

## МЕТОД АКУСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК ПУТЕМ ИХ ИНФЕКЦИИ БАКТЕРИОФАГАМИ

© 2017 г. О.И. Гулий\* \*\* \*\*\*, Б.Д. Зайцев\*\*\*\*, А.М. Шихабудинов\*\*\*\*,  
И.А. Бородина\*\*\*\*, О.А. Караваева\*\*\*, О.С. Ларионова\*\*,  
А.А. Волков\*\* \*\*\*, А.А. Теплых\*\*\*\*

\*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,  
410028, Саратов, ул. 53 Стрелковой Дивизии, 6

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

E-mail: gulyi\_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.16 г.

После доработки 21.12.16 г.

Изучена зависимость изменения физических параметров суспензии клеток *Azospirillum brasilense* Sp7 при их инфекции бактериофагом ФAb-Sp7 от их количества и времени воздействия. Использовали биологический датчик на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Изменение величины аналитического сигнала было зафиксировано уже через 1 мин от начала инфекции клеток бактериофагом. Изучена селективность действия бактериофага ФAb-Sp7 по отношению к бактериям *Azospirillum brasilense* (штаммы Cd, Sp107, Sp245, Jm6B2, Br14, KR77, S17, S27, SR55, SR75), *A. lipoferum* (штаммы Sp59b, SR65 и RG20a); *A. halopraeferans* Au4, *Nitrospirillum amazonense* Am14; *Niveispirillum irakense* (штаммы KBC1 и KA3), а также бактериям гетерологичных родов: *Escherichia coli* (штаммы XL-1 и B-878), *Pseudomonas putida* (штаммы C-11 и BA-11), *Acinetobacter calcoaceticum* A-122 с помощью электроакустического датчика. Установлен предел достоверного определения концентрации микробных клеток при их инфицировании бактериофагом, который составляет  $\sim 10^4$  клеток/мл. При этом присутствие посторонних клеток культур (*E. coli* XL-1) не затрудняло детекцию. Показано, что метод электроакустического анализа клеточных суспензий может быть использован для детекции микробных клеток азоспирилл при их инфекции бактериофагом ФAb-Sp7. Полученные результаты представляются перспективными с точки зрения развития методов определения и контроля численности почвенных микроорганизмов.

*Ключевые слова:* *Azospirillum brasilense*, бактериофаги, электроакустический анализ.

Важную роль в процессах азотфиксации играют граммотрицательные ростстимулирующие бактерии рода *Azospirillum*. Впервые эти бактерии были выделены в Нидерландах более 80-ти лет назад [1], однако в сферу интенсивного изучения они попали после опубликования работы [2], став одним из наиболее интенсивно исследуемых ассоциативных партнеров растений [3,4]. Среди азоспирилл наибольшее внимание исследователей привлекает вид *Azospirillum brasilense* как модельный объект при изучении ассоциативных и эндوفитных ризосимбиозов, образуемых бактериями и высшими растениями [3–7]. Эти ризобактерии могут способствовать развитию растений как непосредственно (азотфиксация, гормональный эффект, улуч-

шение минерального и водного питания растений), так и опосредованно, путем подавления развития бактериальных патогенов. В последнее время азоспириллы рассматриваются как перспективный компонент консорциума ризобактерий для инокуляции в качестве компонентов бактериальных удобрений [8,9]. Прогресс в исследовании азоспирилл в качестве экологически безопасных стимуляторов роста растений в значительной степени зависит от развития быстрых и надежных способов определения данных микроорганизмов в почве. Кроме того, значительный интерес при исследовании собственно феномена ассоциативной микрофлоры представляет изучение их сезонных колебаний, а также изменения их численности, вызванные антро-

погенными воздействиями. В целом развитие подходов, позволяющих осуществлять мониторинг состава ризосферных бактерий, представляется одной из актуальных задач современной экологической микробиологии [10].

Несмотря на то что исследованию бактериофагов почвенных микроорганизмов посвящено много работ, исследованию бактериофагов почвенных бактерий уделяется не так много внимания. В процессе эволюции вирусы бактерий адаптируются для взаимодействия с клетками-хозяевами и поэтому являются идеальными средствами для детекции этих микроорганизмов. За счет рецепторов, расположенных на поверхности клетки, осуществляется узнавание и прикрепление бактериофагов только к специфичным бактериальным клеткам. На этом принципе основано большинство методов детекции микробных клеток с использованием бактериофагов [11,12]. Широкое распространение получили биосенсорные методы детекции микроорганизмов с использованием бактериофагов [13–15].

Развитие новых и совершенствование существующих методов регистрации и изучения взаимодействия микробных клеток с бактериофагами является весьма актуальной задачей. Регистрация инфекции микробной клетки бактериофагом служит также информативным параметром для определения микробных клеток в анализируемом образце. Одним из перспективных направлений по определению микробных клеток является развитие методов электрофизического анализа, при этом особый интерес представляют акустические методы, поскольку характеризуются высокой чувствительностью и минимальным временем проведения анализа. Особо следует отметить акустические методы анализа биологических взаимодействий непосредственно в жидкой суспензии, контактирующей со свободной поверхностью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем без каких-либо активных иммобилизованных слоев. Описанные преимущества открывают перспективы использования метода электроакустического анализа для регистрации инфекции микробных клеток бактериофагами для развития методов детекции микробных клеток. В настоящее время существует большое количество статей и патентов, посвященных этим резонаторам и их использованию для решения биотехнологических задач [16–19]. Ранее нами была показана возможность использования метода акустического анализа для детекции бактерий при их взаимодействии с антителами и фаговыми антителами [20,21]. Важным критерием при разработке новых методов регист-

рации взаимодействия бактериофагов с микробными клетками является их универсальность и возможность использования для различных объектов. В связи с этим необходима оптимизация метода электроакустического анализа, ускорение циклов измерений, отработка критерия чувствительности и расширение диапазона объектов исследования.

