

УДК 579.61:578.7

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-103-116>

Научная статья | Scientific article



Выделение новых бактериофагов *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и исследование их биологических характеристик *in vitro*

Т.А. Кочетова[✉], В.В. Юскевич, Ф.М. Зурабов, Г.Т. Садикова, П.В. Медведев, В.М. Попова

ООО НПЦ «Микромир», Кисельный Нижний пер., д. 5/23, стр. 1, Москва, 107031, Российская Федерация

✉ Кочетова Татьяна Андреевна; kochetova@micromir.bio

РЕЗЮМЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ. В связи с увеличением числа случаев возникновения инфекций пародонта, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами бактерий *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, способными формировать биопленки в полости рта, и недостаточной эффективностью противомикробных препаратов в борьбе с биопленками, актуальной задачей представляется выделение бактериофагов, активных в отношении данных бактерий.

ЦЕЛЬ. Выделение бактериофагов, активных в отношении *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Actinomyces oris*, изучение их биологических свойств и подбор оптимальных параметров культивирования системы «фаг–клетка» для получения чистых линий бактериофагов с высокими титрами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Бактериофаги выделяли из биообразцов слюны, зубного налета и содержимого пародонтального кармана и определяли их характеристики: оптимальные значения множественности инфекции, время культивирования системы «фаг–клетка», устойчивость к различным температурам и pH, стабильность при хранении. Морфологию фагов изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Морфологию негативных колоний, литическую активность, спектр хозяев и специфичность оценивали, используя спот-тестирование и метод Грация. В работе использовали бактерии из коллекции штаммов НПЦ «Микромир».

РЕЗУЛЬТАТЫ. Выделены и изучены биологические свойства трех новых изолятов бактериофагов, активных в отношении *A. oris* (vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35), и бактериофага, активного в отношении *Ag. actinomycetemcomitans* (vB_AaS_1/Dc-1). Фаги бактерий *A. oris* отнесены к подовирусам, а бактериофаг vB_AaS_1/Dc-1 – к сифовирусам. Фаги образуют полностью прозрачные бляшки округлой формы без ореола, диаметром от 0,8±0,1 до 4,0±0,2 мм. Установлено, что для получения чистых линий фагов с максимальными значениями титра оптимальными являются следующие параметры: значение множественности инфекции – 0,1–10, время культивирования системы «фаг–клетка» – 8–12 ч. Выявлена способность бактериофагов *A. oris* лизировать штаммы *Actinomyces naeslundii*. Из 15 исследуемых штаммов *A. oris*, бактериофаги vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35 лизировали 10, 8 и 12 бактериальных штаммов соответственно, а изолят фага vB_AaS_1/Dc-1 проявлял литическую активность в отношении обоих тестируемых штаммов *Ag. actinomycetemcomitans*. Исследуемые фаги продемонстрировали стабильность при абиотическом стрессе и длительном хранении.

ВЫВОДЫ. Выделены три новых бактериофага, активных в отношении *A. oris*, и один бактериофаг, активный в отношении *Ag. actinomycetemcomitans*, а также изучены их биологические свойства. Выделенные бактериофаги являются перспективными для дальнейших

научных исследований на клинических штаммах, а также для проведения полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: бактериофаги; *Actinomyces oris*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; заболевания пародонта; пародонтальные инфекции; биопленка; фаготерапия; фагопрофилактика; множественность инфекции; MOI; литическая активность

Для цитирования: Кочетова Т.А., Юскевич В.В., Зурабов Ф.М., Садикова Г.Т., Медведев П.В., Попова В.М. Выделение новых бактериофагов *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и исследование их биологических характеристик *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(1):103–116. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-103-116>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Isolation of novel *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bacteriophages and study of their biological characteristics *in vitro*

Tatiana A. Kochetova✉, Victoria V. Yuskevich, Fedor M. Zurabov, Gulnur T. Sadykova, Pavel V. Medvedev, Valentina M. Popova

Research and Production Centre Micromir, LLC, 5/23 Bldg. 1, Nizhny Kiselny Ln., Moscow 107031, Russian Federation

✉ Tatiana A. Kochetova; kochetova@micromir.bio

ABSTRACT

SCIENTIFIC RELEVANCE. The incidence of periodontal infections with antibiotic-resistant strains of *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* capable of forming biofilms in the oral cavity is increasing, and the effectiveness of antimicrobials against biofilms is insufficient. Therefore, the isolation of bacteriophages active against *A. oris* and *Ag. actinomycetemcomitans* is an urgent task.

AIM. This study aimed to isolate bacteriophages active against *A. oris* and *Ag. actinomycetemcomitans*, study their biological properties, and select optimum culture conditions providing pure lines and high titres of bacteriophages.

MATERIALS AND METHODS. Bacteriophages were isolated from biosamples of saliva, dental plaque, and periodontal pocket contents. The study determined bacteriophage characteristics, including the optimum multiplicity of infection, phage–cell system cultivation time, resistance to various temperatures and pH, and storage stability. Bacteriophage morphology was studied using transmission electron microscopy. Negative colony morphology, lytic activity, host range, and specificity were assessed using spot testing and the Gratia method. Bacterial strains were obtained from the strain collection of the Micromir research and production centre.

RESULTS. The authors isolated and studied 3 novel bacteriophages active against *A. oris* (vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, and vB_AorP_3/Bl-35) and 1 bacteriophage active against *Ag. actinomycetemcomitans* (vB_AacS_1/Dc-1). The *A. oris* bacteriophages were classified as podoviruses, and the vB_AacS_1/Dc-1 bacteriophage was classified as a siphovirus. The phages formed completely transparent round plaques without a halo, with a diameter ranging from 0.8±0.1 to 4.0±0.2 mm. The optimum parameters established to obtain pure phages with maximum titres included a multiplicity of infection of 0.1–10 and phage–cell system cultivation time of 8–12 hours. The study demonstrated the ability of *A. oris* bacteriophages to lyse *Actinomyces naeslundii* strains. Of the 15 *A. oris* bacteriophage strains studied, vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, and vB_AorP_3/Bl-35 lysed 10, 8, and 12 bacterial strains, respectively. The vB_AacS_1/Dc-1 phage isolate exhibited lytic activity against both tested strains of *Ag. acti-*

nomycetemcomitans. The studied phages demonstrated stability under abiotic stress and long-term storage conditions.

CONCLUSIONS. The authors isolated 3 novel bacteriophages active against *A. oris* and 1 bacteriophage active against *Ag. actinomycetemcomitans* and studied their biological properties. The isolated bacteriophages are promising as candidates for further research using clinical strains and whole-genome sequencing.

Keywords: bacteriophages; *Actinomyces oris*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; periodontal diseases; periodontal infections; biofilm; phage therapy; phage prophylaxis; multiplicity of infection; MOI; lytic activity

For citation: Kochetova T.A., Yuskevich V.V., Zurabov F.M., Sadykova G.T., Medvedev P.V., Popova V.M. Isolation of novel *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bacteriophages and study of their biological characteristics *in vitro*. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(1):103–116. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-103-116>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare having no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Микробиом ротовой полости включает от нескольких сотен до нескольких тысяч разнообразных видов микроорганизмов [1–3]. Сообщество микроорганизмов, обитающих в полости рта, характеризуется вариабельностью и уникальностью для разных индивидуальных [3]. Микробная колонизация патогенной и условно-патогенной микрофлорой и связанное с ней образование биопленки представляют серьезную проблему, влияющую на качество жизни и системное здоровье человека, так как способствуют развитию различных воспалительных заболеваний пародонта, вплоть до разрушения коллагеновых волокон, которые поддерживают зуб в альвеолярной кости [3–6]. Формирование биопленки на искусственных стоматологических поверхностях может привести к воспалению и разрушению мягких и твердых тканей, окружающих зубные имплантаты, коронки или протезы [3, 6]. В связи с увеличением числа случаев возникновения пародонтальных инфекций, вызванных лекарственно-устойчивыми штаммами, и недостаточной эффективностью противомикробных препаратов в борьбе с биопленками, актуально использование антибактериальных препаратов на основе бактериофагов [4, 6, 7]. Основные преимущества фаготерапии: специфичность бактериофагов к определенному виду бактерий, способность лизировать антибиотико-устойчивые микроорганизмы, безопасность, отсутствие ущерба нормофлоре, а также эффективность в отношении не только бактерий

в планктонном состоянии, но и бактерий в виде биопленки¹ [4, 6–8].

