

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕКТРА ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ МЕТОДОМ АКУСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

© 2015 г. О.И. Гулий\* \*\* \*\*\*, Б.Д. Зайцев\*\*\*\*, И.Е. Кузнецова\*\*\*\*\*,  
А.М. Шихабудинов\*\*\*\*, Л.А. Дыкман\* \*\*\*, С.А. Староверов\* \*\* \*\*\*,  
О.А. Караваева\*, С.А. Павлий\*\*\*\*\*, О.В. Игнатов\*

\*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, Саратов, пр. Энтузиастов, 13;

\*\*Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова,  
410012, Саратов, Театральная пл., 1;

\*\*\*Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАН,  
410028, Саратов, ул. 53 Стрелковой Дивизии, 6;

\*\*\*\* Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН,  
Саратов, 410019 Саратов, ул. Зеленая, 38;

\*\*\*\*\*Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, 125009, Москва, ул. Моховая, 11/7;

\*\*\*\*\*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,  
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

E-mail: gulyi\_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 09.02.15 г.

Изучены изменения электроакустических параметров суспензии клеток при взаимодействии с бактериофагами, как в чистой культуре, так и в смешанной суспензии клеток. Установлено, что специфические изменения параметров клеточных суспензий под действием фага происходят только у микробных клеток, чувствительных к изучаемому бактериофагу. Установлено, что датчик позволяет разграничивать ситуации, когда происходит инфицирование бактериальных клеток специфическими бактериофагами от контрольных экспериментов, когда такого инфицирования не происходило. Выработан ориентировочный критерий наличия специфического взаимодействия бактериофагов и клеток в анализируемой суспензии, который заключается в том, что изменение модуля электрического импеданса датчика не должно быть менее ~1%. Проведены контрольные эксперименты по инфицированию клеток бактериофагом с помощью стандартного микробиологического высева на плотные питательные среды. Впервые показана возможность использования метода электроакустического анализа для определения спектра литической активности бактериофагов. Полученные результаты могут быть использованы для создания экспресс-метода определения чувствительности микробных клеток к бактериофагам.

*Ключевые слова:* спектр литической активности, бактериофаги, микробные клетки, электроакустический метод анализа.

Бактериофаги могут выступать в роли биологического рецептора для детекции микробных клеток [1] и представляют интерес при изучении взаимодействия бактериофаг–микробная клетка. Кроме того, бактериофаги могут быть использованы для диагностики многих возбудителей различных инфекционных заболеваний человека, животных и растений [2] и являются эффективным средством борьбы с этими возбудителями (в том числе с теми, которые устойчивы к действию антибиотиков) [3–6]. Эффективность обусловлена специфическим действием бактериофагов, а также простотой подготовки препаратов и их низкой стоимостью, по сравнению с разработкой новых антибио-

тиков против устойчивых штаммов бактерий. Стоит отметить, что в 1920-е гг. с помощью препаратов бактериофагов удалось излечить тысячи людей от дизентерии, тифа, холеры и других инфекционных заболеваний. Однако уже в 1940-е гг. после открытия антибиотиков применение бактериофагов в качестве лечебных профилактических препаратов против инфекционных заболеваний прекратилось.

В настоящее время интерес к бактериофагам появился вновь в связи с увеличением числа устойчивых к антибиотикам микроорганизмов. Тем не менее основным условием успешного применения бактериофагов является чувствительность возбудителя к соответствующему бак-

териофагу – фаговая специфичность. В настоящее время существует несколько способов определения чувствительности бактерий к бактериофагам, среди них:

– стандартные микробиологические методы [7,8];

– метод электроориентационной спектроскопии, основанный на регистрации изменения оптических свойств микробной суспензии под влиянием переменного электрического поля;

– флуоресцентная спектроскопия, основанная на внесении в систему мембранотропного зонда и регистрации интенсивности флуоресценции [9];

– методы с использованием биосенсоров на основе бактериофагов [10,11].