Целью работы являлось развитие метода электроакустического анализа для детекции и контроля численности почвенных микроорганизмов азоспирилл путем исследования их взаимодействия с бактериофагами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Бактериальные штаммы и условия выращивания бактерий.** В работе использовали штаммы *A. brasilense* Sp7, Cd, Sp107, Sp245, Jm6B2, Br14, KR77, S17, S27, SR55, SR75; *Nitrospirillum amazonense* Am14; *A. halopraeferans* Au4; *Niveispirillum irakense* KBC1, KA3; *A. lipoferum* Sp59b, RG20a, SR65; *Escherichia coli* B-878 и XL-1, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов), а также *Pseudomonas putida* (штаммы BA-11, C-11) и *Acinetobacter calcoaceticum* (штамм A-122), полученные из коллекции лаборатории Саратовского НИИ «Биокатализ» (г. Саратов).

Культуры пересевали каждые 14 суток.

Для культивирования бактерий использовали жидкую питательную среду LB следующего состава (г/л): NaCl – 10,0, пептон – 5,0 (Becton, Dickinson and Company, Франция), а также дрожжевой экстракт (DIFCO, США) – 5,0.

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

**Выделение и характеристика бактериофагов.** Выделение бактериофага проводили с использованием методики, описанной в работе [22]. Для стимуляции выхода бактериофагов из клеток культуру микроорганизмов охлаждали до  $+4^\circ\text{C}$  в течение полутора–двух часов, а затем клетки отделяли центрифугированием при 2500 g в течение 40 мин. К супернатанту добавляли 0,2 объема 20%-го раствора полиэтиленгликоля (PEG 6000, Panreac, Испания), содержавшего 1,6 M NaCl, и охлаждали до  $+4^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин и высушивали в течение 30 мин. Осадок растворяли в 1 мл 10 mM трис-HCl-буфера, pH 7,5–8,0, содержавшего 1 mM ЭДТА, нерастворив-

шуюся его часть удаляли центрифугированием при 10000 g в течение 5 мин. К супернатанту в стерильных условиях добавляли 0,2 мл 20%-го раствора полиэтиленгликоля, содержащего 1,6 М NaCl, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 6500 g в течение 5 мин и растворяли в 1 мл 10 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,5–8,0, содержащего 1 мМ ЭДТА. Суспензию бактериофага хранили при  $-4^{\circ}\text{C}$ .

**Определение количества фаговых частиц.** Количество фаговых частиц определяли на спектрофотометре Specord BS-250 (Analytik Jena, Германия) в кювете с длиной оптического пути 1 мм.

**Электронная микроскопия.** Электронномикроскопические снимки получали при помощи просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Подготовку препаратов осуществляли методом флотации, при этом использовали медные сеточки (200 меш) с формваровой подложкой. Для этого 20 мкл суспензии фагов наносили на пленку (Parafilm, США). Сеточку помещали на 2 мин на каплю данной суспензии (количество бактериофагов составляло не менее  $10^6$  фаговых частиц/мл). Затем выдерживали сеточку с адсорбированными бактериофагами в течение 2 мин на капле деионизованной воды. Далее проводили негативное контрастирование препарата в 1%-м растворе уранилацетата. Избыток уранилацетата отмывали в течение 2 мин в деионизованной воде, удаляли лишнюю жидкость, прикасаясь к краю сеточки фильтровальной бумагой, затем подсушивали сеточку в течение 30 с.

Для визуализации взаимодействия бактериофагов с клетками азоспирилл препараты готовили следующим образом: к суспензии бактериальных клеток добавляли специфичный бактериофаг (из расчета  $\sim 20$  фагов на бактерию) и инкубировали при  $27^{\circ}\text{C}$  в течение 3 мин. Далее суспензию наносили на покрытые нитроцеллюлозой электронномикроскопические сеточки и контрастировали препараты 1%-м раствором уранилацетата. Изучение бактериофагов и начальных стадий их взаимодействия с клеточной поверхностью проводили по электронным микрофотографиям в количестве не менее 70 снимков для каждого образца бактериофага и микробной клетки.

**Определение спектра литической активности бактериофагов.** Выращенные в жидких питательных средах бактериальные культуры нано-

сили на поверхность 1,5%-й агаризованной LB-среды в количестве трех–четырех капель. Стерильным шпателем распределяли по всей поверхности питательной среды бактериальную взвесь и подсушивали чашки Петри в термостате в течение 15–20 мин. На наклонную поверхность засеянной таким образом питательной среды наносили каплю бактериофага так, чтобы она стекала на противоположную сторону чашки Петри. Засеянные чашки Петри инкубировали при  $32^{\circ}\text{C}$  в течение 18–20 ч. В качестве контроля использовали чашки Петри с культурами без нанесения бактериофага.

Результат считали положительным в случае образования прозрачной зоны лизиса на бактериальном газоне в том месте, куда наносили суспензию бактериофага [23].