Бактерии *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Actinomyces oris*, способные формировать биопленку, являются одними из многих этиологических факторов заболеваний пародонта [1, 6, 9–13]. *A. oris* – грамположительный факультативно-анаэробный микроорганизм, ранний колонизатор в развитии биопленок полости рта, был идентифицирован при инфекциях корневых каналов, актиномикозах и периимплантите [1, 2, 9–11, 14, 15]. Основной патоген пародонта – *Ag. actinomycetemcomitans* – является поздним колонизирующим микроорганизмом, который выделялся при запущенных формах заболеваний пародонта, таких как локализованный агрессивный периодонтит, а также в полости рта здоровых людей [1, 4, 5, 12, 16–18]. *Ag. actinomycetemcomitans* – грамотрицательный факультативно-анаэробный патобионт полости рта, для жизнедеятельности которому требуется от 5 до 10% диоксида углерода [12, 13, 18]. Установлена роль *Ag. actinomycetemcomitans* и *A. oris* в развитии воспалительных заболеваний полости рта [4, 5], в связи с чем приоритетной задачей является выделение бактериофагов против данных микроорганизмов.

Цель работы – выделение бактериофагов, активных в отношении *Ag. actinomycetemcomitans* и *A. oris*, изучение их биологических свойств и подбор оптимальных параметров культивирования системы «фаг–клетка» для получения чистых линий бактериофагов с высокими значениями титра.

¹ Зайцев АВ, Зурабов АЮ, Говоров АВ, Васильев АО, Арефьева ОА, Зурабов ФМ и др. Бактериофаги в урологии: методические рекомендации. М.: АБВ-пресс; 2022.

Материалы и методы

Материалы

Штаммы бактерий и условия роста. Клинические изоляты *A. oris* G-12, *A. oris* Ch-28, *A. oris* BL-35, *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1, использованные в данном исследовании, были получены из рабочей коллекции штаммов НПЦ «Микромир» (Россия). Подтверждение видовой (штаммовой) принадлежности изолятов проводили с использованием микроскопического, бактериологического, биохимического и масс-спектрометрического методов идентификации микроорганизмов.

Штаммы бактерий проверяли на наличие фагов индукцией ультрафиолетовым излучением [19], а также без воздействия индуцирующего фактора по методике, предложенной С. Лурией и Д. Дарнеллом [20]. Штаммы, проявляющие лизогенные свойства, выбраковывали.

Штаммы *A. oris* культивировали в течение 18–22 ч на BHI агаре (HiMedia Laboratories, Индия) или в BHI бульоне (HiMedia Laboratories, Индия) при температуре 37 °С в термостате (Binder, Германия).

Штаммы *Ag. actinomycetemcomitans* культивировали в течение 18–22 ч на BHI агаре или в BHI бульоне в атмосфере 10% углекислого газа в инкубаторе MCO-175 (SANYO, Япония) при температуре 37 °С.

Бактериофаги. Для выделения бактериофагов и проведения экспериментов использовали штаммы: *A. oris* G-12, *A. oris* Ch-28, *A. oris* BL-35, *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1. Эти штаммы представляют наиболее удобными для производства бактериофагов и обладают наибольшей чувствительностью. Для каждого бактериофага использовали отдельный штамм: *A. oris* G-12 для vB_AorP_1/G-12, *A. oris* Ch-28 для vB_AorP_2/Ch-28, *A. oris* BL-35 для vB_AorP_3/BL-35 и *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1 для vB_AacS_1/Dc-1. Выделенные фаги были названы в соответствии с предложенной А.М. Kropinski с соавт. [21] системой наименований.

Методы

Выделение бактериофагов. Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенными М. Адамсом [22] и Д.М. Гольдфарбом [23]. Образцы биоматериала из ротовой полости (слюна, зубной налет и содержимое пародонтального кармана) использовались в качестве источника для выделения фагов, специфичных к изолированным штаммам *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans*.

Образцы биоматериала центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter, США) для удаления бактериальных клеток и крупных частиц [23]. Супернатант отделяли от осадка и фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор – 1,2; 0,45; 0,22 мкм (Sartorius, Германия).

Бактериофаги выделяли, используя метод обогащения «с подсевом»². К 10 мл разлитого по пробиркам BHI бульона добавляли 1 мл культур *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans* (10⁸ КОЕ/мл), взятых в экспоненциальной фазе роста. Одновременно в пробирки вносили 10 мл ранее приготовленного фильтрата и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч для получения обогащенного фагового лизата [23]. В общей сложности для процедуры обогащения использовали 12 штаммов (10 штаммов *A. oris* и 2 штамма *Ag. actinomycetemcomitans*). После периода обогащения смеси центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter, США). Супернатант отделяли от осадка и центрифугировали на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США) при 27000 об/мин в течение 120 мин. Осадок ресуспендировали в 0,05 М трис-HCl буфере (pH 7,0–7,2) и фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор – 1,2; 0,45; 0,22 мкм (Sartorius, Германия). Подтверждение наличия фагов в обогащенном лизате проводили путем точечного нанесения фильтрата фагов на бактериальный газон исследуемых культур (спот-тест) [24]. При обнаружении лизиса культуры в месте нанесения капли фильтрата бактериофагов или появлении в этом участке мелких стерильных пятен фаговые лизаты продолжали исследовать, используя метод агаровых слоев по Грация [22, 23].

Получение чистых линий бактериофагов.

Для получения чистых линий бактериофагов отбирали единичную хорошо изолированную бляшку с помощью стерильного наконечника микропипетки. Бляшку помещали в 5 мл BHI бульона одновременно с чувствительной культурой в экспоненциальной фазе роста и обогащали в течение 24 ч [23]. Данную процедуру повторяли три раза для получения морфологически однородных негативных колоний с последующей стерилизующей фильтрацией. Чистые линии бактериофагов помещали в стерильные пробирки и хранили для дальнейших исследований при 4 °С.

Оценка морфологии негативных колоний бактериофага. Метод агаровых слоев по Грация

² Лабинская АС, Блинкова ЛП, Ешина АС, ред. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие. М.: Медицина; 2004.

использовали для исследования морфологии бляшек фагов, активных в отношении *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans* [22, 23]. В пробирки с ВНИ агаром (0,4%) добавляли по 1,0 мл разведенный титруемого бактериофага и по 0,1 мл бактериальной суспензии, затем высевали на предварительно подготовленные чашки с ВНИ агаром (1,5%). Морфологию бляшек изучали после инкубирования в течение 18–22 ч в условиях роста микроорганизмов, описанных ранее.

Электронная микроскопия. Морфологию вирионов исследовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Каплю очищенных фагов с титром 10^9 бляшкообразующих единиц в 1 мл фаголизата (БОЕ/мл) наносили на медную подложку с последующим отрицательным окрашиванием 2% водным раствором уранилацетата (рН 3,0) и исследовали с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония). Электронные микрофотографии были сделаны с помощью установленной на микроскоп камеры Erlangshen ES500W (Gatan, США). Оценку морфологических параметров бактериофагов проводили с использованием программы ImageJ³.