В последнее время активно развиваются исследования, направленные на изучение электрофизических свойств клеток. Это обусловлено рядом достоинств электрофизических методов анализа. Во-первых, существует тесная связь электрофизических характеристик клеток с процессами жизнедеятельности; во-вторых, измерение этих характеристик можно проводить быстро и без разрушения клеток и клеточных структур, что позволяет исследовать процессы, протекающие в клетках *in situ* [12,13]. Акустические методы анализа привлекают все большее внимание исследователей для анализа биологических взаимодействий, поскольку характеризуются высокой чувствительностью и минимальным временем для проведения анализа. При этом значительный интерес вызывают пьезоэлектрические резонаторы с поперечным электрическим полем, которые в отличие от традиционных резонаторов с продольным полем более чувствительны к контактирующей жидкости, поскольку реагируют как на изменение ее вязкости, так и проводимости. Существует большое количество статей и патентов, посвященных этим резонаторам и их использованию для решения биотехнологических задач [14–17].

Поскольку процедура определения спектра литической активности бактериофагов достаточно длительна, разработка метода экспрессного анализа чувствительности микробных клеток к бактериофагам является чрезвычайно важной. В связи с этим целью работы является развитие метода электроакустического анализа клеточных суспензий для определения спектра литической активности бактериофага и решения вопроса о чувствительности микробных клеток к бактериофагам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Микроорганизмы.** В работе использовали микроорганизмы *Escherichia coli* штаммов XL-1, K-12, B-878, BL-Ril, pHEN1, pUC18, pBR325, *Azospirillum brasilense* Sp7 (IBPPM 150), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. В работе также использовали штаммы микроорганизмов, полученные из коллекции лаборатории Саратовского НИИ «Биокатализа»: *Pseudomonas putida* БА-11 (ВКПМ В-6707), *Pseudomonas putida* С-11 (ВКПМ В-6708) и *Acinetobacter calcoaceticum* А-122.

Микроорганизмы хранили при 4°C на чашках Петри с твердой питательной средой LB, содержащей 3% агар-агара (для клеток кишечной палочки). Микробные клетки пересеивали каждые две недели.

**Культивирование микроорганизмов.** Для культивирования бактерий использовали жидкую питательную среду LB [18] следующего состава (г/л): NaCl (Becton, Dickinson & Co., США) – 10,0; пептон (Becton, Dickinson & Co., США) – 5,0; дрожжевой экстракт (DIFCO, США) – 5,0. Полужидкая среда LB содержала 0,7% агар-агара; твердая – 1,5 и 3% агар-агара.

Культуры бактерий выращивали в 250-миллиметровых колбах Эрленмейера на жидкой среде LB. Инкубирование клеток проводили на круговой качалке при интенсивности перемешивания 160 об/мин при  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 18–20 ч.

**Инфицирование клеток бактериофагом.** Инфицирование микробных клеток *E. coli* XL-1 проводили с использованием нитчатого фага M13K07 семейства *Inoviridae*. M13 K07 коммерческий препарат фирмы Stratagene (Швеция), имеющий устойчивость к канамицину, был сконструирован на основе дикого типа фага M13 [18;19]. Для инфицирования бактериофагом бактериальную культуру *E. coli* XL-1 высевали из отдельной колонии с чашки с агаризованной средой LB, содержащей 12,5 мкг/мл тетрациклина в 2 мл среды LB, инкубировали в течение ночи при постоянной аэрации и 37°C, затем 1/10 часть ночной культуры пересеивали в свежую среду того же состава и растили до экспоненциальной фазы роста, при 37°C и аэрации [18,19]. По достижении ранней логарифмической фазы роста ( $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ , что соответствует  $7 \cdot 10^8$  клеток/мл) аэрацию прекращали на 30–40 мин для восстановления F-пилей и инкубировали суспензию в термостате при 37°C. Концентрацию микроорганизмов подсчитывали стандартным методом с использованием световой микроскопии. Для инфицирования микроб-

ных клеток вносили бактериофаг из расчета 20 фаговых частиц на одну клетку. После прибавления фагов культуру инкубировали при 37°C в термостате без покачивания для сорбции фаговых частиц на поверхности пилей.