**Проведение электроакустического анализа.** Все эксперименты по изучению изменений механических и электрических свойств суспензий бактериофагов при биоспецифическом взаимодействии фагов с микробными клетками проводились 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  $5 \times 10$  мм<sup>2</sup> с зазором между ними 3 мм. Часть электродов и область вокруг них были покрыты специальным лаком, который демпфировал паразитные волны Лэмба [24] и обеспечивал достаточно высокую добротность ( $\sim 630$ ). На верхней стороне пластины была приклеена жидкостная ячейка объемом  $\sim 1$  мл. Для проведения анализа подготовленные суспензии бактериофагов как с микробными клетками, так и без них вносили в вышеупомянутую жидкостную ячейку и проводили измерения реальной и мнимой частей электрического импеданса датчика с помощью прецизионного измерителя LCR-параметров Agilent 4285A (Agilent Technologies, США).

Все анализы проводили по крайней мере в пяти повторностях, результаты представляли в виде средних значений, полученных с указанием стандартного отклонения. Относительная погрешность результатов измерений стандартных образцов составляла  $\pm 2\%$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из микробных клеток *A. brasilense* Sp7 был выделен бактериофаг  $\Phi\text{Ab-Sp7}$  и были определены его основные свойства [22]. Титр бакте-

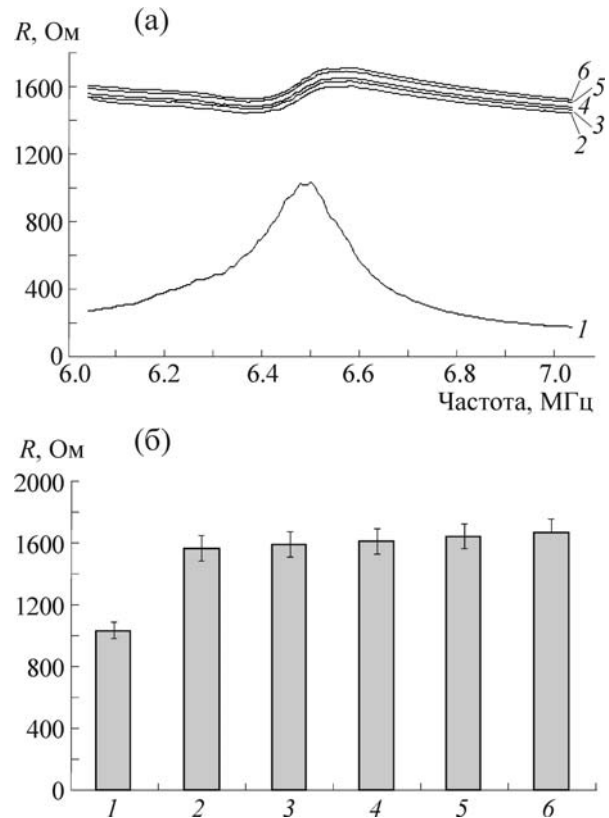
риофага ФАб-Sp7, исследованный методом агаровых слоев, составил  $1,6 \times 10^{10}$  частиц в 1 мл.

Поскольку чувствительность бактерий к бактериофагам является сравнительно устойчивым признаком, который связан с присутствием у вирусных частиц определенных доменов и комплементарных им сайтов на поверхности бактериальной клетки, изучение взаимодействий микробных клеток со специфичными бактериофагами имеет важное значение для микробиологии и вирусологии. При этом бактериофаги являются прекрасным инструментом для разработки систем детекции микробных клеток. Основная идея экспериментов заключалась в демонстрации возможности использования метода электроакустического анализа для детекции клеток азоспирилл с помощью бактериофага ФАб-Sp7.

Для решения вопросов детекции микробных клеток был использован резонатор с поперечным возбуждающим электрическим полем с простейшей геометрией электродов, нанесенных на пластину ниобата лития X-среза, разработанный в лаборатории физической акустики Саратовского филиала Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН (г. Саратов). Для подавления нежелательных колебаний использовали нанесение поглощающего покрытия на определенную область резонатора [24].

После предварительной оптимизации условий измерения электроакустических параметров (выбор частоты измерения, времени взаимодействия, количества микробных клеток в измерительной ячейке) были выбраны следующие условия: диапазон частот составлял 6–7 МГц, при этом время анализа равнялось ~10 мин, а количество клеток, вносимых в измерительную ячейку, не превышало  $10^8$  клеток/мл.

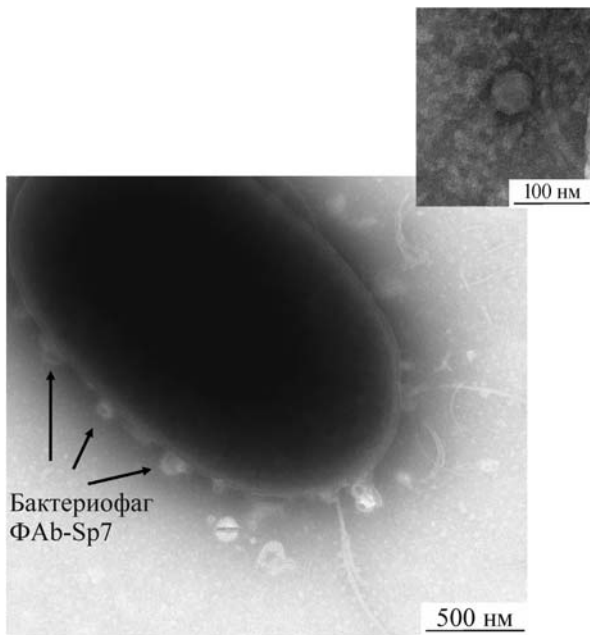
Далее при помощи пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем изучали динамику изменения реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора с клеточной суспензией *A. brasilense* Sp7 при инфекции бактериофагом ФАб-Sp7. В предварительных экспериментах было показано, что максимальное изменение аналитического сигнала фиксируется при внесении в суспензию клеток *A. brasilense* Sp7 специфичных бактериофагов из расчета 20 фагов на 1 бактерию, поэтому в данном случае использовали такое же количество бактериофагов. К суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 добавляли бактериофаг, затем суспензию клеток с бактериофагом инкубировали при 37°C и регистрировали изменения электроакустических параметров через 1,