Определение оптимального значения множественности инфекции. Оптимальное значение множественности инфекции (multiplicity of infection, MOI) [25] для бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/Bl-35 устанавливали с использованием термостата (Binder, Германия) при температуре 37 °С и в условиях анаэробной станции Whitley A35 (Don Whitley Scientific, Великобритания), предусматривающих замещение воздуха специальной бескислородной газовой смесью (N_2 – 80%, CO_2 – 10%, H_2 – 10%) при 37 °С. Показатель MOI фага vB_AacS_1/Dc-1 определяли в атмосфере 10% углекислого газа в CO_2 инкубаторе MCO-175 (SANYO, Япония) при 37 °С. Штаммы-хозяева *A. oris* G-12, *A. oris* Ch-28, *A. oris* Bl-35 и *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1 культивировали в ВНИ бульоне до ранней фазы экспоненциального роста – 10^8 КОЕ/мл. Шесть различных концентраций бактериофагов были добавлены в жидкую питательную среду к штаммам-хозяевам для формирования множественности инфекции – 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 БОЕ/КОЕ [25]. После просветления пробирок образцы отбирали, а титр фагов определяли, используя метод Грация [22, 23]. Анализ проводили в трех отдельных испытаниях и рассчитывали средние значения титров фагов, полученные на каждом этапе эксперимента.

Определение оптимального времени культивирования. Оптимальное время культивирования [25] фагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 на соответствующих тест-штаммах *A. oris* G-12 и *A. oris* Ch-28 устанавливали при значении MOI, равном 1, в условиях анаэробной станции Whitley A35 при температуре 37 °С. Для фага vB_AorP_3/Bl-35 оптимальное время культивирования определяли на тест-штамме *A. oris* Bl-35 при значении MOI, равном 10, в условиях анаэробной станции Whitley A35 при 37 °С, а для фага vB_AacS_1/Dc-1 – на тест-штамме *Ag. actinomycetemcomitans* Dc-1 при MOI 0,1 в атмосфере 10% углекислого газа в CO_2 инкубаторе при 37 °С. Опытным путем находили оптимальное соотношение между временем культивирования и активностью фагов [25]. Для этого каждые 2 ч отбирали образец для определения титра фага по методу Грация [22, 23]. Изучаемый диапазон составил 12 ч. Анализ проводили в трех повторностях.

Определение спектра литической активности фагов. Литический спектр бактериофагов исследовали на 15 тест-культурах *A. oris* и 2 тест-культурах *Ag. actinomycetemcomitans* методом спот-тестирования [24].

Определение специфичности бактериофагов. Специфичность бактериофагов, активных в отношении *A. oris*, изучали методом спот-тестирования культур родственных видов [24]: *A. naeslundii*, *A. canis*, *A. georgiae*, *A. graevenitzi*, *A. israelii*, *A. neuui*, *A. odontolyticus*, *A. meyeri*, *A. weissii*. Штаммы получены из коллекции микроорганизмов НПЦ «Микромир» (Россия).

Чувствительность фагов к температуре и рН. Температурную устойчивость выделенных бактериофагов определяли по изменению количества жизнеспособных фаговых частиц после инкубации в твердотельном термостате «Термит» («ДНК-Технология», Россия) при различных температурах (4, 25, 37, 50, 60, 70, 80 и 90 °С) в течение 1 ч [26]. Контрольные пробирки не прогревали. Количество оставшихся фаговых частиц определяли, используя метод Грация [22, 23]. Исследование проводили в трех повторностях.

В ходе экспериментов по изучению чувствительности фагов к различным значениям рН среды фаговые фильтраты инкубировали в буферных растворах с различными значениями рН (2, 4, 7 и 11) при 25 °С в течение 1 ч [24]. Количество оставшихся фаговых частиц определяли, используя метод Грация [22, 23].

Стабильность фаголизатов при длительном хранении. Стабильность фаголизатов,

³ <https://imagej.net/ij/>

хранящихся при температуре 4 °С, изучали путем отслеживания изменения титра фагов после 6 мес. хранения [27] с применением метода титрования по Грациа.

Статистическая обработка данных.

Полученные результаты обрабатывали с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel, рассчитывая среднее арифметическое и стандартную ошибку.

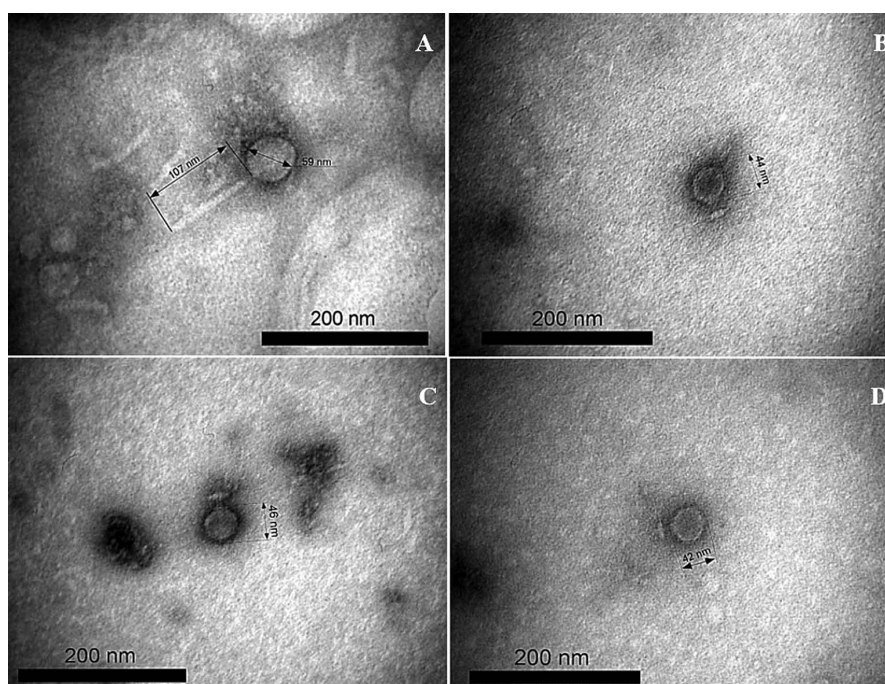
Результаты и обсуждение

Проведено выделение новых бактериофагов, активных в отношении *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans*, из образцов слюны, зубного налета и содержимого пародонтальных карманов (рис. 1). Использование данных образцов биоматериала для выделения фагов в настоящей работе обусловлено тем, что они могут являться средой обитания микроорганизмов *A. oris* и *Ag. actinomycetemcomitans*. Анализ литературных источников показал, что явление лизогении широко распространено среди штаммов *Ag. actinomycetemcomitans*, а выделенные бактериофаги в основном представляют собой умеренные миовирусы, полученные после различных индуцирующих воздействий на бактерию [6, 16, 28, 29]. В настоящем

исследовании новый бактериофаг, специфичный к *Ag. actinomycetemcomitans*, был выделен из объектов внешней среды без индуцирующего воздействия.

Согласно данным трансмиссионной электронной микроскопии, изоляты фагов vB_AorP_1/G-12 (рис. 1B), vB_AorP_2/Ch-28 (рис. 1C), vB_AorP_3/Bl-35 (рис. 1D) имели икосаэдрический капсид и короткий несокращающийся хвостовой отросток. Бактериофаг vB_AacS_1/Dc-1 (рис. 1A) имел изометрическую головку и длинный несокращающийся хвостовой отросток. В соответствии с классификацией Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)⁴ фаги бактерий *A. oris* были отнесены к подовирусам, а бактериофаг vB_AacS_1/Dc-1 – к сифовирусам. Оценка морфологии негативных колоний показала, что фаги vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35 и vB_AacS_1/Dc-1 образуют полностью прозрачные бляшки округлой формы без ореола. Морфологические особенности вирионов фагов и морфология бляшек бактериофагов представлены в таблице 1.