#### **Выделение и характеристика бактериофагов.**

Выделение бактериофагов проводили посредством воздействия низкой температуры [18]. Выращенную культуру микроорганизмов охлаждали в холодильнике при 4°C в течение 1,5–2 ч для стимуляции выхода бактериофагов из клеток. После этого проводили центрифугирование при 2500 g в течение 40 мин. К надосадочной жидкости добавляли 1/5 объема 20% раствора полиэтиленгликоля (PEG6000, Panreac, Испания) с добавлением 1,6 М NaCl (PEG/NaCl). Затем колбу с супернатантом обкладывали льдом и помещали в холодильник при 4°C на 2 ч. По истечении указанного времени проводили центрифугирование при 12000 g в течение 30 мин, супернатант сливали, пробирку переворачивали, ставили на фильтровальную бумагу и подсушивали около 30 мин. После этого к осадку добавляли 1 мл ТЕ-буфера (10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5–8,0), ресуспендировали и центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин. Супернатант переносили в стерильную посуду и добавляли 1/5 объема PEG/NaCl, образовавшийся осадок быстро размешивали и центрифугировали при 6500 g в течение 5 мин. Полученный осадок растворяли в 1 мл ТЕ-буфера. Пробирки с суспензией бактериофага хранили в морозильной камере при температуре –20°C.

#### **Определение концентрации фаговых частиц.**

Количество фаговых частиц определяли спектрофотометрически на приборе Specord BS-250 (Analytik Jena, Германия) в кювете объемом 1 мл. Исходя из того, что величина 30 опт. ед. соответствует значению  $2 \cdot 10^{14}$  фаговых частиц/мл [19], можно было для расчетов использовать следующую формулу:  $(A_{269} - A_{320}) \cdot 5 \cdot 10^{14} / 15$ , где  $A_{269}$  – оптическая плотность суспензии при длине волны электромагнитного излучения 269 нм, а  $A_{320}$  – оптическая плотность при длине волны 320 нм.

**Проведение анализа с помощью электроакустического датчика.** Все эксперименты по изучению изменений механических и электрических свойств суспензий микробных клеток при биоспецифическом взаимодействии с фагами проводили с помощью специально изготовленного датчика на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем в диапазоне частот 6–7 МГц. Этот резонатор был изготовлен из пластины ниобата лития X-среза толщиной 0,5 мм. На нижней стороне пластины

были нанесены два прямоугольных электрода с размерами 5·10 мм<sup>2</sup> с зазором между ними 3 мм. Область вокруг электродов и часть электродов были покрыты специальным лаком, который демпфировал паразитные волны Лэмба [20] и обеспечивал достаточно высокую добротность (~630). На верхней стороне пластины была приклеена жидкостная ячейка объемом ~1 мл.

Для проведения анализа подготовленные суспензии бактериальных клеток без бактериофагов вносили в вышеупомянутую жидкостную ячейку и проводили измерение модуля электрического импеданса датчика с помощью прецизионного измерителя LCR-параметров Agilent 4285A. Затем в исследуемую суспензию добавляли определенное количество бактериофагов и измерения повторялись. Использование модуля электрического импеданса датчика в качестве аналитического сигнала связано с тем, что этот параметр наиболее чувствителен к изменению как проводимости, так и вязкости анализируемой жидкости [21].

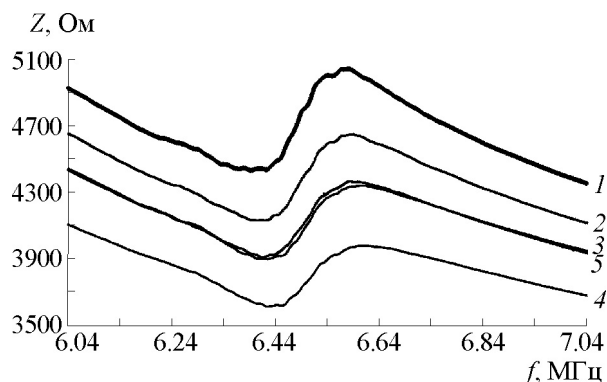
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки возможности регистрации биологических взаимодействий с помощью электроакустического датчика в качестве модельных систем были использованы микроорганизмы *E. coli* штаммов XL-1, K-12, B-878, BL-Ril, рHEN1, рUC18, рBR325 и бактериофаг M13K07, который обладает специфичностью действия в отношении мужских (F+) клеток *E. coli*.