**Рис. 1.** (а) – Динамика изменения реальной части электрического импеданса резонатора для бактериальной суспензии *A. brasilense* Sp7 при инфекции бактериофагом ФАб-Sp7: контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов (1); суспензии клеток с добавлением бактериофагов, время от начала инфекции: 1 мин (2); 5 мин (3); 10 мин (4); 20 мин (5); 30 мин (6). (б) – Диаграмма изменения значения реальной части электрического импеданса на частоте ~6,5 МГц от времени: контроль (1); 1 мин (2); 5 мин (3); 10 мин (4); 20 мин (5); 30 мин (6).

5, 10, 20 и 30 мин от начала инфекции. Было показано (рис. 1а), что в результате инфекции клеток изучаемым бактериофагом значительное изменение реальной и мнимой частей электрического импеданса происходит уже через минуту от времени воздействия. Это подтверждается рис. 1б, где показано изменение реальной части электрического импеданса на частоте 6,5 МГц при различных временах инкубации.

Следует отметить, что изменение электрического импеданса после 5, 10, 20 и 30 мин от начала инфекции клеток бактериофагом фиксировалось в пределах 5%. Исходя из представленных данных, можно сделать вывод, что минимальное время, необходимое для взаимодействия бактериофага ФАб-Sp7 с бактериальными клетками *A. brasilense* Sp7, составляет ~5 мин.



**Рис. 2.** Электронномикроскопическое изображение клеток *A. brasilense* Sp7 при их взаимодействии с бактериофагом ΦAb-Sp7, на врезке – изображение бактериофага ΦAb-Sp7.

В ходе измерений не было замечено изменений электрического импеданса во времени, т.е. скорость изменения импеданса была существенно меньше времени измерений, которое составляло ~10 мин. Таким образом, можно сказать, что указанные измерения фиксировали конечное состояние суспензии, поскольку повторные эксперименты приводили к тем же самым результатам.

Полученные данные свидетельствуют о чувствительности используемого датчика к рассматриваемой биологической реакции. С физической точки зрения это объясняется следующим образом. При добавлении к суспензии клеток специфичного бактериофага электрическая проводимость суспензии возрастает [25]; это связано с тем, что взаимодействие бактериофагов с микробными клетками начинается с адсорбции фага на поверхности бактериальной клетки. Зафиксированные изменения частотных характеристик микробных клеток наблюдаются уже после пятиминутного взаимодействия бактериофага с индикаторной культурой, что, вероятно, обусловлено процессом адсорбции бактериофага на микробной клетке. При дальнейшем воздействии бактериофага на микробные клетки значительные изменения реальной и мнимой частей электрического импеданса пьезоэлектрического резонатора не зафиксированы. Тем не менее изменения, проис-

ходящие после пятиминутной инфекции, возможно, приводят к росту вязкости и соответствующему уменьшению электрического импеданса. Таким образом, зафиксированные изменения в клетке-хозяине связаны с различными повреждениями внутриклеточных структур, обусловленными выходом вирусной ДНК в цитоплазму клетки-хозяина и процессами, происходящими в цитоплазме [26]. Все структурные и морфогенетические белки бактериофага локализованы в мембране инфицированной клетки, что согласуется с моделью, согласно которой сборка фага происходит одновременно с выталкиванием фага из клетки [27]. Следовательно, зарегистрированное увеличение электрической проводимости суспензии клеток при их взаимодействии со специфическим бактериофагом может быть объяснено самим процессом фаговой инфекции, сборкой бактериофагов и их выходом из клетки, при одновременном выходе компонентов клеточной цитоплазмы в среду. Как было показано в работе [25], увеличение проводимости суспензии приводит к увеличению как реальной, так и мнимой частей электрического импеданса.

Понимание особенностей взаимодействия бактериофагов с микробными клетками является необходимым условием для их успешного применения в прикладной микробиологии. При этом метод электронной микроскопии является одним из распространенных методов прямой регистрации взаимодействия вирусов с поверхностными структурами клеток. Поэтому для регистрации взаимодействия бактериофагов с гомологичными клетками и контроля полученных данных был применен метод электронной микроскопии. Проводили электронномикроскопическое исследование взаимодействия бактериофага ΦAb-Sp7 с микробными клетками *A. brasilense* Sp7 (рис. 2). Из представленных данных видно, что бактериофаги хорошо адсорбируются на поверхности клеток азоспирилл, при этом наблюдается равномерная по всей поверхности бактериальной клетки адсорбция вирусов. Для улучшения восприятия полученных данных, на рисунках представлены электронномикроскопические изображения соответствующего бактериофага.