Для получения чистых линий бактериофагов с высокими титрами важно определить следующие параметры: оптимальное значение MOI,



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Электронные микрофотографии фаговых частиц: А – vB_AacS_1/Dc-1; В – vB_AorP_1/G-12; С – vB_AorP_2/Ch-28; D – vB_AorP_3/Bl-35. Контрастирование 2% раствором уранилацетата, увеличение ×250 000.

Fig. 1. Electron micrographs of bacteriophages: vB_AacS_1/Dc-1 (A), vB_AorP_1/G-12 (B), vB_AorP_2 /Ch-28 (C), and vB_AorP_3/Bl-35 (D). Contrasting with 2% uranyl acetate solution, ×250 000.

⁴ <https://ictv.global/taxonomy>

Таблица 1. Морфологические особенности вирионов и морфология бляшек бактериофагов, активных в отношении *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
Table 1. Morphological characteristics of virions and plaques of bacteriophages active against *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Морфология <i>Morphology</i>	Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>			
	vB_AorP_1/G-12	vB_AorP_2/Ch-28	vB_AorP_3/Bl-35	vB_AacS_1/Dc-1
Морфология капсида <i>Capsid morphology</i>	Икосаэдрический <i>Icosahedral</i>	Икосаэдрический <i>Icosahedral</i>	Икосаэдрический <i>Icosahedral</i>	Изометрический <i>Isometric</i>
Морфология хвостового отростка <i>Tail morphology</i>	Короткий, несокращающийся <i>Short, non-contractile</i>	Короткий, несокращающийся <i>Short, non-contractile</i>	Короткий, несокращающийся <i>Short, non-contractile</i>	Длинный, несокращающийся <i>Long, non-contractile</i>
Средний диаметр головки, нм <i>Average head diameter, nm</i>	44,00±2,82	46,00±2,49	42,00±2,31	59,00±3,37
Длина хвостового отростка, нм <i>Tail length, nm</i>	–	–	–	107,00±3,16
Размер прозрачной бляшки, мм <i>Clear plaque size, mm</i>	0,8±0,1	1,0±0,2	4,0±0,2	1,2±0,2
Ореол бляшки <i>Plaque halo</i>	Отсутствует <i>Absent</i>	Отсутствует <i>Absent</i>	Отсутствует <i>Absent</i>	Отсутствует <i>Absent</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

представляющее собой среднее количество вирусных частиц на одну клетку, которое рассчитывается путем деления общего количества трансдуцирующих единиц на количество выселяемых клеток; время культивирования системы «фаг–клетка»; стабильность фагов при абиотическом стрессе и при длительном хранении.

Проводили исследование MOI для бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35 и vB_AacS_1/Dc-1 в диапазоне от 0,0001 до 10, чтобы определить оптимальные значения для получения максимальных титров каждого бактериофага. Условия для установления оптимальных значений MOI подобраны на основании культуральных свойств бактерий-хозяев. Результаты, представленные на рисунке 2, свидетельствуют о том, что для бактериофагов vB_AorP_1/G-12 и vB_AorP_2/Ch-28 оптимальное значение MOI равно 1, а самые высокие значения титра фагов получены в условиях анаэробной станции при 37 °C и составили $(4,1 \pm 0,6) \times 10^9$ и $(1,2 \pm 0,3) \times 10^9$ БОЕ/мл соответственно. Фаг vB_AorP_3/Bl-35 показал высокие значения титра и в условиях термостата, и анаэробной станции при MOI 10, однако наивысший титр достигнут в условиях анаэробной станции и составил $(2,0 \pm 0,4) \times 10^9$ БОЕ/мл. Для бактериофага vB_AacS_1/Dc-1 оптимальное значение MOI в условиях CO₂ инкубатора было 0,1, титр составил $(4,5 \pm 0,5) \times 10^9$ БОЕ/мл (рис. 3). Эти значения MOI и условия культивирования использовали для дальнейших экспериментов, а также в технологии производства чистых линий бактериофагов.

Было установлено, что оптимальное время культивирования при температуре 37 °C для фагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/Bl-35 составило 8–12 ч (рис. 4А–С). За это время происходил лизис тест-культуры (просветление среды по сравнению с контролем), значения титра фагов при этом были равны $(3,4 \pm 1,1) \times 10^9$, $(2,2 \pm 0,5) \times 10^9$, $(1,8 \pm 0,6) \times 10^9$ БОЕ/мл соответственно. Для фага vB_AacS_1/Dc-1 оптимальное время культивирования при температуре 37 °C составило 10–12 ч, титр был равен $(3,1 \pm 0,7) \times 10^9$ БОЕ/мл (рис. 4D). Полученные результаты зависимости значений титра фагов от времени культивирования были оптимальны для работы и использованы в дальнейших исследованиях, а также в технологии производства чистых линий бактериофагов.

При исследовании литического спектра фагов обнаружено, что из 15 исследуемых штаммов *A. oris* бактериофаги vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/Bl-35 лизировали 10, 8 и 12 бактериальных штаммов соответственно. Изолят фага vB_AacS_1/Dc-1 проявлял литическую активность в отношении обоих тестируемых штаммов *Ag. actinomycetemcomitans*. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Результаты исследования специфичности трех выделенных изолятов бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/Bl-35 свидетельствуют о том, что фаги проявляют свою активность и в отношении бактерии *A. naeslundii*, играющей важную роль в инициации и прогрессировании образования зубного налета (табл. 3) [30, 31].