Бактериофаг M13 – это специфический к *E. coli* нитчатый фаг, который заражает мужские клетки *E. coli* без их лизиса [22,23]. Поскольку клетки данного штамма несут F-эпизому и образуют F-пили, они могут быть заражены фагом M13K07. Процесс инфицирования клеток *E. coli*, содержащих F-пили, фагом M13 хорошо изучен [24,25]. Инфекция начинается со взаимодействия минорного фагового капсидного белка g3p с бактериальными F-пилями, которые являются первичными рецепторами фага, и затем с интегральным мембранным белком TolA [26]. Взаимодействие с фагом приводит к значительным изменениям в микробной клетке, которые обусловлены проникновением вирусной ДНК в цитоплазму клеток *E. coli*, тогда как капсидный белок (g8p) встраивается во внутреннюю цитоплазматическую мембрану [25,26]. Можно предположить, что каждый этап инфицирования фагом микробной клетки будет приводить к изменению электроакустических параметров клеточных суспензий.

Согласно предварительным экспериментам по оптимизации условий проведения анализа (выбор частоты измерения, времени взаимодействия, количества микробных клеток в измерительной ячейке) был выбран диапазон частот 6–7 МГц, при этом время эксперимента составляло ~10 мин. В измерительную ячейку вносили микробные клетки в количественном диапазоне  $10^4$  клеток/мл.

Далее с помощью элеткроакустического датчика исследовали суспензию клеток *E. coli* штамма XL-1 при их инфицировании бактериофагом M13K07. Поскольку процесс трансфекции происходит через F-пили на поверхности бактерии, образование которых может формироваться при температуре не ниже  $37^\circ\text{C}$ , культура клеток выращивалась при данной температуре и инфицирование суспензии фагом проводилось при  $37^\circ\text{C}$  в течение 10 мин с добавлением разного количества фаговых частиц бактериофага M13K07 (5, 10, 20, 30 фагов, из расчета на одну бактериальную клетку). Время анализа выбрано в соответствии с ранее полученными данными. В результате проведенных исследований было показано, что датчик позволяет разграничивать ситуации, когда происходит инфицирование бактериальных клеток специфическими бактериофагами от контрольных экспериментов, когда такого инфицирования не происходило. На рис. 1 представлены зависимости модуля электрического импеданса датчика, когда в жидкостной ячейке находилась суспензия бактериальных клеток *E. coli* штамма XL-1 в количестве  $10^4$  кл/мл с добавлением разного количества бактериофагов. Как видно из представленных данных, изменение электрического импеданса происходит уже при количестве бактериофага в образце из расчета пять вирусных частиц на клетку. С увеличением удельного количества вносимого бактериофага в клеточную суспензию модуль импеданса во всем диапазоне уменьшается вплоть до количества бактериофага из расчета 20 фагов/клетку и затем увеличивается при дальнейшем увеличении количества вносимых фаговых частиц. С физической точки зрения это объясняется следующим образом. При добавлении бактериофага вначале электрическая проводимость суспензии возрастает, что приводит к монотонному уменьшению модуля электрического импеданса пьезоэлектрического резонатора вплоть до концентрации 20 фагов/клетку. Дальнейшее увеличение количества бактериофагов приводит к росту вязкости и соответствующему увеличению электрического импеданса. Эти два противоположно направленные процесса [22] привели к тому, что кривые, соответствующие концентрациям 10 и 30 фагов/клетку, практически совпали. Полученные результаты показывают,