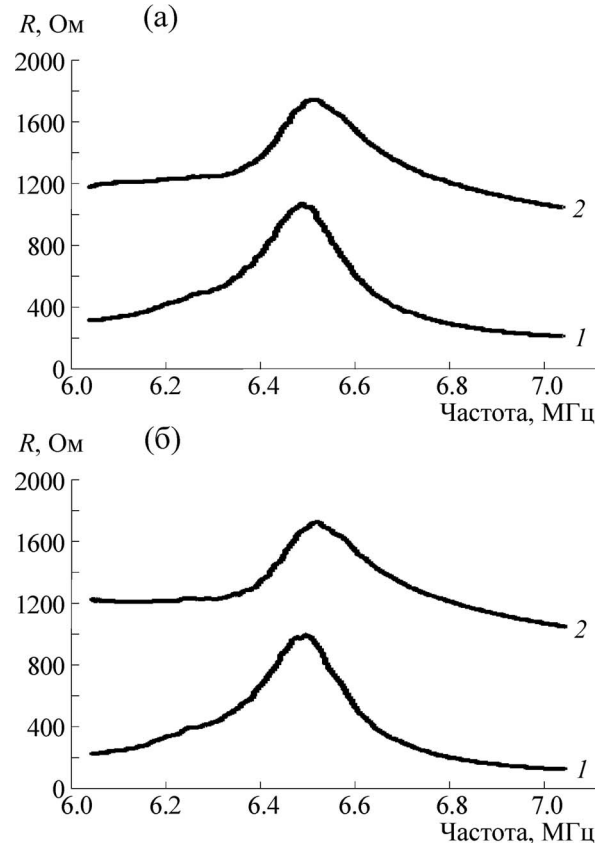
На следующем этапе было определено минимальное количество детектируемых клеток с использованием изучаемого бактериофага при помощи упомянутого электроакустического датчика. Были проведены измерения при концентрациях  $10^6$ ,  $10^4$ , и  $10^2$  клеток/мл в ячейке. Процедура подготовки образца, внесения бактериофагов и проведения измерений была аналогична вышеописанной. На рис. 3а,б пред-

ставлены зависимости реальной части электрического импеданса от количества клеток в ячейке  $10^6$  и  $10^4$  клеток/мл соответственно. Показано, что для суспензий клеток *A. brasilense* Sp7 при количестве клеток в измерительной ячейке  $10^6$  и  $10^4$  клеток/мл внесение изучаемых бактериофагов, выделенных из индикаторного штамма, приводит к существенному изменению электрического импеданса. Следовательно, датчик позволяет четко разграничивать ситуации, когда происходит взаимодействие бактериальных клеток со специфичными бактериофагами от контрольных экспериментов, когда такое взаимодействие отсутствует. Важно отметить, что при проведении измерений, когда количество клеток в ячейке составляло  $10^2$  клеток/мл, при их инфицировании изучаемым бактериофагом регистрируемый аналитический сигнал был не достоверный, поэтому полученные результаты не приводятся.

Таким образом, показано, что предел детекции клеток с использованием электроакустического датчика при использовании бактериофага ФАб-Sp7 составляет  $10^4$  клеток/мл.

Известно, что некоторые виды бактериофагов обладают широким спектром литической активности и инфицируют лишь определенные штаммы одного вида бактерий, тогда как другие характеризуются множественной вирулентностью [28]. Было проведено изучение селективности действия бактериофага ФАб-Sp7 в отношении других видов и штаммов азоспирилл с использованием пьезоэлектрического резонатора. В соответствии с таксономическим положением и степенью родства к штамму, из которого был выделен бактериофаг, были протестированы следующие виды и штаммы бактерий рода *Azospirillum*: *A. brasilense* (штаммы: Cd, Sp107, Sp245, Jm6B2, Br14, KR77, S17, S27, SR55, SR75); *A. lipoferum* (штаммы Sp59b, SR65 и RG20a); *A. halopraeferans* (штамм Au4); *Nitrospirillum amazonense* (штамм Am14); *Niveispirillum irakense* (штаммы KBC1, KA3), а также бактерии гетерологичных родов: *Escherichia coli* (штаммы XL-1 и B-878); *Pseudomonas putida* (штаммы C-11 и BA-11); *Acinetobacter calcoaceticum* (штамм A-122).

Установлено, что изменение импеданса клеточных суспензий при их инфицировании бактериофагом ФАб-Sp7 зафиксировано у микробных клеток *A. brasilense* штаммов Sp7; Cd; SR55; Br14; KR77; Sp107; S27; *A. lipoferum* SR65; *Nitrospirillum amazonense* Am14, *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3, *A. halopraeferans* Au4.



**Рис. 3.** Зависимость реальной части электрического импеданса резонатора для бактериальной суспензии *A. brasilense* Sp7 от количества клеток в измерительной ячейке при их инфекции бактериофагом ФАб-Sp7 (клеток/мл): (а) –  $10^6$ ; (б) –  $10^4$ : (1) – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; (2) – суспензия клеток с добавлением бактериофагов.

Что касается суспензий клеток *A. brasilense* штаммов Sp245, SR75, S17, JM6B2, *A. lipoferum* Sp59b, RG20a, *E. coli* штаммов XL-1 и B-878, *P. putida* C-11 и BA-11, *A. calcoaceticum* A-122 – изменения вышеуказанных параметров не наблюдались.

Полученные результаты подтверждены стандартным микробиологическим методом определения литической активности бактериофага ФАб-Sp7 методом «стекающая капля» (таблица).

Литическая активность бактериофага ФАб-Sp7 в отношении клеток *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3, *Nitrospirillum amazonense* Am14 объясняется их близкородственностью к роду *Azospirillum*. Клетки *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3, *Nitrospirillum amazonense* Am14 до недавнего момента относились к роду *Azospirillum*, но были переклассифицированы [29].