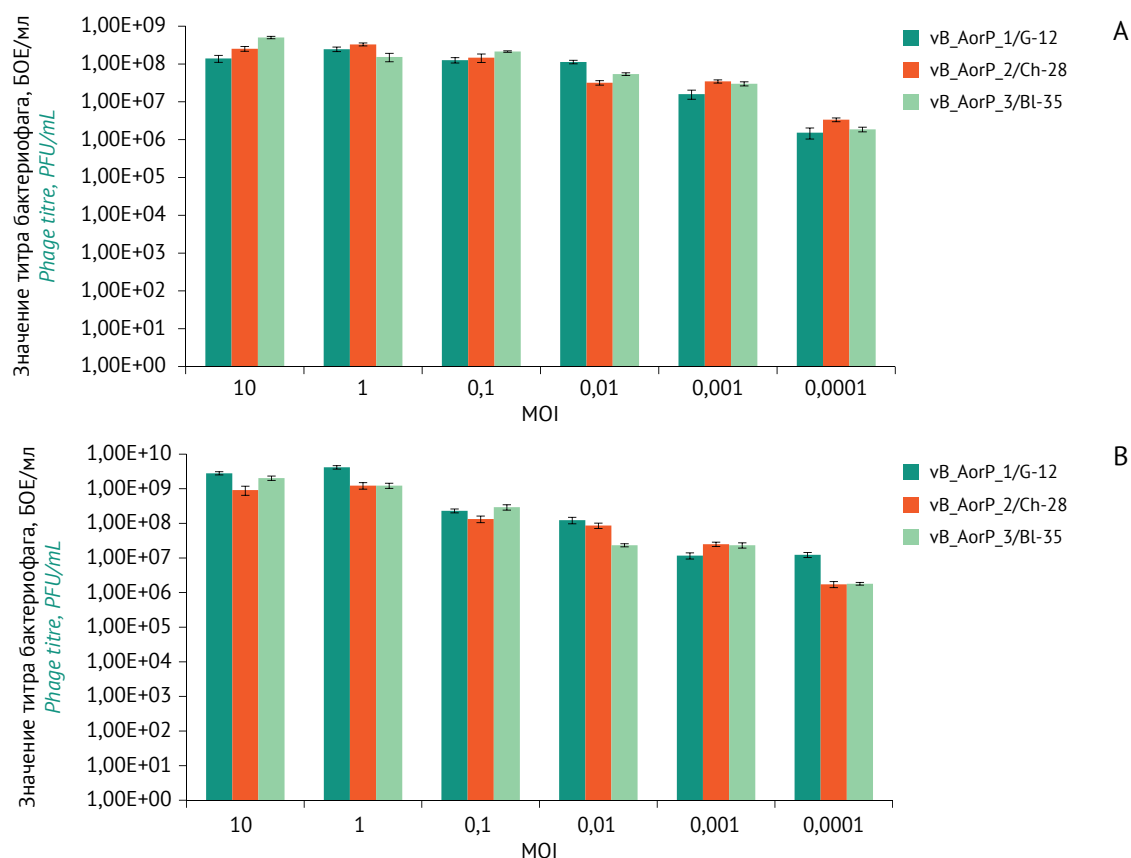


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Результаты определения значения множественности инфекции для бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/BI-35 после 8 ч инкубации в условиях термостата (А) и анаэробной станции (В) при 37 °С. Ось X – значения множественности инфекции (MOI). Ось Y – значения титра бактериофагов vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/BI-35 в экспоненциальном виде, БОЕ/мл. Результаты основаны на трех повторностях экспериментов. Вертикальные маркеры погрешностей указывают отклонение от среднего значения.

Fig. 2. Results of determining the multiplicity of infection for vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, and vB_AorP_3/BI-35 after 8 hours of incubation in a thermostat (A) and an anaerobic station (B) at 37 °C. X-axis: multiplicity of infection (MOI). Y-axis: titres of vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, and vB_AorP_3/BI-35 in exponential form, PFU/mL. Results are based on triplicate experiments. Vertical error bars indicate the deviation from the mean.

Четыре исследуемых фага продемонстрировали хороший потенциал сохранения литической активности в условиях абиотического стресса. Изоляты фагов vB_AorP_1/G-12 и vB_AacS_1/Dc-1 показали самую высокую термостойкость (60 мин при 80 °С) по сравнению с другими фагами (vB_AorP_2/Ch-28 и vB_AorP_3/BI-35),

которые были полностью инактивированы через 60 мин при 80 °С (рис. 5).

При анализе устойчивости бактериофагов к различным значениям pH (табл. 4) среды было установлено, что при значении pH 2,0 выявлено инактивирующее воздействие на все фаги, активные в отношении *A. oris*. Изоляты фагов

Таблица 2. Исследование чувствительности тест-штаммов *Actinomyces oris* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* к бактериофагам *in vitro*

Table 2. *In vitro* study of *Actinomyces oris* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* test strain sensitivity to bacteriophages

Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>	Тест-штамм <i>Test culture</i>	Число исследованных штаммов, N <i>Number of tested strains, N</i>	Число чувствительных штаммов, n (%) <i>Number of sensitive strains, n (%)</i>
vB_AorP_1/G-12	<i>A. oris</i>	15	10 (66,7%)
vB_AorP_2/Ch-28	<i>A. oris</i>	15	8 (53,3%)
vB_AorP_3/BI-35	<i>A. oris</i>	15	12 (80%)
vB_AacS_1/Dc-1	<i>Ag. actinomycetemcomitans</i>	2	2 (100%)

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

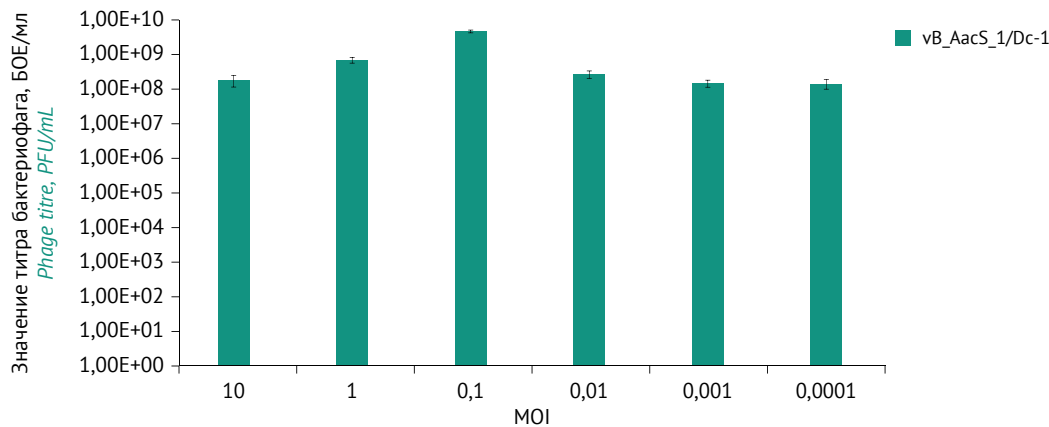


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Результаты определения значения множественности инфекции для бактериофага vB_AacS_1/Dc-1 после 10 ч инкубации в условиях CO₂ инкубатора при 37 °С. Ось X – значения множественности инфекции (MOI). Ось Y – значения титра бактериофага vB_AacS_1/Dc-1 в экспоненциальном виде, БОЕ/мл. Результаты основаны на трех повторностях экспериментов. Вертикальные маркеры погрешностей указывают отклонение от среднего значения.

Fig. 3. Results of determining the multiplicity of infection for vB_AacS_1/Dc-1 after 10 hours of incubation in a CO₂ incubator at 37 °C. X-axis: multiplicity of infection (MOI). Y-axis: titre of vB_AacS_1/Dc-1 in exponential form, PFU/mL. Results are based on triplicate experiments. Vertical error bars indicate the deviation from the mean.

Таблица 3. Исследование специфичности бактериофагов, активных в отношении *Actinomyces oris*, на культурах родственных видов *in vitro*

Table 3. *In vitro* study of the specificity of bacteriophages active against *Actinomyces oris* in cultures of related species

Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>	Тест-штамм <i>Test culture</i>	Число исследованных штаммов, N <i>Number of tested strains, N</i>	Число чувствительных штаммов, n (%) <i>Number of sensitive strains, n (%)</i>
vB_AorP_1/G-12	<i>A. naeslundii</i>	9	9 (100%)
	<i>A. odontolyticus</i>	22	0 (0%)
	<i>A. neuii</i>	2	0 (0%)
	<i>A. graevenitzii</i>	3	0 (0%)
	<i>A. canis</i>	1	0 (0%)
	<i>A. georgiae</i>	1	0 (0%)
	<i>A. israelii</i>	1	0 (0%)
	<i>A. meyeri</i>	1	0 (0%)
	<i>A. weissii</i>	1	0 (0%)
vB_AorP_2/Ch-28	<i>A. naeslundii</i>	9	6 (66,7%)
	<i>A. odontolyticus</i>	22	0 (0%)
	<i>A. neuii</i>	2	0 (0%)
	<i>A. graevenitzii</i>	3	0 (0%)
	<i>A. canis</i>	1	0 (0%)
	<i>A. georgiae</i>	1	0 (0%)
	<i>A. israelii</i>	1	0 (0%)
	<i>A. meyeri</i>	1	0 (0%)
	<i>A. weissii</i>	1	0 (0%)
vB_AorP_3/BI-35	<i>A. naeslundii</i>	9	5 (55,6%)
	<i>A. odontolyticus</i>	22	0 (0%)