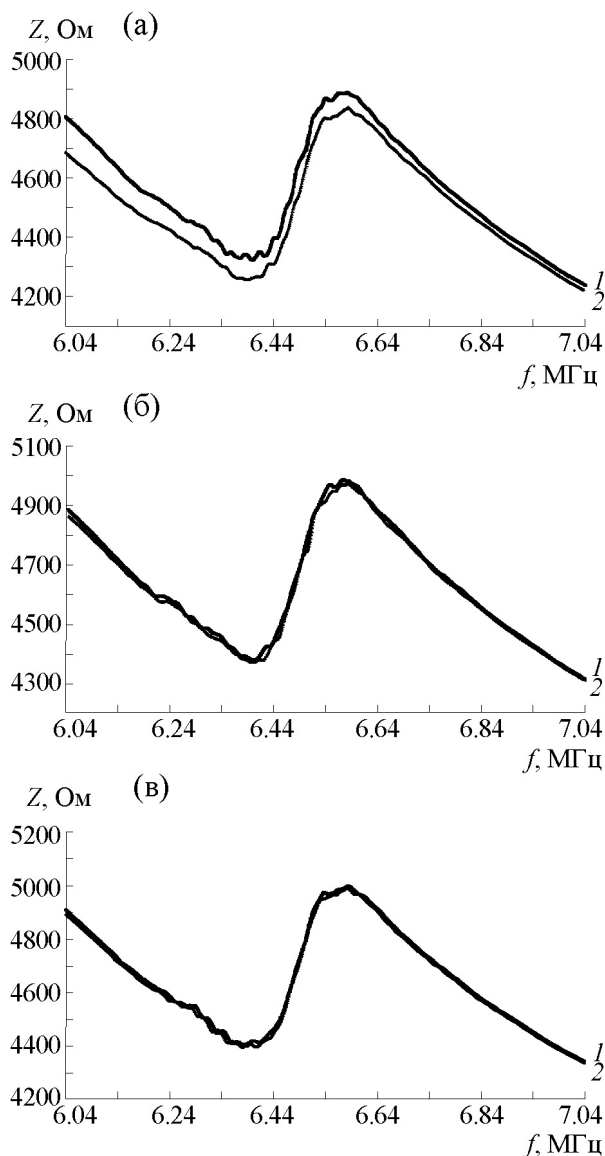
**Рис. 1.** Частотные зависимости модуля электрического импеданса резонатора при инфекции клеток *E. coli* XL-1 разным количеством бактериофага M13K07: 1 – суспензия клеток без добавления бактериофага; 2 – 5 фагов на 1 бактерию; 3 – 10 фагов на 1 бактерию; 4 – 20 фагов на 1 бактерию; 5 – 30 фагов на 1 бактерию.

что в присутствии бактериофага M13K07 в клеточной суспензии *E. coli* XL-1 происходит значительное изменение электрического импеданса, что говорит о специфическом взаимодействии изучаемого бактериофага с культурой штамма XL-1. Поскольку максимальные изменения электроакустических параметров суспензии клеток происходят при внесении бактериофагов из расчета 20 фагов на клетку, в последующих экспериментах были использованы те же самые условия.

На следующем этапе исследований необходимо было проверить селективность действия изучаемого бактериофага в отношении клеток других микроорганизмов, для этого использовали клетки *E. coli* штамма K-12. Выбор клеток *E. coli* K-12 обусловлен тем, что данный штамм является родоначальником для штамма *E. coli* XL-1 [27] и, вероятно, фаг M13K07 может инфицировать и клетки штамма K-12. Полученные результаты, представленные на рис. 2а, подтвердили это предположение. Разница в значениях модуля электрического импеданса на частоте максимума составила ~1%.

Таким образом, регистрируя изменения электроакустических параметров суспензии клеток при добавлении бактериофага, можно сделать вывод о том, что бактериофаг M13K07 инфицирует клетки *E. coli* штаммов XL-1 и K-12, т.е. данные микроорганизмы являются чувствительными к изучаемому бактериофагу.

На следующем этапе необходимо было исключить возможность неспецифического взаимодействия бактериофага M13K07 с клетками других штаммов. В качестве контрольных сус-



**Рис. 2.** Частотные зависимости модуля электрического импеданса резонатора при инфекции клеток *E. coli* K-12 (а), *E. coli* B-878 (б) и *E. coli* BL-Ril (в) бактериофагом M13K07 в количестве 20 фагов на 1 бактерию: 1 – неинфицированные клетки; 2 – инфицированные клетки.

пензий использовали клетки *E. coli* штаммов B-878, BL-Ril, pMMB33, pHEN1, pUC18, pBR325. При этом условия проведения анализа были аналогичными условиям эксперимента с клетками штамма XL-1. Из представленных на рис. 2б результатов эксперимента видно, что для клеток *E. coli* штамма B-878 после добавления бактериофага M13K07 частотная зависимость модуля импеданса практически не изменяется, т.е. микробные клетки *E. coli* штамма B-878 являются устойчивыми к бактериофагу M13K07. Аналогичные результаты были полу-

чены для клеток *E. coli* штаммов BL-Ril (рис. 2в) и pHEN1, pUC18, pBR325.