Определение спектра литической активности бактериофага ФАб-Sp7 в отношении ряда бактериальных штаммов, определенной методом «стекающая капля»

Микроорганизмы	Штамм	Результат
<i>A. brasilense</i>	Sp7	+
	Cd	+
	SR75	-
	Sp245	-
	Br14	+
	KR77	+
	Jm6B2	-
	S17	-
	S27	+
	SR55	+
<i>A. lipoferum</i>	Sp59b	-
	RG20a	-
	SR65	+
<i>A. halopraeferans</i>	Au 4	+
<i>N. irakense</i>	KBC1	+
	KA3	+
<i>N. amazonense</i>	Am14	+
<i>P. putida</i>	C-11	-
	BA-11	-
<i>E. coli</i>	XL-1	-
	B-878	-
<i>A. calcoaceticum</i>	A-122	-

Примечание. «+» – Наличие лизиса бактериальной культуры; «-» – отсутствие лизиса бактериальной культуры.

Проведенные исследования продемонстрировали отсутствие литической активности выделенных бактериофагов по отношению к бактериям гетерологических рядов: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*.

Тот факт, что бактериофаги не взаимодействуют с клетками гетерологических рядов, свидетельствует об отсутствии на поверхности клеток соответствующих рецепторов. Селективность действия бактериофагов в отношении клеток азоспирилл можно объяснить отличием в организации главного компонента внешней мембраны – липополисахарида, который, по-видимому, играет важную роль в процессе адсорбции бактериофагов на бактериальной клетке.

Литическое действие бактериофага ФАб-Sp7 в отношении клеток *A. brasilense* штаммов Sp7, Cd, *N. irakense* KBC1 может быть связано с высокой степенью сходства их О-антигенов [30]. Клетки *A. lipoferum* Sp59b, *A. brasilense* штаммов Cd, Sp7 и *N. irakense* KBC1 отнесены к одному

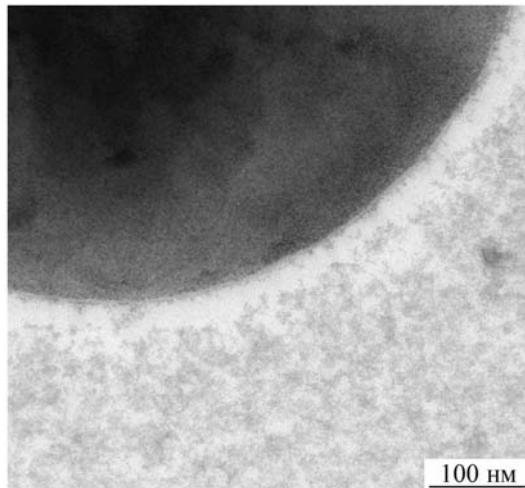
серотипу, но, несмотря на идентичность моносахаридного состава и относительных показателей структуры, штамм Sp59b имеет существенные отличия в антигенных свойствах липополисахарида [31]. Этот факт может объяснить устойчивость штамма Sp59b к действию бактериофага ФАб-Sp7.

Клетки *A. brasilense* штамма Sp245, как и клетки штамма Jm6B2, проявляли устойчивость к действию бактериофага ФАб-Sp7. Гомологичный бактериофагу ФАб-Sp7 штамм *A. brasilense* Sp7 и штамм Sp245 относятся к разным серотипам [32], что может свидетельствовать об устойчивости последнего к действию бактериофага ввиду отсутствия специфических антигенных детерминант на поверхности штамма Sp245.

Для подтверждения полученных результатов и исключения неспецифического взаимодействия было проведено электронномикроскопическое исследование взаимодействия бактериофага ФАб-Sp7 с клетками других, не комплементарных штаммов. Поскольку показано, что бактериофаг ФАб-Sp7 не проявляет активности в отношении клеток *A. brasilense* Jm6B2 (таблица), в качестве контроля использовали клетки данного штамма. Условия подготовки образцов были аналогичны таковым при подготовке образцов для визуализации специфического взаимодействия. Показано (рис. 4), что адсорбция бактериофага ФАб-Sp7 на микробных клетках *A. brasilense* Jm6B2 не происходит. Поверхность бактериальных клеток *A. brasilense* Jm6B2 остается полностью свободной от фаговых частиц, что, видимо, связано с отсутствием на клетке соответствующих специфических рецепторов, способствующих адсорбции изучаемых бактериофагов.

Таким образом, бактериофаг ФАб-Sp7 является специфичным в отношении ряда клеток азоспирилл и не проявляет активность в отношении бактерий гетерологических родов, что дает возможность его использования для детекции клеток азоспирилл. Анализ литературных и собственных данных позволяет выявить корреляцию между особенностями организации клеточной поверхности различных серотипов азоспирилл с селективностью действия изучаемого бактериофага.

