий зубров могли не только лизировать клетки псевдомонад, но вызывать индукцию профага

нитчатого бактериофага Pf в лизогенном штамме *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Многие аспекты жизненного цикла нитчатых бактериофагов хорошо охарактеризованы, но механизм, с помощью которого его белки включаются в клеточную мембрану, и способ по которому ДНК экструдируется в клетку во время проникновения, остаются до сих пор недостаточно изученными. Этот процесс является особенно таинственным, потому что нативный капсид не рассеивается ни в липидных бислоях, ни в детергентах. Изучение морфологии I-форм и сфероидов нитчатых бактериофагов и условий их возникновения при различных состояниях среды и биологического окружения могут пролить свет на процесс трансформации частиц этих вирусов, и как следствие на процесс проникновения фагового генетического материала в клетку бактерии. На основании исследований I-форм как наших, так и других исследователей, мы можем предположить, что *in vivo* нитчатые бактериофаги активируются при контакте с определенными клеточными или поверхностными компонентами. Эта активация инициирует морфологическую трансформацию частиц, в результате которой они выявляются уже в виде I-форм и сфероидов. Эти формы, вероятно, являются промежуточными, необходимыми для введения белков частицы в наружную мембрану бактерии и ДНК фага в цитоплазму.

Выводы. Нами были обнаружены Pf-подобные филаментные бактериофаги при индукции штамма *P. aeruginosa* PAO1 экстрактом фекалий зубров. Индукция профага могла произойти как за счет веществ фекалии, так и путем фаг-фаговой индукции, так как экстракты содержали ряд хвостатых бактериофагов. Полученные экстракты содержали много укороченных частиц нитчатого бактериофага Pf. Проведен морфометрический анализ электронно-микроскопических изображений негативно-окрашенных препаратов тотальных лизатов, полученных с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Показано что точные

размеры этих укороченных частиц составляли: группы F1 следующие: 399, 406, 410, 418, 426, 601, 667, 803, 981.

Литература

1. Lee Y, Song S, Sheng L, Zhu L, Kim JS, Wood TK. Substrate Binding Protein DppA1 of ABC Transporter DppBCDF Increases Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* by Inhibiting Pf5 Prophage Lysis. *Front Microbiol.* 2018 Jan 24;9:30. doi: 10.3389/fmicb.2018.00030.
2. Rice SA, Tan CH, Mikkelsen PJ, Kung V, Woo J, Tay M, Hauser A, McDougald D, Webb JS, Kjelleberg S. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J.* 2009 Mar; 3(3):271-82. doi: 10.1038/ismej.2008.109.
3. Secor PR, Sass G, Nazik H, Stevens DA. Effect of acute predation with bacteriophage on intermicrobial aggression by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* 2017 Jun 16;12(6):e0179659. doi: 10.1371/journal.pone.0179659
4. Secor PR, Michaels LA, Smigiel KS, Rohani MG, Jennings LK, Hisert KB, Arrigoni A, Braun KR, Birkland TP, Lai Y, Hallstrand TS, Bollyky PL, Singh PK, Parks WC. Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the Inflammatory Response and Promotes Noninvasive Infection In Vivo. *Infect Immun.* 2016 Dec 29;85(1). pii: e00648-16. doi: 10.1128/IAI.00648-16.
5. Secor PR, Jennings LK, Michaels LA, Sweere JM, Singh PK, Parks WC, Bollyky PL. Biofilm assembly becomes crystal clear - filamentous bacteriophage organize the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix into a liquid crystal. *Microb Cell.* 2015 Dec 31;3(1):49-52. doi: 10.15698/mic2016.01.475
6. Secor PR, Sweere JM, Michaels LA, Malkovskiy AV, Lazzareschi D, Katznelson E, Rajadas J, Birnbaum ME, Arrigoni A, Braun KR, Evanko SP, Stevens DA, Kaminsky W, Singh PK, Parks WC, Bollyky PL. Filamentous Bacteriophage Promote Biofilm Assembly and Function. *Cell Host Microbe.* 2015 Nov 11;18(5):549-59. doi:10.1016/j.chom.2015.10.013.
7. Collins TJ (July 2007). "ImageJ for microscopy". *BioTechniques.* 43 (1 Suppl): 25—30. DOI:10.2144/000112517. PMID 17936939.
8. Girish V, Vijayalakshmi A (2004). "Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ". *Indian J Cancer.* 41 (1): 47. PMID 15105580.
9. Holloway, B. W. 1975. Genetic organization of *Pseudomonas*, p. 133-161. In P. H. Clarke and M. H. Richmond (ed.), *Genetics and biochemistry of Pseudomonas*. John Wiley & Sons Ltd, London, United Kingdom.
10. Holloway, B. W., U. Römling, and B. Tümmler. 1994. Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology* 140:2907-2929.
11. Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol.* 2011;13(2):51-76.
12. Straus SK, Scott WR, Schwieters CD, Marvin DA. Consensus structure of Pf1 filamentous bacteriophage from X-ray fibre diffraction and solid-state NMR. *Eur Biophys J.* 2011 Mar;40(3):221-34. doi: 10.1007/s00249-010-0640-9.

13. Manning M, Chrysogelos S, Griffith J. Mechanism of coliphage M13 contraction: intermediate structures trapped at low temperatures. *J Virol.* 1981 Dec;40(3):912-9. PubMed PMID: 7321105; PubMed Central PMCID: PMC256702.

14. Lopez J, Webster RE. Minor coat protein composition and location of the A protein in bacteriophage f1 spheroids and I-forms. *J Virol.* 1982 Jun;42(3):1099-107.