Таким образом, показано, что изменения электроакустических параметров клеточных суспензий при их инфицировании бактериофагом, значительно отличаются у чувствительных и нечувствительных к данному бактериофагу микроорганизмов.

Одним из важных моментов при разработке нового метода определения спектра литической активности бактериофага является апробация его на нескольких объектах. Поэтому проводились исследования по изучению возможностей метода электроакустического анализа микробных суспензий для определения специфичности действия бактериофага M13K07 в отношении микробных клеток *Pseudomonas putida* штаммов С-11 и ВА-11 и *Acinetobacter calcoaceticum* А-122. Условия проведения экспериментов были аналогичны таковым при использовании клеток кишечной палочки. Показано, что при инфекции клеток указанных штаммов бактериофагом M13K07 модуль электрического импеданса не менялся, следовательно, эти клетки являются устойчивыми к действию изучаемого бактериофага.

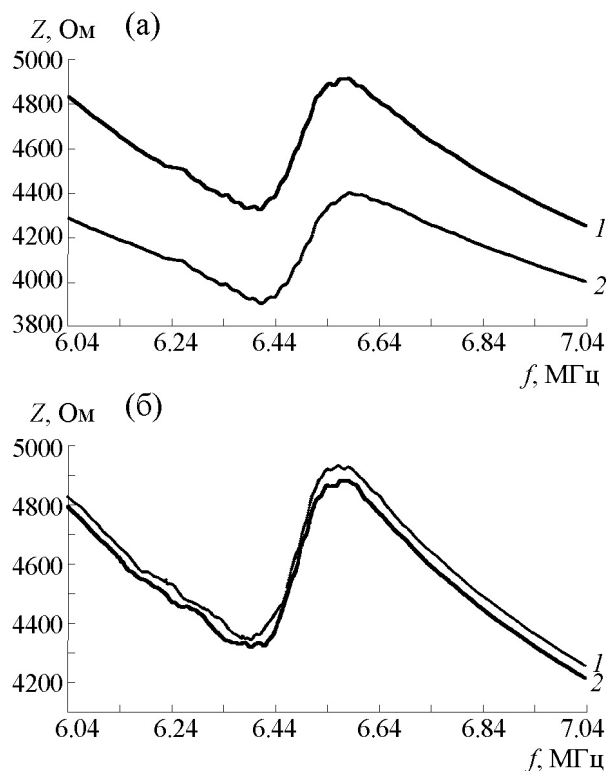
Далее представляло интерес сравнить результаты, полученные с помощью метода электроакустического анализа микробных суспензий, с данными, полученными при помощи стандартного микробиологического метода. Для контроля процесса трансфекции бактериофага в бактериальную клетку проводили посев клеток исследуемых штаммов после их инфицирования фагом на питательную среду LB с канамицином, поскольку фаг M13K07 несет в себе устойчивость к канамицину [19]. Было показано, что на чашке со средой, содержащей канамицин, наблюдался хороший рост клеток штаммов XL-1, и К-12, что свидетельствует об инфекции клеток фагом и о чувствительности клеток к бактериофагу M13K07. Однако роста клеток штаммов B-878, BL-Ril, pHEN1, pUC18, pBR325, а также *P. putida* штаммов С-11 и ВА-11 и *A. calcoaceticum* А-122 на среде, содержащей канамицин, не наблюдалось, т.е. клетки данных штаммов являются устойчивыми к действию фага M13K07.