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>	Тест-штамм <i>Test culture</i>	Число исследованных штаммов, N <i>Number of tested strains, N</i>	Число чувствительных штаммов, n (%) <i>Number of sensitive strains, n (%)</i>
vB_AorP_3/BI-35	<i>A. neuvi</i>	2	0 (0%)
	<i>A. graevenitzi</i>	3	0 (0%)
	<i>A. canis</i>	1	0 (0%)
	<i>A. georgiae</i>	1	0 (0%)
	<i>A. israelii</i>	1	0 (0%)
	<i>A. meyeri</i>	1	0 (0%)
	<i>A. weissii</i>	1	0 (0%)

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

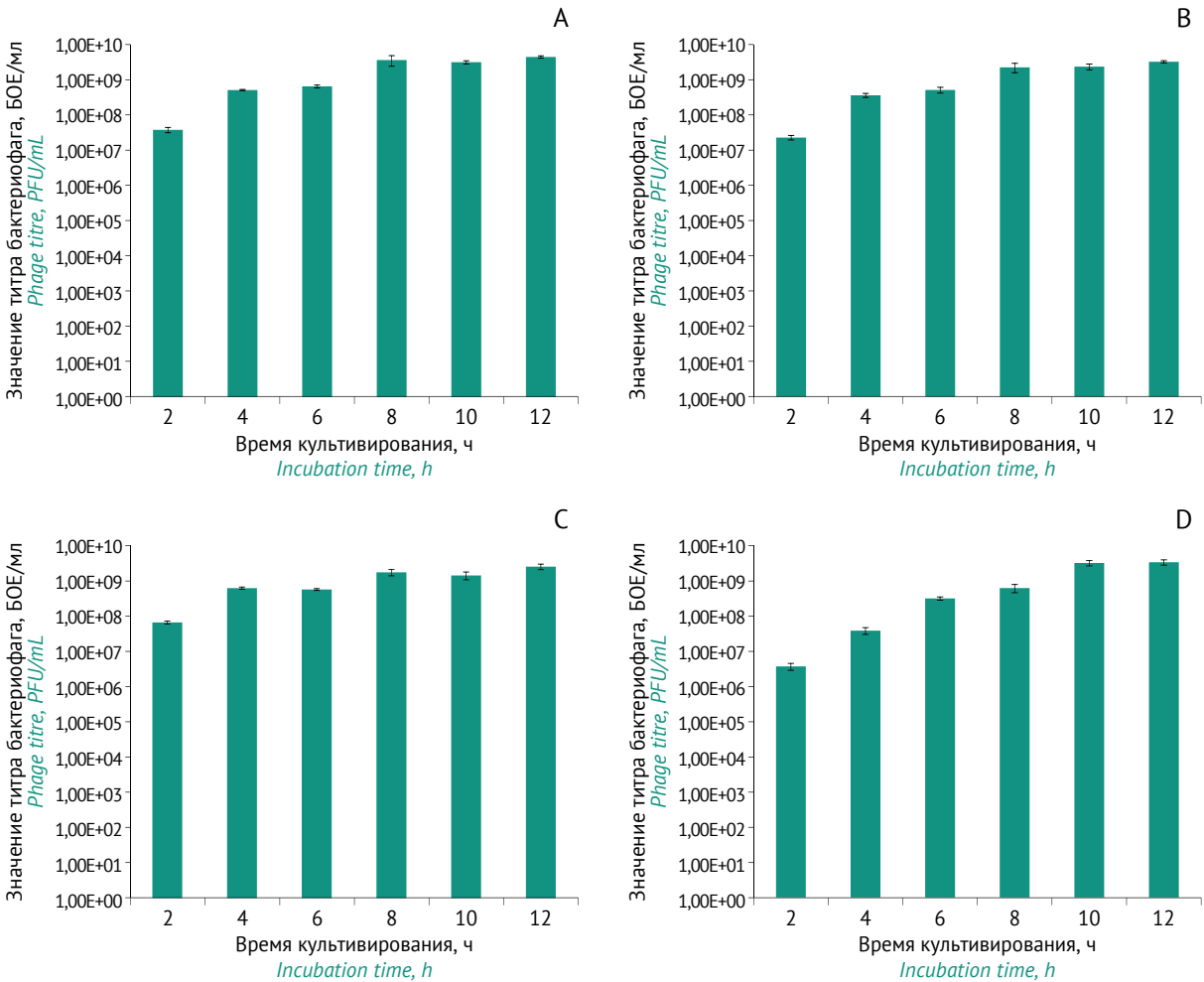


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Соотношение между временем культивирования и активностью фагов при значении множественности инфекции (MOI), равном 1 (А – vB_AorP_1/G-12, В – vB_AorP_2/Ch-28), при значении MOI 10 (С – vB_AorP_3/BI-35) и при значении MOI 0,1 (D – vB_AacS_1/Dc-1). Результаты основаны на трех повторностях экспериментов. Вертикальные маркеры погрешностей указывают отклонение от среднего значения.

Fig. 4. Phage activity as a function of incubation time at a multiplicity of infection of 1 (vB_AorP_1/G-12 (A) and vB_AorP_2/Ch-28 (B)), 10 (vB_AorP_3/BI-35 (C)), and 0.1 (vB_AacS_1/Dc-1 (D)). Results are based on triplicate experiments. Vertical error bars indicate the deviation from the mean.