15. Oh JS, Davies DR, Lawson JD, Arnold GE, Dunker AK. Isolation of chloroform-resistant mutants of filamentous phage: localization in models of phage structure. *J Mol Biol.* 1999 Apr 2;287(3):449-57. Erratum in: *J Mol Biol.* 2003 Nov 14;334(1):173-4. PubMed PMID: 10092451.

16. Степанов А.А., Бурова Л.М., Товкач Ф.И. Фаг-фаговая индукция и псевдолизогения энтеробактерий // Материалы IV Международной конференции «Биоресурсы и вирусы». – К.: Издательско-полиграфический центр «Київський університет», 2004. – С.22.

17. Бурова Л.М., Товкач Ф.И. Явление фаг-фаговой индукции с участием колифага P1 и псевдолизогенов *Erwinia carotovora* // Материалы международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии». – Минск. – 2004. – С. 163 – 164.

References

1. Lee Y, Song S, Sheng L, Zhu L, Kim JS, Wood TK. Substrate Binding Protein DppA1 of ABC Transporter DppBCDF Increases Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* by Inhibiting Pf5 Prophage Lysis. *Front Microbiol.* 2018 Jan 24;9:30. doi: 10.3389/fmicb.2018.00030.

2. Rice SA, Tan CH, Mikkelsen PJ, Kung V, Woo J, Tay M, Hauser A, McDougald D, Webb JS, Kjelleberg S. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J.* 2009 Mar;3(3):271-82. doi: 10.1038/ismej.2008.109.

3. Secor PR, Sass G, Nazik H, Stevens DA. Effect of acute predation with bacteriophage on intermicrobial aggression by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* 2017 Jun 16;12(6):e0179659. doi: 10.1371/journal.pone.0179659

4. Secor PR, Michaels LA, Smigiel KS, Rohani MG, Jennings LK, Hisert KB, Arrigoni A, Braun KR, Birkland TP, Lai Y, Hallstrand TS, Bollyky PL, Singh PK, Parks WC. Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the Inflammatory Response and Promotes Noninvasive Infection In Vivo. *Infect Immun.* 2016 Dec 29;85(1). pii: e00648-16. doi: 10.1128/IAI.00648-16.

5. Secor PR, Jennings LK, Michaels LA, Sweere JM, Singh PK, Parks WC, Bollyky PL. Biofilm assembly becomes crystal clear - filamentous bacteriophage organize the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix into a liquid crystal. *Microb Cell.* 2015 Dec 31;3(1):49-52. doi: 10.15698/mic2016.01.475

6. Secor PR, Sweere JM, Michaels LA, Malkovskiy AV, Lazzareschi D, Katznelson E, Rajadas J, Birnbaum ME, Arrigoni A, Braun KR, Evanko SP, Stevens DA, Kaminsky W, Singh PK, Parks WC, Bollyky PL. Filamentous Bacteriophage Promote Biofilm Assembly and Function. *Cell Host Microbe.* 2015 Nov 11;18(5):549-59. doi:10.1016/j.chom.2015.10.013.

7. Collins TJ (July 2007). "ImageJ for microscopy". *BioTechniques*. 43 (1 Suppl): 25—30. DOI:10.2144/000112517. PMID 17936939.
8. Girish V, Vijayalakshmi A (2004). "Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ". *Indian J Cancer*. 41 (1): 47. PMID 15105580.
9. Holloway, B. W. 1975. Genetic organization of *Pseudomonas*, p. 133-161. In P. H. Clarke and M. H. Richmond (ed.), *Genetics and biochemistry of Pseudomonas*. John Wiley & Sons Ltd, London, United Kingdom.
10. Holloway, B. W., U. Römling, and B. Tümmler. 1994. Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology* 140:2907-2929.
11. Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol*. 2011;13(2):51-76.
12. Straus SK, Scott WR, Schwieters CD, Marvin DA. Consensus structure of Pf1 filamentous bacteriophage from X-ray fibre diffraction and solid-state NMR. *Eur Biophys J*. 2011 Mar;40(3):221-34. doi: 10.1007/s00249-010-0640-9.
13. Manning M, Chrysogelos S, Griffith J. Mechanism of coliphage M13 contraction: intermediate structures trapped at low temperatures. *J Virol*. 1981 Dec;40(3):912-9. PubMed PMID: 7321105; PubMed Central PMCID: PMC256702.
14. Lopez J, Webster RE. Minor coat protein composition and location of the A protein in bacteriophage f1 spheroids and I-forms. *J Virol*. 1982 Jun;42(3):1099-107.
15. Oh JS, Davies DR, Lawson JD, Arnold GE, Dunker AK. Isolation of chloroform-resistant mutants of filamentous phage: localization in models of phage structure. *J Mol Biol*. 1999 Apr 2;287(3):449-57. Erratum in: *J Mol Biol*. 2003 Nov 14;334(1):173-4. PubMed PMID: 10092451.
16. Stepanov A.A., Burova L.M., Tovkach F.I. Phage-phage induction and pseudolysogenic enterobacteria // Materials of the IV International Conference "Bioresources and Viruses". - K.: Publishing and Printing Center "Kyiv University", 2004. - P. 22.
17. Burova L.M., Tovkach F.I. The phenomenon of phage-phage induction with the participation of P1 coliphage and *Erwinia carotovora* pseudolizogenes // Proceedings of the international conference "The current state and development prospects of microbiology and biotechnology." - Minsk. - 2004. - p. 163-164.