Нередко на практике требуется получить сведения о чувствительности изучаемого штамма бактерий к бактериофагу в присутствии посторонней микрофлоры. Поэтому исследовали возможность получения аналитического сигнала в присутствии посторонней микрофлоры при помощи электроакустического датчика. Для этого к смешанной в соотношении 1:1:1 суспензии клеток *E. coli* штаммов XL-1, B-878, BL-Ril и *A. brasilense* Sp7 добавляли бактерио-

фаг М13К07, условия анализа были аналогичны условиям с использованием одной культуры клеток. Выбор клеток *A. brasilense* Sp7 в качестве балластной культуры обусловлен иным таксономическим положением штамма и близкими размерами с клетками *E. coli*. В качестве контроля использовалась смешанная суспензия *E. coli* штаммов XL-1, B-878, BL-Ril и *A. brasilense* Sp7 без внесения бактериофага. Как видно из рис. 3а, при добавлении к смешанной суспензии клеток бактериофага М13К07 фиксируется существенное изменение аналитического сигнала. Результаты инфицирования клеток *A. brasilense* Sp7 бактериофагом М13К07 представлены на рис. 3б.

Здесь следует отметить, что небольшая разница частотных зависимостей для суспензий с бактериофагами и без них для контрольных экспериментов, приведенных на рис. 3б, не связана с инфицированием бактериальных клеток бактериофагами, хотя максимальное изменение модуля упругости вблизи резонанса составляет ~1%, как и в случае, приведенном на рис. 2а. Этот результат позволяет ориентировочно определить критерий специфического взаимодействия как изменение модуля электрического импеданса резонатора на величину не менее ~1% при добавлении в суспензию клеток определенного количества бактериофагов. Но при этом видно, что в других точках диапазона зависимости на рис. 2а сильнее расходятся по сравнению с кривыми на рис. 3б. В дальнейшем для определения критерия надо принимать во внимание не одну резонансную частоту, а набор частот в определенном диапазоне вблизи резонансной частоты.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что датчик позволяет разграничивать ситуации, когда происходит инфицирование бактериальных клеток специфическими бактериофагами от контрольных экспериментов, когда такого инфицирования не происходило. Изучены изменения электроакустических параметров суспензии клеток при взаимодействии с бактериофагами, как в чистой культуре, так и в смешанной суспензии клеток. Выработан ориентировочный критерий наличия специфического взаимодействия бактериофагов и клеток в анализируемой суспензии, который заключается в следующем: изменение модуля электрического импеданса датчика не должно быть менее ~1% при добавлении в суспензию клеток определенного количества бактериофагов. Полученные результаты могут быть использованы для создания экспресс-метода определения спектра литической активности бактериофага и чувствительности микробных клеток к бактериофагам.



**Рис. 3.** Частотные зависимости модуля электрического импеданса резонатора для смешанной суспензии клеток *E. coli* B-878, *E. coli* BL-Ril, *A. brasilense* Sp7 и *E. coli* XL-1 (а) и суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 (б) при инфицировании бактериофагом М13К07 в количестве 20 фагов на 1 бактерию: 1 – неинфицированные клетки; 2 – инфицированные клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-5551.2014.9.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Zhu, I. M. White, and J. D. X. Suter, *Biosensors and Bioelectronics* **24**, 461 (2008).
2. T. K. Lu, J. Bowers, and M. S. Koeris, *Trends Biotechnol.* **31**, 325 (2013).
3. А. В. Летаров, А. К. Голомидова и К. К. Тарасян, *Acta Naturae* **2**, 66 (2010).
4. Н. В. Пименов, В. В. Субботин и Н. В. Данилевская, *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные* **6**, 6 (2013).
5. J. B. Jones, L. E. Jackson, B. Balogh, et al., *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**, 245 (2007).
6. X. Wittebole, S. De Roock, and S. M. Opal, *Virulence* **5**, 209 (2014).
7. М. Адамс, *Бактериофаги* (Медгиз, М., 1961).
8. J. S. Kumar and V. Dhar, *Biol. Fert. Soils* **46**, 681 (2010).
9. Е. Л. Жиленков, И. Г. Шемякин, В. М. Фомченков и др., *Микробиология* **67**, 666 (1998).
10. S. Balasubramanian, I. Sorokulova, V. Vodyanoy, and A. Simonian, *Biosensors and Bioelectronics* **22**, 948 (2007).