Важным моментом в развитии нового метода детекции клеток является получение аналитического сигнала при наличии мешающих факторов и, прежде всего, в присутствии посторонней микрофлоры. В связи с этим представляло интерес проведение измерений частотной зависимости реальной части импеданса для



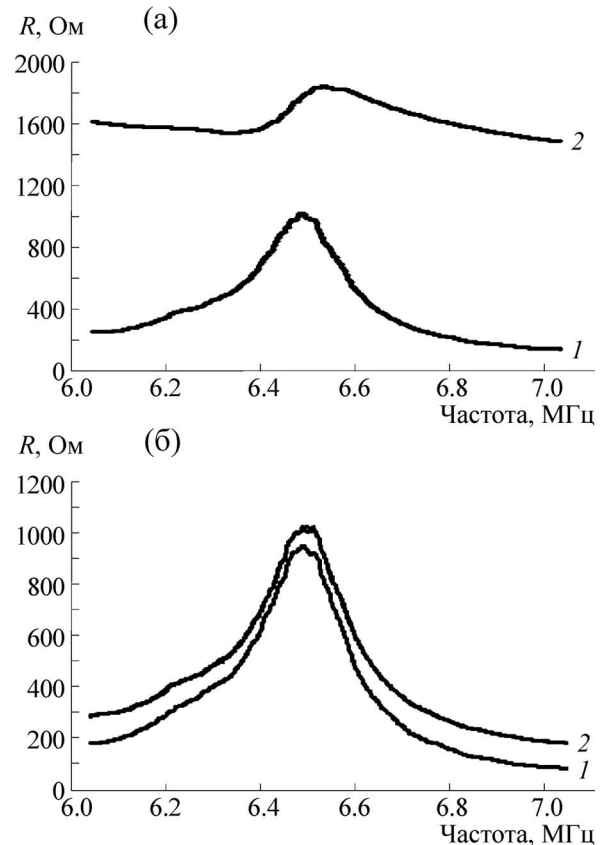
**Рис. 4.** Электронномикроскопическое изображение клеток *A. brasilense* Jm6B2 при добавлении бактериофага ΦAb-Sp7.

клеточной суспензии *A. brasilense* Sp7 при взаимодействии с бактериофагом ΦAb-Sp7 в присутствии посторонней клеточной культуры. В качестве такой культуры использовали клетки *E. coli* XL-1. Для этого к смешанной суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 и *E. coli* XL-1 (в соотношении 1:1) добавляли исследуемый бактериофаг и регистрировали изменение указанной частотной зависимости. Условия измерения электроакустических параметров были такими же, как и при использовании клеток *A. brasilense* Sp7. В качестве контроля использовалась смешанная суспензия клеток *A. brasilense* Sp7 и *E. coli* XL-1 без добавления бактериофагов. Как видно из полученных данных (рис. 5а), при инфекции клеток *A. brasilense* Sp7 исследуемым бактериофагом в присутствии посторонней микрофлоры (клеток *E. coli* XL-1) происходит изменение электрического импеданса.

Ранее с помощью стандартного микробиологического метода стекающей капли было показано, что бактериофаг ΦAb-Sp7 не инфицирует клетки *E. coli* XL-1.

Дополнительно проводили эксперименты по регистрации изменения электрического импеданса для клеток *E. coli* XL-1 при добавлении к ним бактериофага ΦAb-Sp7. При этом было показано (рис. 5б), что такие изменения не наблюдались. Следовательно, бактериофаг ΦAb-Sp7 не инфицирует бактерии *E. coli* XL-1.

Таким образом, показана возможность детекции микробных клеток *A. brasilense* Sp7 при их инфекции бактериофагом ΦAb-Sp7 с помощью метода электроакустического анализа клеточных суспензий и определен нижний предел



**Рис. 5.** (а) – Изменение реальной части электрического импеданса смешанной суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 + *E. coli* XL-1 при инфекции бактериофагом ΦAb-Sp7. (б) – Изменение реальной части электрического импеданса суспензии клеток *E. coli* XL-1 при инфекции бактериофагом ΦAb-Sp7: (1) – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; (2) – суспензия клеток с добавлением бактериофагов.

детекции микробных клеток, который составляет  $\sim 10^4$  клеток/мл. При изучении динамики процесса взаимодействия бактериофага ΦAb-Sp7 с клетками *A. brasilense* Sp7 показано, что изменение электрического импеданса фиксируется уже после 1 мин инфекции. Показано, что с помощью разработанного электроакустического датчика возможна детекция клеток *A. brasilense* Sp7 при их инфекции бактериофагом, выделенным из клеток *A. brasilense* Sp7, в присутствии посторонней микрофлоры. Таким образом, путем использования бактериофага ΦAb-Sp7 можно успешно осуществлять детекцию и идентификацию микробных клеток азоспирилл методом электроакустического анализа.

Полученные результаты представляются перспективными с точки зрения развития методов определения и контроля численности почвенных микроорганизмов, поскольку они рас-