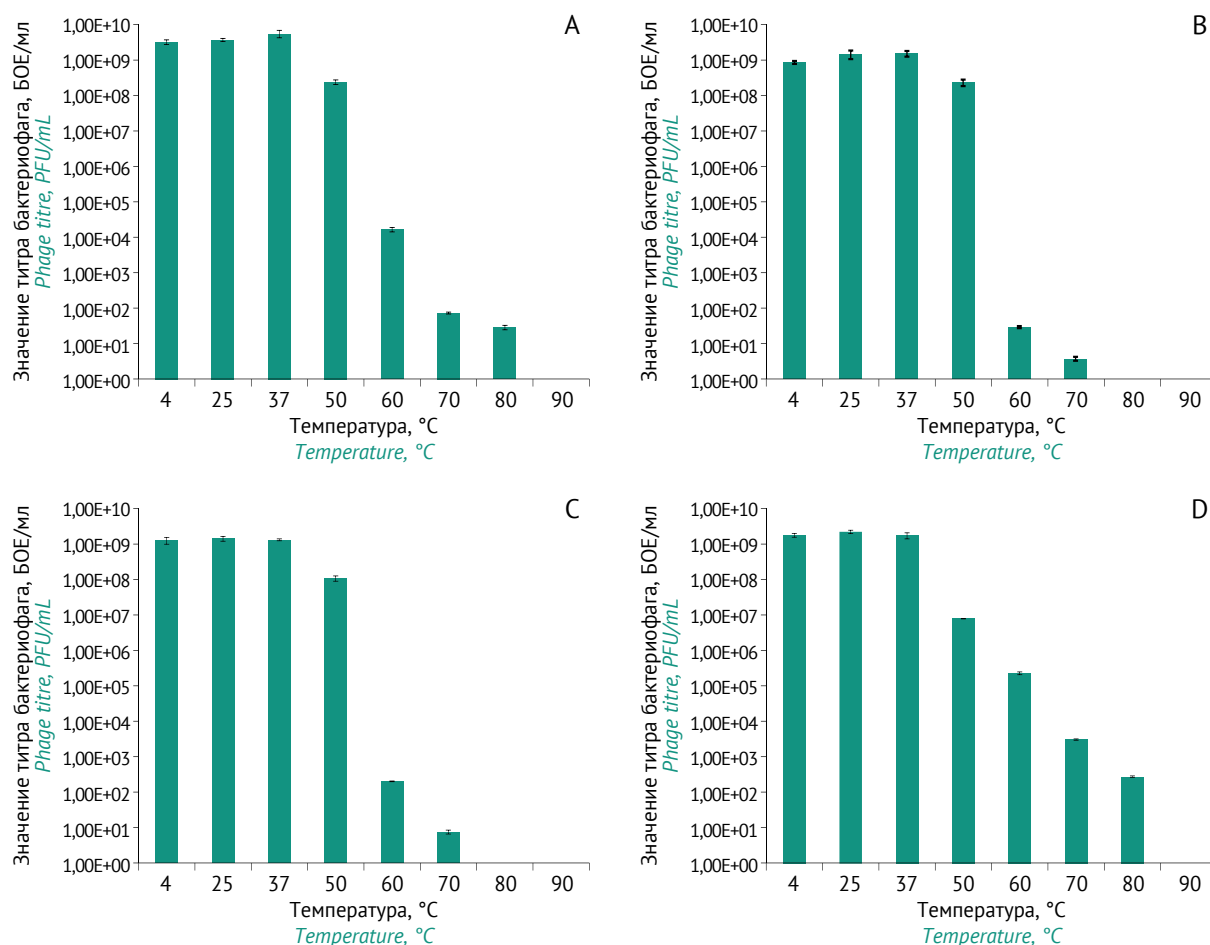


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Устойчивость к тепловому воздействию бактериофагов: А – vB_AorP_1/G-12, В – vB_AorP_2/Ch-28, С – vB_AorP_3/BI-35, D – vB_AacS_1/Dc-1. Результаты основаны на трех повторностях экспериментов. Вертикальные маркеры погрешностей указывают отклонение от среднего значения.

Fig. 5. Thermal resistance of bacteriophages: vB_AorP_1/G-12 (A), vB_AorP_2/Ch-28 (B), vB_AorP_3/BI-35 (C), and vB_AacS_1/Dc-1 (D). Results are based on triplicate experiments. Vertical error bars indicate the deviation from the mean.

vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28 при значении pH 11,0 были полностью инактивированы, в то время как изолят фага vB_AorP_3/BI-35 при этом же значении pH сохранял свою активность $((1,2 \pm 0,1) \times 10^1$ БОЕ/мл). Бактериофаг

vB_AacS_1/Dc-1 сохранял активность при всех изучаемых значениях pH.

Активность фаговых лизатов, хранившихся при температуре 4 °C, исследовали по истечении 6 мес. Результаты показали, что значения

Таблица 4. Исследование стабильности выделенных изолятов бактериофагов при различных значениях pH

Table 4. Stability study of the isolated bacteriophages at different pH values

pH	Значение титра бактериофага, БОЕ/мл Phage titre, PFU/mL			
	vB_AorP_1/G-12	vB_AorP_2/Ch-28	vB_AorP_3/BI-35	vB_AacS_1/Dc-1
2	0	0	0	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^1$
4	$(1,0 \pm 0,05) \times 10^5$	$(5,0 \pm 0,5) \times 10^5$	$(3,0 \pm 0,3) \times 10^1$	$(2,0 \pm 0,8) \times 10^4$
7	$(2,8 \pm 0,6) \times 10^9$	$(1,5 \pm 1,6) \times 10^9$	$(9,2 \pm 1,5) \times 10^8$	$(2,1 \pm 0,7) \times 10^9$
11	0	0	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^1$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^1$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 5. Активность бактериофагов после хранения при 4 °C в течение 6 мес.

Table 5. Viability of bacteriophages after storage at 4 °C for 6 months

Бактериофаг <i>Bacteriophage</i>	Значение титра фага до хранения, БОЕ/мл <i>Phage titre before storage, PFU/mL</i>	Значение титра фага после 6 мес. хранения, БОЕ/мл <i>Phage titre in 6 months, PFU/mL</i>
vB_AorP_1/G-12	(3,4±1,1)×10 ⁹	(3,5±0,3)×10 ⁹
vB_AorP_2/Ch-28	(2,2±0,5)×10 ⁹	(1,3±0,5)×10 ⁹
vB_AorP_3/BI-35	(1,8±0,6)×10 ⁹	(1,0±0,8)×10 ⁹
vB_AacS_1/Dc-1	(3,1±0,7)×10 ⁹	(1,2±1,3)×10 ⁹

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

титра не изменяются после хранения в течение 6 мес. при температуре 4 °C (табл. 5).

Закключение

Выделены три новых бактериофага, активных в отношении *A. oris* (vB_AorP_1/G-12, vB_AorP_2/Ch-28, vB_AorP_3/BI-35), и один бактериофаг, активный в отношении *Ag. actinomycetemcomitans* (vB_AacS_1/Dc-1). Изучены биологические свойства бактериофагов, такие как морфология вири-

онов фагов и фаговых бляшек, литическая активность, спектр хозяев, множественность инфекции, время культивирования системы «фаг–клетка», специфичность. Исследуемые фаги продемонстрировали стабильность при абиотическом стрессе и длительном хранении. Таким образом, выделенные бактериофаги являются перспективными для дальнейших научных исследований на клинических штаммах, а также для проведения полногеномного секвенирования.

Литература/References

- Periasamy S, Kolenbrander PE. Central role of the early colonizer *Veillonella sp.* in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol.* 2010;192(12):2965–72. <https://doi.org/10.1128/JB.01631-09>
- Wu C, Mishra A, Reardon ME, Huang IH, Counts SC, Das A, Ton-That H. Structural determinants of *Actinomyces* sortase SrtC2 required for membrane localization and assembly of type 2 fimbriae for interbacterial coaggregation and oral biofilm formation. *J Bacteriol.* 2012;194(10):2531–9. <https://doi.org/10.1128/JB.00093-12>
- Sterzenbach T, Helbig R, Hannig C, Hannig M. Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clin Oral Investig.* 2020;24(12):4237–60. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03646-1>
- Das V, Vinod V, Biswas L, Kumar A, Biswas R. An update on possible alternative therapeutics for future periodontal disease management. *J Appl Microbiol.* 2023;134(1):lxac039. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac039>
- Mombelli A. Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):85–96. <https://doi.org/10.1111/prd.12147>
- Szafrański SP, Winkel A, Stiesch M. The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *J Biotechnol.* 2017;250:29–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.002>
- Tagliaferri TL, Jansen M, Horz HP. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:22. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00022>
- Łusiak-Szelachowska M, Weber-Dąbrowska B, Górski A. Bacteriophages and lysins in biofilm control. *Viral Sin.* 2020;35(2):125–33. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00192-3>
- Suzuki I, Shimizu T, Senpuku H. Role of SCFAs for fimbriin-dependent biofilm formation of *Actinomyces oris*. *Microorganisms.* 2018;6(4):114. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040114>
- Mishra A, Wu C, Yang J, Cisar JO, Das A, Ton-That H. The *Actinomyces oris* type 2 fimbrial shaft FimA mediates co-aggregation with oral streptococci, adherence to red blood cells and biofilm development. *Mol Microbiol.* 2010;77(4):841–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07252.x>
- Sanchez BC, Chang C, Wu C, Tran B, Ton-That H. Electron transport chain is biochemically linked to pilus assembly required for polymicrobial interactions and biofilm formation in the gram-positive actinobacterium *Actinomyces oris*. *mBio.* 2017;8(3):e00399-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00399-17>
- Kachlany SC. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res.* 2010;89(6):561–70. <https://doi.org/10.1177/0022034510363682>
- Danforth DR, Tang-Siegel G, Ruiz T, Mintz KP. A non-fimbrial adhesin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mediates biofilm biogenesis. *Infect Immun.* 2018;87(1):e00704-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00704-18>
- Nambu T, Mashimo C, Maruyama H, Taniguchi M, Huang Y, Takigawa H, et al. Complete genome sequence of *Actinomyces oris* strain K20, isolated from an oral apical lesion. *Microbiol Resour Announc.* 2022;11(8):e0054122. <https://doi.org/10.1128/mra.00541-22>