11. S. Li, Y. Lib, H. Chenb, S. Horikawaa, et al., *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 1313 (2010).
12. А. И. Мирошников, В. М. Фомченков и А. Ю. Иванов, *Электрофизический анализ и разделение клеток* (Наука, М., 1986).
13. J. Gimsa and D. Wachner, *Biophys. J.* **75**, 1107 (1998).
14. В. Д. Zaitsev, I. E. Kuznetsova, A. M. Shikhabudinov, et al., *IEEE Trans. on Ultrason., Ferroel. and Freq. Contr.* **59**, 963 (2012).
15. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **57**, 460 (2012).
16. R. C. Smythe and H. F. Tiersten, *IEEE Trans. on Ultrason., Ferroelectrics, and Freq. Contr.* **35**, 435 (1988).
17. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Микробиология* **82**, 218 (2013).
18. Т. Маниатис, Э. Фрич и Д. Сэмбрук, *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование* (Мир, М., 1984).
19. G. P. Smith and J. K. Scott, *Methods Enzymol.* **217**, 228 (1993).
20. Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова, А. М. Шихабудинов и А. А. Васильев, *Письма в ЖТФ* **37**, 27 (2011).
21. Б. Д. Зайцев, А. М. Шихабудинов, А. А. Теплых и И. Е. Кузнецова, *Ученые записки физического факультета МГУ* (в печати).
22. D. A. Marvin, R. D. Hale, C. Nave, and M. Helmer-Citterich, *J. Mol. Biol.* **235**, 260 (1994).
23. S. A. Overman, M. Tsuboi, and G. J. Thomas, *J. Mol. Biol.* **259**, 331 (1996).
24. E. M. Click and R. E. Webster, *J. Bacteriol.* **179**, 6464 (1997).
25. L. W. Deng, P. Malik, and R. N. Perham, *Virology* **253** (2), 271 (1999).
26. H. Endemann, *J. Mol. Biol.* **250**, 496 (1995).
27. P. Kuhnert, J. Nicolet, and J. Frey, *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4135 (1995).

## Determination of a Spectrum of Lytic Activity of Bacteriophages by the Method of Acoustic Analysis

**O.I. Guliy\* \*\* \*\*\*, B.D. Zaitsev\*\*\*\*, I.E. Kuznetsova\*\*\*\*\*, A.M. Shikhabudinov\*\*\*\*\*,  
L.A. Dykman\* \*\*\*, S.A. Staroverov\* \*\* \*\*\*, O.A. Karavaeva\*,  
S.A. Pavliy\*\*\*\*\*, and O.V. Ignatov\***

*\*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences,  
prosp. Enthuziastov 13, Saratov, 410049 Russia*

*\*\* Saratov State Vavilov Agrarian University, Teatralnaya pl. 1, Saratov, 410012 Russia*

*\*\*\*Saratov Scientific and Research Veterinary Institute, Russian Academy of Agricultural Sciences,  
ul. 53 Strelkovoij Divizii 6, Saratov, 410028 Russia*

*\*\*\*\*Saratov Branch of the Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Zelenaya 38, Saratov, 410019 Russia*

*\*\*\*\*\*Kotel'nikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, ul. Mokhovaya 11/7,  
Moscow, 125009 Russia*

*\*\*\*\*\*Saratov N.G. Chernyshevsky State University, ul. Astrakhanskaya 83, Saratov, 410012 Russia*

The changes in the electro-acoustic parameters of cell suspension due to the interaction of cells with bacteriophages both in a pure culture and in the presence of extraneous microflora were investigated. It has been found that the specific changes in the electroacoustic parameters of cell suspension under the action of bacteriophage occur only in microbial cells which are sensitive to the bacteriophage studied. It has been established that a sensor unit allows of distinguishing a situation when the bacterial cells are infected with specific bacteriophages of the control experiments and a situation with no introduction of infection. An approximate criterion of the presence of specific interactions of bacteriophages and cells in suspension was developed. In accordance with this criterion the change in electrical impedance of the sensor unit must not be less than ~ 1%. In control experiments a standard microbiological technique, plating the cells infected with bacteriophages on solid nutrient medium, was used. For the first time the possibility of using the method of electroacoustic analysis for determination of a spectrum of lytic activity of bacteriophages was shown. The results obtained may be used for development of a new express method for determining the sensitivity to bacteriophages of the microbial cells.

*Key words: spectrum of lytic activity, bacteriophages, microbial cells, electroacoustic method of analysis*