смаатриваются как альтернатива химическим средствам защиты. Это связано с тем, что ризосферные микроорганизмы оказывают существенное влияние на механизмы индуцированной устойчивости растений и возможности их использования в растениеводстве для защиты сельскохозяйственных культур от патогенов и фитофагов широко известны. Однако при таком подходе сразу возникает проблема детекции и контроля численности этих микроорганизмов [9]. Использование метода электроакустического анализа для детекции клеток азоспирилл открывает возможности проведения экспресс-анализа ризосферных микроорганизмов (в частности, азоспирилл) при их инфекции бактериофагами.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 16-07-00821 и 16-07-00818).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. W. Beijerinck, Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkун. Infektionskr. Hyg. В **63**, 353 (1925).
2. J. Döbereiner and J. M. Day, in *Proc. Intern. Symp. on N<sub>2</sub>-Fixation* (Washington, 1976), pp. 518–537.
3. O. Steenhoudt and J. Vanderleyden, *FEMS Microbiol.* **24**, 487 (2000).
4. Y. Bashan, G. Holguin, and L. E. de-Bashan, *Canad. J. Microbiol.* **50**, 521 (2004).
5. В. В. Игнатова, *Молекулярные основы взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с растениями* (Наука, М., 2005).
6. J. I. Baldani and V. L. Baldani, *Acad. Bras. Cienc.* **77** (3), 549 (2005).
7. А. Л. Мулюкин, Н. Е. Сузина, А. Ю. Погорелова и др., *Микробиология* **78** (1), 42 (2009).
8. Ю. А. Чернова и Г. Л. Бурьгин, *Изв. Саратовского ун-та. Сер. Химия, биология, экология* **8** (2), 76 (2008).
9. И. В. Максимов и Р. Р. Абизгильдина, *Прикл. биохимия и микробиология* **47** (4), 373 (2011).
10. А. И. Красов, Дис. ... канд. биол. наук (ИБФРМ РАН, Саратов, 2009).
11. M. Schmelcher and M. Loessner, in *Bacteriophage: powerful tools for the detection of bacterial pathogens / Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, Ed by M. Zourob, et al. (Springer Science+Business Media, LLC, 2008), pp. 731–754.
12. S. Ripp, *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* **118**, 65 (2010).
13. P. Gascoyne, R. Pethig, J. Satayavivad, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1323**, 240 (1997).
14. R. D. Vaughan, C. K. O'Sullivan, and G. G. Cuilbault, *Enzyme and Microbial Technology* **29**, 635 (2001).
15. P. Kristensen and G. Winter, *Fold Des.* **3** (5), 321 (1998).
16. A. Ballato, E. R. Hatch, M. Mizan, et al., *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelectrics, Freq. Contr.* **33** (4), 385 (1986).
17. Y. Hu, L. A. French, Jr., K. Radecsky, et al., *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelectrics, Freq. Contr.* **51** (11), 1373 (2004).
18. W. Pinkham, M. Wark, S. Winters, et al., in *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* (2005), pp. 2279–2283.
19. M. Wark, B. Kalanyan, L. Ellis, et al., in *Proc. IEEE Ultrason. Symp.* (2007), pp. 1217–1220.
20. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **57** (3), 460 (2012).
21. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Микробиология* **82** (2), 218 (2013).
22. О. И. Гулий, О. А. Караваева, В. А. Великов и др., *Вопр. вирусологии* **1**, 45 (2016).
23. М. Адамс, *Бактериофаги* (Медгиз, М., 1961).
24. Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова, А. М. Шихабудинов и др., *Письма в ЖТФ* **37** (11), 27 (2011).
25. О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова и др., *Биофизика* **61** (1), 60 (2016).
26. E. M. Click and R. E. Webster, *J. Bacteriol.* **179**, 6464 (1997).
27. H. Endemann and P. Model, *J. Mol. Biol.* **250** (4), 496 (1995).
28. А. С. Лабинская *Микробиология с техникой микробиологических исследований* (Медицина, М., 1978).
29. S. Y. Lin, A. Nameed, F. T. Shen, et al., *Young Antonie van Leeuwenhoek* **105** (6), 1149 (2014).
30. О. Н. Коннова, А. С. Бойко, Г. Л. Бурьгин и др., *Микробиология* **77** (3), 350 (2008).
31. Ю. А. Филипьева, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (ИБФРМ РАН, Саратов, 2011).
32. Л. Ю. Матора, Г. Л. Бурьгин и С. Ю. Щеголев, *Микробиология* **77** (2), 196 (2008).

## Method of Acoustic Analysis for Detection of Bacteriophage-Infected Microbial Cells

O.I. Guliy\* \*\* \*\*\*, B.D. Zaitsev\*\*\*\*, A.M. Shikhabudinov\*\*\*\*, I.A. Borodina\*\*\*\*, O.A. Karavaeva\*, O.S. Larionova\*\*, A.A. Volkov\*\* \*\*\*, and A.A. Teplykh\*\*\*\*

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

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

\*\*\*Saratov Scientific and Research Veterinary Institute, ul. 53 Strelkovej Divizii 6, Saratov, 410028 Russia

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

The dependence of the change of the physical parameters of the suspension of *Azospirillum brasilense* Sp7 cells infected by bacteriophage ФAb-Sp7 on their numbers and exposure time was studied using a biological sensor based on a piezoelectric lateral electric field-excited resonator. The change in the value of the analytical signal was recorded after one min from the beginning of infection of the cells by bacteriophage. The selectivity of the action of bacteriophage ФAb-Sp7 against bacteria *Azospirillum brasilense* (strains Cd, Sp107, Sp245, Jm6B2, Br14, KR77, S17, S27, SR55, SR75), *A. lipoferum* (strains Sp59b, SR65 and RG20a); *A. halopraeferans* Au4, *Nitrospirillum amazonense* Am14; *Niveispirillum irakense* (strains KBC1 and KA3), as well as heterologous bacteria of the genera: *Escherichia coli* (strains XL-1 and B-878), *Pseudomonas putida* (strains C-11 and BA-11), *Acinetobacter calcoaceticum* A-122 was studied. The limit of reliable determination of the concentration of microbial cells during bacteriophage infection process was found, the limit of detection was  $\sim 10^4$  cells/ml. At the same time, the presence of foreign cell cultures (*E. coli* XL-1 cells) did not complicate the detection. It is shown that the method of electroacoustical analysis of cell suspensions can be useful for the detection of microbial cells azospirillum when infected by bacteriophage ФAb-Sp7. The obtained results are promising from the point of view of the development of methods for determining and controlling the number of soil microorganisms.

*Keywords:* *Azospirillum brasilense*, bacteriophages, electroacoustical analysis