15. Phichaphop C, Apiwattanakul N, Wanitkun S, Boonsathorn S. Bacterial endocarditis caused by *Actinomyces oris*: first reported case and literature review. *J Investig Med High Impact Case Rep*. 2020;8:2324709620910645.
<https://doi.org/10.1177/2324709620910645>
16. Tang-Siegel GG, Chen C, Mintz KP. Increased sensitivity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to human serum is mediated by induction of a bacteriophage. *Mol Oral Microbiol*. 2023;38(1):58–70.
<https://doi.org/10.1111/omi.12378>
17. Hbib A, Bouziane A, Lyoussi B, Zouhdi M, Benazza D. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: from basic to advanced research. *Adv Exp Med Biol*. 2022;1373:45–67.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-96881-6_3
18. Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, Shokouhi B, Fakhrzadeh V, Kafil HS. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog*. 2017;113:303–11.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.001>
19. Романова НА, Феоктистова НА, Золотухин СН, Васильев ДА, Алешкин АВ. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium*. *Вестник ветеринарии*. 2013;(1):26–7. Romanova NA, Feoktistova NA, Zolotukhin SN, Vasilyev DA, Aleshkin AV. Comparative efficacy of isolation methods for phages of *Bacillus megaterium*. *Vestnik Veterinarii*. 2013;(1):26–7 (In Russ.). EDN: [PLHIWV](https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-3-273-279)
20. Лурия С, Дарнелл Дж. *Общая вирусология*. М.: Мир; 1970. Luria S, Darnell J. *General virology*. Moscow: Mir; 1970 (In Russ.).
21. Kropinski AM, Prangishvili D, Lavigne R. Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of *Bacteria* and *Archaea*. *Environ Microbiol*. 2009;11(11):2775–7.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01970.x>
22. Адамс М. *Бактериофаги*. М.: Медгиз; 1961. Adams M. *Bacteriophages*. Moscow: Medgiz; 1961 (In Russ.).
23. Гольдфарб ДМ. *Бактериофагия*. М.: Медгиз; 1961. Goldfarb DM. *Bacteriophagy*. Moscow: Medgiz; 1961 (In Russ.).
24. Peng SY, Chen LK, Wu WJ, Paramita P, Yang PW, Li YZ, Lai MJ, Chang KC. Isolation and characterization of a new phage infecting *Elizabethkingia anophelis* and evaluation of its therapeutic efficacy in vitro and in vivo. *Front Microbiol*. 2020;11:728.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00728>
25. Сульдина ЕВ. Разработка ускоренной схемы идентификации листерий с помощью фагового биопрепарата Л.м 4УЛГАУ. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2020;(4):191–7. Sul'dina EV. Development of quick scheme identification of *Listeria* using phage biopreparation L.m 4УЛГАУ. *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. 2020;4(52):191–7 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18286/1816-4501-2020-4-191-197>
26. Орловская ПИ, Гирилович НИ, Пилипчук ТА, Мандрик-Литвинкович МН, Коломиец ЭИ. Влияние физико-химических факторов на выживаемость бактериофагов фитопатогенных бактерий. В кн.: Коломиец ЭИ, ред. *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*. Минск: Беларуская навука; 2021. С. 204–11. Orlovskaya PI, Girilovich NI, Pilipchuk TA, Mandrik-Litvinkovich MN, Kolomiets EI. Effect of physico-chemical factors on survival of bacteriophages of phytopathogenic bacteria. In: Kolomiets, ed. *Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects*. Minsk: Belaruskaya navuka; 2021. P. 204–11 (In Russ.).
<https://doi.org/10.47612/2226-3136-2021-13-204-211>
27. Кочетова ТА, Юскевич ВВ, Садикова ГТ, Попова ВМ. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов, специфичных к *Bordetella bronchiseptica*. *Ветеринария сегодня*. 2022;11(3):273–9. Kochetova TA, Yuskevich VV, Sadykova GT, Popova VM. Isolation and study of biological properties of *Bordetella bronchiseptica*-specific bacteriophages. *Veterinary Science Today*. 2022;11(3):273–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-3-273-279>
28. Stevens RH, Preus HR, Dokko B, Russell DT, Furgang D, Schreiner HC, et al. Prevalence and distribution of bacteriophage phi Aa DNA in strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;119(3):329–37.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06909.x>
29. Loftus A, Delisle AL. Inducible bacteriophages of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Curr Microbiol*. 1995;30(5):317–21.
<https://doi.org/10.1007/BF00295508>
30. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology (Reading)*. 2009;155(Pt 7):2116–26.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.027706-0>
31. Arai T, Ochiai K, Senpuku H. *Actinomyces naeslundii* GroEL-dependent initial attachment and biofilm formation in a flow cell system. *J Microbiol Methods*. 2015;109:160–6.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.021>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Т.А. Кочетова** — сбор и анализ литературных данных, планирование экспериментов, выполнение экспериментальных работ (исследование специфичности и стабильности выделенных фагов, подбор оптимальных параметров культивирования системы «фаг–клетка») и статистическая обработка данных, обсуждение результатов исследования, написание текста рукописи; **В.В. Юскевич** — обобщение и обсуждение результатов исследования; **Ф.М. Зурабов** — критический анализ результатов исследования; **Г.Т. Садикова** — выполнение экспериментальных работ (исследование литической активности, спектра хозяев, морфологии фаговых бляшек); **П.В. Медведев** — электронно-микроскопические исследования бактериофагов; **В.М. Попова** — обсуждение результатов исследования, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **T.A. Kochetova** collected and analysed literature data, planned and conducted the experiments (studied the specificity and stability of isolated phages and selected optimal parameters for cultivating the phage–cell system), carried out statistical data processing, discussed the study results, and drafted the manuscript. **V.V. Yuskevich** generalised and discussed the study results. **F.M. Zurabov** critically analysed the study results. **G.T. Sadykova** performed the experiments (studied the lytic activity, the host spectrum, and the morphology of phage plaques). **P.V. Medvedev** performed electron microscopy of bacteriophages. **V.M. Popova** discussed the study results and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Кочетова Татьяна Андреевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8280-4341>

kochetova@micromir.bio

Юскевич Виктория Викторовна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0459-7479>

v.yuskevich@micromir.bio

Зурабов Федор Михайлович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7947-1128>

fmzurabov@micromir.bio

Садикова Гульнур Тахавиевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7711-7958>

gulnurs.5959@gmail.com

Медведев Павел Витальевич

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8857-9519>

p.medvedev@micromir.bio

Попова Валентина Михайловна, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9630-1945>

popovavm9@yandex.ru

Tatiana A. Kochetova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8280-4341>

kochetova@micromir.bio

Victoria V. Yuskevich, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0459-7479>

v.yuskevich@micromir.bio

Fedor M. Zurabov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7947-1128>

fmzurabov@micromir.bio

Gulnur T. Sadykova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7711-7958>

gulnurs.5959@gmail.com

Pavel V. Medvedev

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8857-9519>

p.medvedev@micromir.bio

Valentina M. Popova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9630-1945>

popovavm9@yandex.ru

Поступила 19.09.2023

После доработки 28.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Received 19 September 2023

Revised 28 February 2024

Accepted 29 February 2024